

Identificação de Vectores de Malária do Complexo *Anopheles Gambiae* pelas Técnicas de PCR e Citogenética em Espécimens Provenientes da Guiné-Bissau

* PINTO, J.
* ROSA, R.
* ROSÁRIO, V.
** PALSSON, K.
** JAENSON, T.

RESUMO

As espécies do complexo *Anopheles Gambiae* constituem alguns dos mais importantes vectores de malária na África. A capacidade vectorial destas espécies gêmeas é variável devido a diferenças quer genéticas, quer comportamentais entre si.

A identificação das seis espécies do complexo pode ser efetuada por técnica citogenética, baseada em preparações microscópicas dos cromossomas polítenes das células nutritivas ováricas, pelo reconhecimento de inversões cromossómicas fixas, características de espécie e, mais recentemente por PCR, baseado em Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição - "Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)", específicos de espécie, do DNA ribossomal. Ambas as técnicas foram avaliadas numa amostra de 712 mosquitos, coletada no bairro de Antula, Guiné-Bissau, em 6 casas, em 5 dias consecutivos de colecção, como parte de um estudo de controle de malária, baseado em redes mosquiteiras impregnadas.

De um modo geral, os resultados obtidos por ambas as técnicas citogenética e PCR foram semelhantes, mostrando uma dominância de *Anopheles Gambiae* s.s, com números inferiores para *An. melas*, resultado que está em concordância com estudos prévios. Apesar de mais caro, o PCR ofereceu vantagens significativas relativamente à técnica de citogenética, para estudos de identificação. Detalhes técnicos relativos a formas de colecção e conservação, entre outros, serão discutidos.

Palavras Chave: Malária, Mosquitos vectores, PCR, Identificação específica.

SUMMARY

Species of the *Anopheles Gambiae* complex constitute some of the most important malaria vectors in Africa. The vectorial capacity of these sibling species can vary, due to both genetical and behavioural differences between them.

Identification of the six known sibling species of the complex can be carried out by a cytogenetical technique, based upon squash preparations of polytene chromosomes from ovarian nurse cells, and recognition of fixed chromosomal inversions, and more recently, by PCR, based on species-specific Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) of ribosomal DNA. Both techniques were evaluated in a mosquito sample of 712 specimens, collected in Antula, Guinea-Bissau, from 6 houses, in 5 consecutive collecting dates as part of an entomological survey.

Overall, cytogenetical and PCR results were similar, showing dominance of *Anopheles Gambiae* s.s, with less numbers of *An. Melas*, in agreement with previous results. Though more expensive, PCR offered significant advantages over cytogenetics for identification studies. Technical details on form of collection will be discussed.

Key Words: Malaria, Mosquito vectors, PCR, Species identification.

* Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, Univ. Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal ** Depart. of Zoology, Uppsala Univ., Uppsala, Sweden.

INTRODUÇÃO

O complexo *Anopheles gambiae* é composto por seis espécies gêmeas de mosquitos Afrotropicais. Estas incluem alguns dos mais importantes e eficientes vectores de malária, a sul do Sahara (Petrarca, 1992). Apesar de morfologicamente indistintas, estas espécies apresentam diferenças genéticas, ecológicas e comportamentais que podem influenciar extremamente a sua importância como vectores de malária.

Atualmente, são vários os métodos que se utilizam para a identificação dos vectores de malária pertencentes a este complexo. Destes, referem-se entre outros a análise de izoenzimas (Miles, 1978), técnicas citogenéticas - citotaxonomia - (Colluzzi, 1968; Hunt, 1973) e métodos baseados em tecnologia de DNA, como sondas (Collins et al., 1988.I) e "Polymerase Chain Reaction" - PCR (Scott, 1993). Dos métodos mencionados, a citogenética tem sido até a data o mais utilizado.

No âmbito de um programa de controle de malária, baseado no uso de redes mosquiteiras impregnadas, atualmente em curso na Guiné-Bissau, efetuou-se um estudo comparativo entre a técnica de citogenética e PCR, para identificação de espécimes do complexo *A. Gambiae* capturados no terreno.

A Guiné-Bissau é um país Africano de Língua Oficial Portuguesa de elevada endemicidade de malária (OMS, 1993), situado na ponta ocidental da costa Africana, limitado a Norte pelo Senegal, a Sul e Leste pela Guiné Conacry e a Oeste pelo Oceano Atlântico. A parte continental do país consiste de uma planície costeira semipantanosa e de uma zona interior planáltica. Numerosos rios serpenteiam o país,

nos quais a água salgada das marés penetra as vezes até cerca de 150 km. A temperatura média anual é de 26°C e só existe uma época de chuva, desde o fim de maio até o fim de outubro.

MATERIAIS E MÉTODOS

A colecção de mosquitos foi efetuada no bairro de Antula, situado a 10 Km da capital Bissau, entre 19 de agosto e 12 de setembro de 1994. Foram realizadas colheitas em cinco dias consecutivos, em 6 casas diferentes do referido bairro. As colheitas foram efetuadas por quarto/casa, existindo duas casas com 4 quartos, três casas com 5 quartos e uma com 6 quartos. Os mosquitos foram capturados dentro dos quartos, de manhã (7.00 h), dentro e fora das redes mosquiteiras, utilizando-se um aspirador bucal.

Os mosquitos foram mantidos vivos em copos de cartão dentro do laboratório na área, à temperatura ambiente (25-28°C) e com umidade favorecida por algodão umedecido em água destilada, colocado sobre copos de cartão, até ao final da tarde, altura em que as fêmeas atingiam o estadio gonotrófico de semi-grávidas, adequado para preparações cromossómicas.

TÉCNICA CITOGENÉTICA

Após cerca de 12 horas de espera, os ovários de cada fêmea semi-grávida foram retirados para tubos Eppendorf (1,5 ml) com soluto de fixação Carnoy (etanol: ácido acético glacial 3:1), mantidos durante 24 horas à temperatura ambiente e posteriormente conservados a - 20°C.

As preparações cromossómicas foram efetuadas segundo Green (1972) e Hunt (1973) 60 dias após a recolha de ovários. Os padrões específicos de inversões cromossómicas foram identificados

de acordo com a nomenclatura de Coluzzi et al, (1979).

TÉCNICA DE PCR

As restantes partes destas fêmeas, bem como as fêmeas que não atingiram o estadio de semi-grávida, foram conservadas em tubos individuais, preenchidos com sílica-gel à temperatura ambiente. A extração de DNA foi efetuada 90 dias após colheita do material de estudo. Foram utilizados para o efeito: a cabeça, asas e patas e, em alguns casos, o abdômen.

Esta técnica de identificação é baseada na amplificação de segmentos das regiões "Intergenic Spacer (IGS)" do DNA ribossomal. Estas regiões apresentam polimorfismos de extensão dos fragmentos de restrição - "Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)" - polimorfismos estes que são característicos da espécie (Scott, 1993).

O DNA foi extraído do material colectado por mosquito (cabeça, pernas, asas e/ou abdômen) utilizando sempre material individual (e. g. tubos) e esterilização imediata por exposição ao fogo (e. g. agulhas de dissecção), de forma a evitar contaminações cruzadas. A técnica de extração utilizada foi a de Collins et al (1988. II). Cada amostra de DNA foi ressuspensa em 50 µl de H₂O destilada esterilizada e diluída 1:50 (DNA - molde). Aliquotas de 2 µl de DNA - molde foram usadas na reação de PCR por amostra.

Os primers utilizados foram os seguintes:

UN (GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT) - *A. gambiae*
s.l.

GA (CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT) - *A. gambiae*
s.s.

ME (TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA) - *A. melas*

Estes primers foram usados em mistura de reação multiplex.

A mistura de reação para cada

amostra em volume total de 9 μl de dH_2O esterilizada, continha 1X de tampão PCR (Perkin-Elmer Cetus), 2 mM de dNTP, 5 ng de primer UN, 2,5 ng de primer GA, 5 ng de primer ME e 0,25 U de Ampli Taq polymerase (Perkin-Elmer Cetus).

O programa de PCR consistiu em 30 ciclos (30°-94°C; 30° - 50°C; 30°-72°C, cada ciclo), seguido de um período de elongamento de 10' a 72°C. A temperatura de conservação do produto de PCR (soak) foi de 4°C.

RESULTADOS

Foram capturadas 712 fêmeas do complexo *A. gambiae*. Das 6 casas de onde se efetuou a colheita diária, não se observou um padrão regular no número de vectores colhidos por quarto e casa, existindo uma grande variação nestes valores. Por exemplo, um quarto da casa denominada #4 a colheita diária foi, respectivamente, de 28, 18, 19, 16 e 0 mosquitos. Na casa #6, a colheita foi de 0, 4, 1, 3 e 48 mosquitos, para um dos quartos. Não esteve no âmbito deste estudo determinar as causas de tal inesperada variação.

Foram identificados, por observação abdominal, estadios gonotróficos diferentes depois do período de repouso de cerca de 12 horas após colheita:

Fêmeas não alimentadas e não grávidas	36
Fêmeas alimentadas e não grávidas	285
Fêmeas alimentadas e semi-grávidas	293
Fêmeas grávidas	98

Para os estudos de citogenética, apenas foram utilizadas as 293 fêmeas semi-grávidas por exigência técnica, enquanto que para o PCR foi utilizada a amostra global (Tabela 1). Na figura 1 comparam-se as freqüências específicas obtidas para o grupo das semi-grávidas, únicas a serem identificadas por ambos os métodos.

Tabela 1. Identificação de espécies por Citogenética e PCR.

Espécies	Citogenética		PCR	
	N = 293	(%)	N = 712	(%)
<i>A. gambiae</i> s.s.	264	(90,1%)	665	(93,4%)
<i>A. melas</i>	13	(4,4%)	44	(6,2%)
Não-legíveis	16	(5,5%)	3	(0,4%)

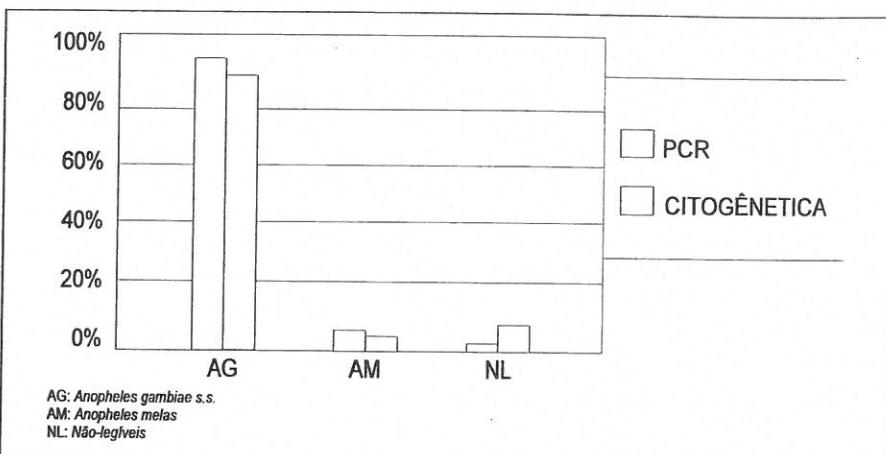


Figura 1. Comparação entre os resultados obtidos por PCR e Citogenética (fêmeas semi-grávidas) - (N = 293).

DISCUSSÃO

O trabalho de identificação dos vectores da malária no terreno apresenta sempre grandes dificuldades, que vão desde a permissão dos residentes das habitações para se efetuarem colheitas nos seus quartos, nas primeiras horas da manhã, à manutenção dos espécimes colhidos em condições próprias para futura utilização.

No âmbito de um programa em curso de controle da malária pela utilização de redes mosquiteiras impregnadas, efetuou-se um estudo comparativo de dois métodos de identificação de vectores, tendo em vista a localização das casas, a preparação do material para futura análise laboratorial e a complexidade das respectivas técnicas.

De um modo geral, em termos de freqüência das espécies identificadas, os resultados obtidos por ambas as técnicas (citogenética e PCR), foram semelhantes (Tabela 1), sendo *A. gambiae* s.s. a espécie dominante

(89,4% e 93,4%) em relação a *A. melas* (4,4% e 6,2%), resultados que estão de acordo com estudos prévios (Petrarca, 1983; Fonseca, 1994).

Os resultados obtidos claramente indicam que PCR e citogenética mostram grande especificidade na identificação dos membros do complexo *A. gambiae*.

A mais importante diferença verificada entre os dois métodos refere-se à existência de um número elevado de espécimes cuja leitura pela técnica citogenética foi Não-legível (5,5%), comparada com os 0% para a análise por PCR, se forem considerados apenas os resultados obtidos para as fêmeas semi-grávidas (Fig.1). Este resultado aponta para uma maior sensibilidade da técnica de PCR.

O método citogenético requer exclusivamente a existência de fêmeas semi-grávidas (ou de larvas do estadio L4), o que limita a amostragem de estudo e, sobretudo, um treino intensivo do microscopista, de modo a obter-se

uma boa interpretação dos referidos padrões. Além disso, as fêmeas precisam ser mantidas vivas durante aproximadamente 12 horas por forma a poderem atingir o estadio semi-grávido. Tal nem sempre é de fácil aplicação, havendo muitas vezes dificuldades como as vias de transporte serem freqüentemente inadequadas e, por conseguinte, as fêmeas colectadas viajarem em ambiente de "stress" até o local de repouso, o que fortemente afeta a obtenção de semi-grávidas para estudo.

O PCR permite identificar espécimens independentemente do estadio do ciclo de vida, visto que o DNA permanece inalterado, o que permite identificar todos os espécimens capturados numa colecção, e com o uso de muito pouco material (Fontenille, 1993). Além do mais, a estabilidade e durabilidade característica das moléculas de DNA, evitam grandes problemas de conservação do material a ser analisado (seco, congelado, preservado em álcool) e permite a sua manutenção por longos períodos de tempo (Hill, 1994). De notar que os ovários devem ser fixados em soluto de Carnoy e armazenados a 4°C ou -20°C para não se deteriorarem antes da análise.

A simplicidade do procedimento técnico do PCR torna este método bastante fácil de se aprender e de ser estabelecido no laboratório, apesar da necessidade de alguns instrumentos sofisticados (e.g. micropipetas e termociclador) e de reagentes moleculares, o que torna a técnica bastante mais cara que a citogenética. Hill e Crampton (1994) e Kampen et al, (1995) fazem uma análise mais pormenorizada das vantagens

e desvantagens de cada técnica, nomeadamente em termos de custo financeiro (Hill, 1994).

Os estudos citogenéticos providenciam uma informação que ultrapassa o nível taxonómico específico pela análise de polimorfismos de inversão intraespecíficos, permitindo, assim, melhor caracterizar população de mosquitos de determinada espécie e área geográfica (e. g. formas cromossómicas Forest, Savanna e Mopti de *A. gambiae* s.s.), em termos da sua importância malariológica e epidemiológica (Coluzzi et al, 1979; Coluzzi et al, 1985). Lamentavelmente o PCR ainda não permite este tipo de aplicação, pelo que esforços estão a ser desenvolvidos nesse sentido (Favia et al, 1994).

AGRADECIMENTOS

Apoio Técnico do "Istituto di Parassitologia, Univ. "La Sapienza di Roma", Itália (Prof. Mario Coluzzi).

Apoio Técnico de Luis Fonseca (citogenética), Ana Paula Arez e Maria Manuel Mota (extracção de DNA) - Centro de Malária e outras Doenças Tropicais/UNL.

Apoio logístico do Centro de Medicina Tropical/IHMT, Bissau, Guiné-Bissau.

Apoio Financeiro de PRAXIS XXI/JNICT e STD/EC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLLINS, F.; FINNERTY, V. & PETRARCA, V. (1988.I). Ribosomal DNA-probes differentiate five cryptic species in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 30: 231-240.
- COLLINS, F.; MEHAFFEY, P.; RASMUSSEN, M.; BRANDLIN-BENNETT, A.; ODERA, J. & FINNERTY, V. (1988.II). Comparaison of DNA-probe and Isoenzyme methods for differentiating *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entom.*, 25 (2): 116-120.
- COLUZZI, M. & SABATINI, A. (1968). Cytogenetic observations on species C of the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 10 (2-3): 155-165.
- COLUZZI, M.; SABATINI, A.; PETRARCA, V. & DI DECO, M. A. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 73: 483-497.
- COLUZZI, M.; PETRARCA, V. & DI DECO, M. (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.*, 52: 45-63.
- FONSECA, L.; DI DECO, M. A.; CARRARA, G.; DABÓ, I.; ROSÁRIO, V. & PETRARCA, V. (1994). The *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in the neighbourhoods of Bissau city, Guinea Bissau. *Parassitologia*, 36 (1): 59.
- FAVIA, G.; DIMOPOULOS, G.; DELLA TORRE, A.; TOURÉ, Y.; COLUZZI, M. & LOUIS, C. (1994). Polymorphisms detected by random PCR distinguish between chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10315-10319.
- FONTENILLE, D.; FAYE, O.; KONATE, L.; SY, N. & COLLINS F. (1993). Comparaison des techniques PCR et cytogenétique pour la détermination des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Sénégal. *Ann. Parasitol. Hum. Compn.* 68: (5/6): 239-240.
- GREEN, C. A. (1972). Cytological maps for the practical identification of females of the three freshwater species of the *Anopheles gambiae* complex. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 66(1): 143-147.
- HILL, S. M. & CRAMPTON, J. M. (1994). DNA-based methods for the identification of insect vectors. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88 (3): 227-250.
- HUNT, R. H. (1973). A cytological technique for the study of *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 22: 304-306.
- KAMPEN, H.; STRAIF, S.; MAIER, W. & SEITZ, H. (1995). Comparison of PCR and Cytotaxonomy in the differentiation of *Anopheles gambiae* sibling species, exemplified in mosquito specimens from Cameroon. *Appl. Parasitol.*, 36: 274-278.
- MILES, S. (1978). Enzymatic variation in the *Anopheles gambiae* Giles group of species (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 15: 297-299.
- PETRARCA, V.; CARRARA, G.; DI DECO, M. A. & PETRANGELI, G. (1983). Il complesso *Anopheles gambiae* in Guinea Bissau. *Parassitologia*, 25: 29-39.
- PETRARCA, V. & BEIER, J. C. (1992). Intraspecific chromosomal polymorphism in the *Anopheles gambiae* complex as a factor affecting malaria transmission in the Kisumu area of Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46 (2): 229-237.
- SCOTT, J.; BROGDON, W. & COLLINS, F. (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49 (4): 520-529.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1993). World Malaria Situation in 1991, Part I. *Weekly Epidemiological Record*, 68: (34): 245-252.