

Eucleia P.B. Contel (\*\*)

Joselita Maria Mendes dos Santos (\*\*\*)

Wanderli Pedro Tadei (\*\*\*)

## RESUMO

São relatados resultados preliminares sobre o polimorfismo protéico de populações naturais de *Anopheles darlingi*, procedentes de duas localidades da região amazônica-Ariquememes (Rondonia) e Rodovia PA-422 (Pará). Para as esterases, foi detectada variação para o locus *Est-2* na população de Ariquememes, enquanto foi monomórfico na população da PA-422, sendo verificados nesta última, apenas indivíduos com o genótipo *Est2\*F/Est2\*F*. A frequência do alelo *Est2\*F* foi estimada em 0,80 na população de Ariquememes, valor este muito maior do que o observado na população da BR-174 (Manaus/Boa Vista), em estudos anteriores, que foi de 0,48. Os resultados para o sistema da leucina aminopeptidase (LAP) sugerem que a enzima é controlada por três loci, aparentemente monomórficos em ambas as populações.

*Anopheles darlingi*, do subgênero *Nyssorhynchus*, apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o México até ao norte da Argentina, e é o principal vetor da malária humana no Brasil (Rachou, 1958; Forattini, 1962; Ferreira, 1964).

Dados de polimorfismo cromossômico foram obtidos por Kreutzer *et al.* (1972) e Tadei *et al.* (1982), os quais evidenciaram que a espécie é altamente polimórfica no centro da distribuição geográfica. O valor médio por indivíduos obtido por esses últimos autores em populações da Amazônia, para inversões no estado heterozigoto, foi de  $4,13 \pm 0,13$  e medidas realizadas em diferentes épocas do ano nessas mesmas populações evidenciam que o índice médio oscila, porém são mantidos índices elevados de heterozigotos (Tadei & Santos, 1982).

Estudos isoenzímicos em *A. darlingi* foram realizados por Santos (1979) e Narang

---

(\*) Trabalho subvencionado pela FAPESP e CNPq

(\*\*) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. 14100 - Ribeirão Preto - SP

(\*\*\*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia,  
Caixa Postal 478 - 69000 - Manaus - AM.

et al. (1979) em populações da Rodovia BR-174 (Manaus/Boa Vista).

Santos estudou a genética de um sistema esterásico na fase de larva de 4º instar, controlado por dois alelos denominados *Est2\*F* e *Est2\*S* sendo a frequência desse último estimada em 0,52. Um dado interessante obtido e a partir do estudo desse sistema isoenzimático foi a estimativa do número de machos que se acasalam com uma fêmea, usando-se como parâmetro as frequências desses alelos em descendentes de uma mesma postura (Santos et al., 1981).

Narang et al. (1979) estudaram 19 loci que controlam a síntese de diferentes enzimas e verificaram que a proporção de loci polimórficos é 0,632 e que a proporção de indivíduos heterozigotos por locus é de 0,125.

O presente trabalho é um relato preliminar sobre um projeto no qual se pretende estudar polimorfismos cromossômicos e protéicos, em amostras de diferentes regiões que abrangem a distribuição geográfica de *A. darlingi* no Brasil. Até o momento, foram coletadas amostras de Ariquemes (Rondônia), da Rodovia PA-422 (Pará) e de Cruzeiro do Sul (Acre); posteriormente, as coletas deverão ser feitas em populações do Brasil Central e da região Sudeste.

As fêmeas fecundadas, coletadas na natureza, são transportadas para o laboratório para postura, isoladamente. Quando surgem as larvas, elas são mantidas até atingir o 4º instar e então são utilizadas para a preparação de lâminas dos cromossomos salivares e para análise eletroforética, inicialmente de esterases e leucina-aminopeptidases. A técnica empregada é a eletroforese em gel amido (11%). Nas cubas, é utilizado tampão Borato 0,3M, pH 8,6 e o gel feito com Tris-citrato 0,081M, pH 8,6 (Poulik, 1957).

A revelação das zonas indicando atividade esterásica é feita tanto com  $\alpha$ -naftil propionato como com propionato de umbeliferona (substrato fluorogênico). No primeiro caso, os géis são incubados durante aproximadamente 30 minutos numa mistura contendo: 100 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6,5; 1 ml de solução de  $\alpha$ -naftil propionato (1% em água: acetona, v:v) e 200mg de Fast Blue RR salt. No segundo, 1 mg de propionato de umbeliferona é dissolvido previamente em 0,5 ml de acetona, 10 ml de tampão acetato, 0,2M, pH 5,5 são adicionados ao substrato dissolvido em acetona e colocados imediatamente sobre o gel, que é observado sob luz U.V.

Para revelar isoenzimas da leucina-aminopeptidase a parte homóloga do gel acima é incubada em 100 ml de Tris-maleato 0,05M, pH 6,0 contendo 25 mg de L-leucil  $\beta$ -naftilamida (previamente dissolvidas em 0,5 ml de dimetil-sulfóxido) e 50 mg de Fast Garnet GBC Salt.

Resultados preliminares quanto à análise do polimorfismo cromossômico já foram obtidos nas amostras da rodovia PA-422 e de Cruzeiro do Sul e os mesmos evidenciaram, também para essas populações, altos índices de inversões no estado heterozigoto (Tadei em desenvolvimento).

Quanto aos polimorfismos enzimáticos, até o momento, foram analisadas amostras de Ariquemes (32 indivíduos) e da rodovia PA-422 (110 indivíduos), para os dois sistemas citados acima. Os resultados sugerem que o sistema de leucina aminopeptidase é controlado por 3 loci, aparentemente monomórficos em ambas as populações. As 3 isoenzimas

codificadas por esses loci foram denominadas de LAP-1 a LAP-3, a partir da mais eletro negativa, conforme está mostrado na Figura 1.

Em relação às esterases (Figura 2), confirmamos a presença de duas regiões principais de atividade detectadas nessa fase do desenvolvimento, Est-1 e Est-2, que já haviam sido descritos numa população da BR-174 (Rodovia Manaus/Boa Vista) por Santos (1979).

Est-1 mostrou-se monomórfica nas duas populações analisadas, no presente trabalho. Contudo, são observadas duas bandas para este locus (Figura 2) indicando que, possivelmente, possa ser produto de dois alelos. Entretanto, o número de indivíduos analisados ainda é pequeno para observação de variabilidade nessa região e os dados serão ampliados para estudo desta esterase. Quanto a Est-2, da mesma maneira como relatado para amostras da BR-174, mostrou-se polimórfica, mas somente na população de Ariquemes onde encontramos segregação dos dois alelos Est2\*S e Est2\*F (Figura 3). Na população da Rodovia PA-422, encontramos somente indivíduos com genótipo Est2\*F/Est2\*F enquanto que a frequência do alelo Est2\*F na população de Ariquemes foi estimada em 0,80. Esse valor revelou-se muito maior que o estimado para a BR-174 o qual, conforme já relatado no início dessa comunicação, foi de 0,48.

#### ABSTRACT

*We have related preliminary results on protein polymorphism in two natural populations of Anopheles darlingi from the Amazon region (Ariquemes, state of Rondonia, and the Highway PA-422, in the state of Para). For the esterases there were observed variations in the locus Est-2 in the Ariquemes population, while this locus was monomorphic in the Highway PA-422 population. In the later population we found individuals showing the genotype Est2\*F/Est2\*F. The allele frequency Est2\*F has been estimated at 0,80 in the population of Ariquemes, this value being much higher than the one related to our previous study on the Highway BR-174 (Manaus/Boa Vista) which was 0,48. The results concerning leucine-aminopeptidases (LAP) suggest that this enzyme is controlled by three apparently monomorphic loci in the both populations.*

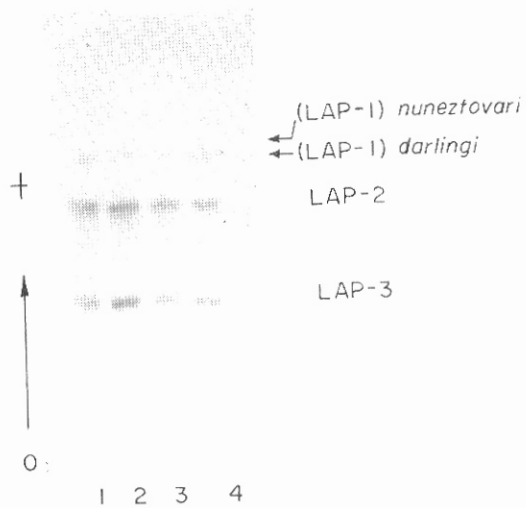


Figura 1. Isoenzimas de LAP (leucina-aminopeptidases) de larvas de *Anopheles darlingi* (amostras 1,3 e 4) e de *nuneztovari*. Notar a identidade de migração entre LAP-2 e LAP-3 nas duas espécies. Gel de amido, pH 8.6. Migração segundo seta.

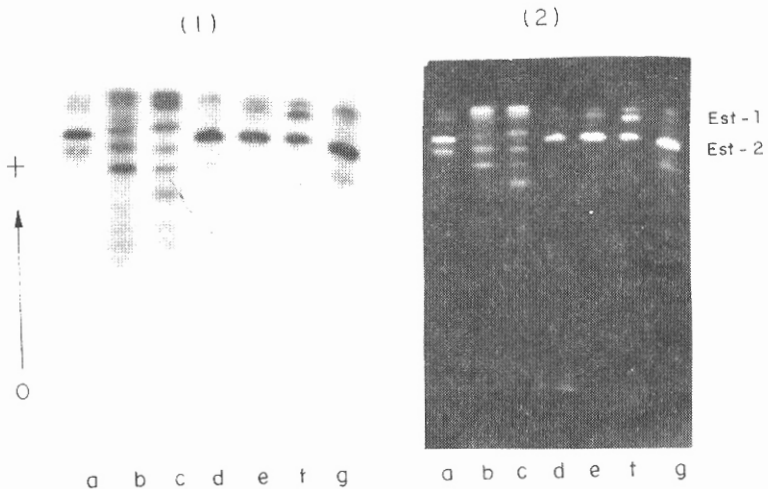


Figura 2. Isoenzimas de esterases reveladas com  $\alpha$ -naftail propionato (1) e propionato de umbeliferona (2) em gel de amido. As amostras a,d, e f e g são larvas de *A. darlingi*; amostras b e c são larvas de *A. mediopunctatus*. Migração segundo a seta.

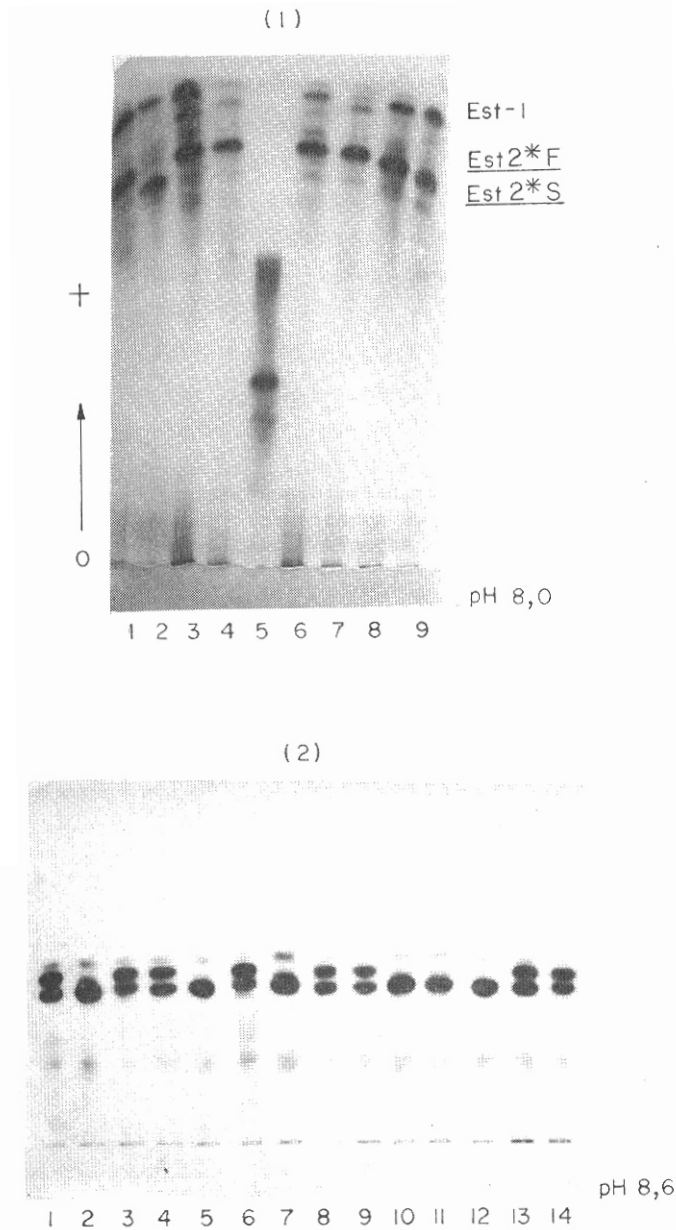


Figura 3. Perfil comparativo das esterases de larvas de *Anopheles darlingi* usando-se amido (1) e poliacrilamida (2) como meio suporte. As amostras 3 e 5 no gel de amido são de, respectivamente, *Anopheles mediopunctatus* e de uma pupa de abelha (*Apis mellifera*). Migração no sentido indicado.

## Referências bibliográficas

- Ferreira, E. - 1964. Distribuição geográfica dos Anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual da erradicação da malária. *Rev. Bras. Malariol.*, 16:329-348.
- Forattini, O.P. - 1962. *Entomologia Médica*. São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, v.1, 662p.
- Kreutzer, R.D.; Kitzmiller, J.B.; Ferreira, E. - 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosquito News*, 32:355-365.
- Narang, S.; Santos, J.M.M.; Garcia, H.C.; Cristokou, H.D.; Narang, N. - 1979. Genética de populações naturais de *Anopheles nuneztovari* e *Anopheles darlingi*. Correlação genética entre espécies. *Acta Amazonica*, 9(3):529-542.
- Poulik, M.D. - 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180(4600):1477-1490.
- Rachou, R. - 1958. Algumas manifestações de resistência do comportamento de insetos aos inseticidas no Brasil. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 10:277-290.
- Santos, J.M.M. - 1979. Aspectos biológicos e isoenzimáticos de *Anopheles (N.) darlingi* Root. 1926 (Diptera, Culicidae). Dissertação de mestrado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Fundação Universidade do Amazonas.
- Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Kerr, W.E. - 1981. Biologia de anofelinos amazônicos. 2. Fêmeas de *Anopheles darlingi* produzem filhos de um só macho. *Acta Amazonica*, 11(2):413-414.
- Tadei, W.P. & Santos, J.M.M. - 1982. Biologia de anofelinos amazônicos VII. Estudo da variação de frequências das inversões cromossômicas de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, 12(4):759-785.
- Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Rabbani, M.G. - 1982. Biologia de anofelinos amazônicos. V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, 12(2):353-369.

(Aceito para publicação em 12/4/84)