

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
SIMULIUM LIMBATUM E *SIMULIUM INCRUSTATUM* EM ÁREAS
DE FLORESTA TROPICAL E DE SAVANA DO ESTADO DE RORAIMA,
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

PRISCILA ANDRADE CONCEIÇÃO

Manaus 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

PRISCILA ANDRADE CONCEIÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
SIMULIUM LIMBATUM E *SIMULIUM INCRUSTATUM* EM ÁREAS
DE FLORESTA TROPICAL E DE SAVANA DO ESTADO DE
RORAIMA, AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de mestre. Linha de pesquisa: Biologia de Vetores e Agentes Infecciosos.

Orientador: Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz
Coorientador: James Lee Crainey

Manaus 2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C744c Conceição, Priscila Andrade
Caracterização da diversidade genética de *Simulium limbatum* e *Simulium incrustatum* em áreas de floresta tropical e de savana do estado de Roraima, Amazônia Brasileira. / Priscila Andrade
Conceição . 2014
45 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Sérgio Luiz Bessa Luz
Coorientador: James Lee Crainey
Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Sistemática. 2. Simulídeos. 3. Amazônia. 4. DNA Barcode. 5. Taxonomia. I. Luz, Sérgio Luiz Bessa. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, LINDOMAR e MIGUEL, que me transmitem suas orientações de vida e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me guia com sua infinita bondade e sabedoria.

Ao meu orientador Sérgio Luz, que não desistiu de mim e carinhosamente me guiou.

Ao Lee, pela ajuda e apoio em todos os momentos desse mestrado, mostrando-se como o meu colaborador mais dedicado.

À FAPEAM, pelos 12 meses de bolsa, tão aguardados.

Aos professores das disciplinas do mestrado pelos ensinamentos a mim destinados.

Aos colegas de curso e de laboratório pelos ensinamentos compartilhados. Em especial, pelos inumeros momentos felizes vividos, a Leka, Val, Mylla, Taty, Victinho, Gê e Marcelo.

Aos meus pais, por serem os responsáveis pela minha existência e criação. E pelo apoio dado durante toda a minha vida, em especial nessa fase do mestrado. Amo-os muito.

Aos meus irmãos Fábio e Luiz Miguel pelo apoio e companheirismo.

Ao Marcos, por todo amor, carinho, respeito e compreensão. E principalmente por estar ao meu lado enxugando minhas lágrimas e me incentivando a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus verdadeiros amigos, Agnes, Aline, Blenda, Bruna, Dudu, Enderson, Gê, Guta, Line, Rebeca e Rose, por quererem dedicar tempo e paciência a nossa amizade. E em especial à Leka pelo apoio.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

Epígrafe

*"Os justos herdarão a terra e nela
habitarão para sempre." (Salmo
37:29)*

RESUMO

O foco amazônico de oncocercose abrange o norte do Brasil e o sul da Venezuela. Estes são os dois países da América Latina onde a transmissão da Oncocercose ainda é relatada. A eliminação da doença na América Latina é um dos principais desafios dos estudos atuais. A área do foco é o lar de cerca de 20.000 índios Yanomamis, e é caracterizado por diferentes ecótopos de florestas tropicais e savanas. Ao menos seis espécies de simulídeos foram descritas no local do foco e incriminadas como vetoras da oncocercose. No entanto a correta identificação desses vetores nem sempre ocorre, logo, as espécies *Simulium limbatum* e *Simulium incrustatum* foram descritas no foco amazônico de oncocercose e ambas são incriminadas como vetoras de *O. volvulus*. Mesmo *S. limbatum* tendo sido descrita na área do foco amazônico, sua permanência nessas áreas é controversa, devido ao fato de que essas espécies são de difícil identificação, utilizando somente ferramentas morfológicas. Neste trabalho foi realizado o sequenciamento do gene CO1 de 15 espécimes de *S. incrustatum* e 27 espécimes de *S. limbatum*. Os espécimes consistem em fêmeas adultas, coletadas em áreas de savana e floresta, dentro e fora do foco amazônico de Oncocercose. As sequências obtidas foram analisadas filogeneticamente. Resultando em formações de grupos monofiléticos distintos com suporte estatístico, (mesmo tratando-se de espécies que coexistem em simpatria). Esses estudos confirmaram a utilidade do gene CO1 para identificação de espécies dentro do foco amazônico. A identificação de espécimes de *S. limbatum* em áreas de floresta, formando também um grupamento monofilético distinto dos outros espécimes de *S. limbatum*, forneceram evidências mais claras da presença de *S. limbatum* dentro do foco brasileiro de oncocercose. No entanto, a capacidade vetorial de *S. limbatum* dentro do foco brasileiro ainda é incerta. Os dados apresentados neste trabalho também descreveram espécimes de *S. limbatum* em áreas de savana e fora do foco amazônico, em áreas adjacentes (que representam a única população já incriminada como hospedeiros de *O. volvulus*, anteriormente), porém, esses espécimes de savana são geneticamente distintos daqueles que vivem no interior do foco. Estes resultados destacam a necessidade de uma visão mais clara da taxonomia desses vetores dentro do foco amazônico de oncocercose.

Palavras-chave: *Simulium*, *S. limbatum*, *S. incrustatum*, DNA barcoding, taxonomia, sistemática, citocromo oxidase 1 (CO1), foco amazônico, oncocercose.

ABSTRACT

The Amazonia onchocerciasis focus of southern Venezuela and northern Brazil is the larger of the two remaining Latin American onchocerciasis foci where disease transmission still occurs and is often regarded as the most challenging of all the Latin American foci to eliminate onchocerciasis. The site is home to a population of over 20,000 semi-nomadic, hunter-gatherer Yanomami people and is made-up of a mosaic of rainforest and savannah ecologies, which are influenced by the area's undulating terrain and rich geological diversity. At least six blackfly vectors have been implicated in onchocerciasis transmission in this focus; however, because of the difficulty in their routine identification the relative importance of each has been obscured. *Simulium limbatum* and *Simulium incrustatum* s.l. have both been recorded as vectors in the Amazonia focus, but they are difficult to discriminate morphologically and thus the ecological range of these species, and indeed the presence of *S. limbatum* in the Amazonia focus at all, have remained controversial. In the work described here, we report 15 *S. incrustatum* s.l. CO1 sequences and 27 *S. limbatum* sequences obtained from field-caught adult female blackflies collected from forest and savannah localities, inside and just outside the Amazonia focus. Phylogenetic analysis with the sequences generated in this study, showed that both the *S. limbatum* and the *S. incrustatum* s.l. CO1 sequences obtained (even from specimens living in sympatry) all fell into discrete species-specific bootstrap-supported monophyletic groups and thus confirmed the utility of the CO1 gene for identifying both these species inside the Amazonia focus. As the *S. limbatum* exclusive cluster included CO1 sequences obtained from forest-caught and morphologically identified specimens these results provide the clearest evidence yet of the presence of *S. limbatum* inside the Amazonia focus. The question, however, of whether *S. limbatum* is actually a vector in the focus still remains unanswered as the data presented here also suggest that *S. limbatum* found in the savannahs adjacent to, but outside the Amazonia focus (and which represent the only *S. limbatum* population to be unambiguously incriminated as a host of *Onchocerca volvulus*), are genetically distinct from those living inside the focus. These findings highlight the need for a clearer picture of the vector taxonomy inside the Amazonia onchocerciasis focus.

Keywords: *Simulium*, *S. limbatum*, *S. incrustatum*, DNA barcoding, Taxonomy, Systematics, Cytochrome oxidase 1 (CO1), Amazonia focus, Onchocerciasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Localização das áreas onde os espécimes foram coletados. As áreas cinzas claras representam ecótopos de Savana e as áreas cinza escura os ecótopos de floresta tropical. Os indicadores e caixas pretas representam a espécie *S. limbatum*, os indicadores e caixas brancas representam a espécie *S. incrustatum* e a caixa cinza representa uma área onde ambas as espécies foram coletadas.

Figura 2 Árvore de Máxima Verossimilhança à partir de sequências de CO1 com 519 pb. Indicando o nome da espécie/local de coleta/numero de acesso ao banco de dados de sequencias. As caixas sombreadas destacam os diferentes ecótopos. Os valores de suporte estatísticos estão em porcentagens, aqueles que possuem suporte <50% tanto para análises de árvores “*Neighbour joining*” quanto de Máxima Verossimilhança estão indicados com um asterisco.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Locais de coleta; coordenadas; ecótopos; nome da 30 espécie; numero de identificação das sequencias nos bancos de dados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Família Simuliidae.....	12
1.1.1. Características gerais da Família Simuliidae.....	12
1.1.2. A família Simuliidae: biologia e distribuição.....	13
1.1.3. Importância da Família Simuliidae.....	14
1.2. Oncocercose.....	16
1.2.2. Oncocercose e simuliídeos.....	18
1.3. Estudos moleculares.....	20
1.3.1. DNA mitocondrial.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. GERAL.....	25
3.2. ESPECÍFICOS.....	25
4. METODOLOGIA.....	26
4.1. Espécimes, coleta e área de estudo.....	26
4.2. Caracterização morfológica.....	27
4.3. Análises moleculares.....	28
4.3.1. Extração de DNA.....	28
4.3.2. Amplificação e purificação de DNA.....	28
4.3.3. Sequenciamento de DNA.....	29
4.4. Análises filogenéticas.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Sequências de DNA mitocondrial CO1 de Simuliídeos.....	30
5.2. CO1 como ferramenta para a identificação de vetores.....	30
5.4. Diversidade genética de <i>S. incrustatum</i>	34
6. DISCUSSÃO.....	34
6.1. Utilização de CO1 para caracterizar <i>S. incrustatum</i>	34
6.2. Confirmação de <i>S. limbatum</i> no foco Amazônico de oncocercose e a utilidade do CO1 para identificação de vetores.....	35
6.3. Potencial importância epidemiológica de <i>S. limbatum</i>	37
6.4. Novas perspectivas sobre a origem de <i>S. limbatum</i>	38
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Simuliidae

1.1.1. Características gerais da Família Simuliidae

Os simulídeos são pertencentes à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Simuliidae, conhecidos como borrachudos ou piuns, são incriminados como os principais vetores do patógeno causador da oncocercose, a *Onchocerca volvulus*, doença endêmica na região amazônica (SHELLEY *et. al.*, 1997).

Com base em registros fósseis, estima-se que esta família exista a cerca de 160 milhões de anos. Como é verdade para muitas famílias de dípteros, os indivíduos da família Simuliidae possuem estruturas isomórficas que os classifica muitas vezes como espécies-populações irmãs (CUPP, 1996).

Mundialmente a família Simuliidae contém cerca de 2.163 espécies (2.151 vivas e 12 extintas) distribuídas em 26 gêneros, o gênero *Simulium* abrange cerca de 80% do total de espécies descritas. (ADLER & CROSSKEY, 2014). Porém, do total de gêneros descritos apenas seis possuem hábitos antropofágicos – *Simulium*, *Prosimulium*, *Austrosimulium*, *Cnephia*, *Araucnephia* e *Lutzsimulium* (SERVICE, 2008).

O Brasil possui três gêneros registrados: *Araucnephia* Wygodzinsky e Coscarón (com três espécie), *Lutzsimulium* d'Andretta e d'Andretta (com quatro espécies) e *Simulium* Latreille (com 86 espécies). Dessas, quarenta e seis espécies foram registradas na Amazônia A maioria das espécies

encontradas no Brasil pertence ao gênero *Simulium*, distribuídas em oito subgêneros. (PESSOA, 2012; ADLER E CROSSKEY, 2014).

De acordo com Adler e Crosskey (2014), os subgêneros de *Simulium* registrados no Brasil são: *Aspathia* (Enderlein, 1935), *Chirostilbia* (Enderlein, 1921), *Notolepria* (Enderlein, 1930), *Psaroniocompsa* (Enderlein, 1934), *Psilopelmia* (Enderlein, 1934) e *Trichodagmia* (Enderlein, 1934).

Para o presente estudo, adotamos como referência o sistema taxonômico sugerido por Adler & Crosskey, 2014.

1.1.2. A família Simuliidae: biologia e distribuição

Os membros da família Simuliidae são pequenos insetos holometábolos, alguns apresentam características hematófagas e antropofágicas. (SERVICE, 2008). Os simulídeos possuem importância médica, veterinária e econômica, por serem transmissores de agentes patogênicos ao homem e outros animais. (ALMEIDA *et al.* 1999).

Os adultos variam de 1,2 a 6 mm. Os simulídeos possuem um ciclo de vida que compreende os quatro estágios do desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto, ou seja, são insetos holometábolos: com ciclo de desenvolvimento completo. (CUPP, 1996). Por essa razão, algumas espécies da família, apresentam características morfológicas distintas nos estágios larvais e pupais servindo como importantes parâmetros para a classificação taxonômica (CUPP, 1996).

Os adultos podem viver na natureza de três a quatro semanas. As fêmeas ovipositam em ambientes lóticos sobre pedras, galhos e folhas, encontrados em cachoeiras, rios ou córregos. Os estágios imaturos habitam ambientes com água

corrente e se aderem a substratos submersos, fazem parte da dieta de predadores, tais como, peixes, aves e outros insetos (COSCARÓN, 1991).

A família Simuliidae possui distribuição mundial, estando ausente apenas na Antártica e em alguns desertos e ilhas onde não há água corrente, condição quase que essencial para que as larvas se desenvolvam (CROSSKEY, 1990). Sua ocorrência está associada à velocidade da água e à presença de substratos, tais como raízes, folhas decíduas, pedras ou vegetação aquática (HAMADA, 1989).

1.1.3. Importância da Família Simuliidae

Essa família tem importância médica e econômica e veterinária pelo fato de várias espécies serem hematófagas, agindo como vetores em potencial, desta forma, de diferentes organismos patogênicos ao ser humano e outros animais. (SHELLEY, 1988). Os borrachudos são conhecidos, principalmente, pela ação e lesões secundárias associadas às suas picadas (SIMOM, 2000).

Os simulídeos são incriminados como os principais vetores do patógeno causador da oncocercose, a *Onchocerca volvulus* (CROSSKEY, 1990). Podem veicular também agentes patogênicos causadores de doenças, tal como a Mansonelose, causada pela filaria *Manzonella ozzardi* Manson (SHELLEY *et al.* 1997). Podem ainda agir como vetores de vírus e protozoários parasitos. (CUPP, 1996).

Algumas espécies causam prejuízos econômicos quando em alta densidade, pois atacam o rebanho e trabalhadores rurais provocando grande incômodo, resultando em redução na produtividade agropastoril. Áreas turísticas também podem ser afetadas quando espécies antropofágicas dessa família se encontram em alta densidade, tornando essas áreas inacessíveis (SHELLEY *et al.* 1997).

Os simulídeos estão diretamente envolvidos na transmissão de patógenos que acometem animais. Podem também transmitir a oncocercose bovina. Algumas espécies de vetores podem causar queda na produtividade de diversos animais. (LIBÓRIO, 2011).

De acordo com a sintomatologia, as picadas dos simulídeos ocasionam coceira intensa com a duração de vários dias e podem progredir para infecções secundárias. Existem pessoas mais sensíveis que chegam a apresentar reações alérgicas, inflamações, irritação local, dermatites e febres, causando severos danos à saúde (PEREIRA *et al.* 2012).

Os principais vetores de patógenos humanos na África são os membros dos complexos de espécies: *Simulium damnosum* e *Simulium neavei*. Os membros do complexo *S. damnosum* são responsáveis por mais de 90% dos casos de oncocercose em todo o mundo e mais de 95% dos casos na África. (CROSSKEY, 1996).

No Brasil e na Região Amazônica os simulídeos são transmissores da filaria *Onchocerca volvulus*, agente causador da oncocercose e da *Mansonella ozzardi*. O foco de oncocercose está situado na área que constitui a Reserva Indígena Yanomami, localizado à porção oeste/noroeste do Estado de Roraima e norte do Estado de Amazonas, afetando as etnias indígenas Yanomami e Maiongong com áreas hiperendêmicas (>60%), mesoendêmicas (21-59%), hipoendêmicas (0-20%) (SHELLEY *et al.* 1997). Atualmente a área do foco encontra-se sob tratamento intensivo e sua situação epidemiológica.

1.2. Oncocercose

1.2.1. Características gerais da Oncocercose

A Oncocercose, conhecida como cegueira dos rios, é uma doença tropical negligenciada e debilitante. Estima-se que cerca de 37 milhões de pessoas no mundo têm a doença e 120 milhões de pessoas vivem com o risco de serem infectadas. (CHEKE E GARMS, 2013). A doença causa, além da cegueira, uma série de problemas graves de pele, provocando sintomas como despigmentação e coceira intensa.

Em humanos, hospedeiros definitivos, os vermes adultos (macho e fêmea) vivem em nódulos. As fêmeas de *Onchocerca volvulus* produzem microfíliarias que migram ativamente no tecido subcutâneo, podendo migrar para os olhos. Quando presentes na pele humana, elas podem ser ingeridas por fêmeas de simulídeos durante o repasto sanguíneo. No vetor, essas filarias passam por duas mudas (L1 e L2) e transformam-se em larva infectante L3, que é liberada num próximo repasto sanguíneo. No hospedeiro definitivo, a filaria passa por duas mudas até se tornar verme adulto (WHO, 2003).

O primeiro caso de oncocercose no Brasil foi relatado no estado de Roraima, em uma criança de três anos de idade, filha de missionários estrangeiros (BEARZOTI *et al.* 1967). Posteriormente a forma endêmica da oncocercose foi encontrada na área Yanomami e em 28 famílias de missionários que habitavam essa região (MORAES & DIAS, 1972; MORAES & CHAVES, 1974).

Atualmente, a hipótese mais aceita para a presença de oncocercose nas Américas é que ela tenha sido introduzida através do tráfico de escravos (SÁ & MAIA-HERZOG, 2003). Entretanto, a existência dessa doença entre os Yanomamis ainda é muito discutida, principalmente devido ao isolamento desse grupo. Acredita-

se que a doença tenha seguido um caminho indireto através de focos existentes na Venezuela, visto que os indígenas nunca tiveram contato com os escravos e nem com seus descendentes (MORAES, 1991)

Nos relatórios da OMS de 2012, a oncocercose está significativamente presente na África, Península Arábica e na América Latina. Na década de 1990, estimou-se que 250 mil pessoas viviam com cegueira irreversível causada por infecções oncocercose (BRASIL, 2012). Segundo pesquisas mais recentes relatadas pelo Ministério da Saúde em 2012, não houve registros de novos casos no período entre 2000-2010. Estando assim a doença em fase de pré-eliminação.

A criação do Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEIY) pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) teve como propósito conhecer a situação epidemiológica da oncocercose. Abrange todas as regiões do território Yanomami nos estados de Amazonas e Roraima. (BRASIL, 2012)

Segundo os relatórios do Ministério da Saúde, as regiões do DSEIY, estão operacionalmente organizadas em 28 polos-base, inicialmente foram realizadas estratificações de acordo com as faixas de endemicidade, estabelecidas para a caracterização epidemiológica da oncocercose, como: hiperendêmica (faixa de > 60% de positividade), com 5 polos do território Yanomami; mesoendêmicas (faixa de 20-59%), com 7 polos; hipoendêmicas (>0-19%), 5 polos e não endêmicas (0%), 11 polos. Foram destacados como sendo os locais de maior endemicidade, as áreas mais altas da Serra do Parima (principalmente nas proximidades à fronteira com a Venezuela): regiões Yanomami de Xitei, Surucucu, Balawau, Homoxi; e outras circunjacentes: Toototobi, Arathau/Xiriana, Parafuri, Paapiu, Novo Demini, Palimiu, Alto Catrimani. (BRASIL, 2012)

1.2.2. Oncocercose e simuliídeos

Em estudos entomológicos no foco de oncocercose, dentro da Reserva Yanomami, realizados por Shelley, et.al., 1987, Shelley, et.al., 1997, Andreazze & Py-Daniel, 1999 e Medeiros & Py-Daniel, 1999 verificou-se que as espécies, *Simulium guianense*, *S. incrustatum*, *S. oyapockense*, *S. roraimense*, *S. exiguum* e *S. limbatum* foram incriminadas como vetoras da oncocercose em diversas áreas da Reserva Yanomami, tanto do lado brasileiro, quanto do lado venezuelano. Dentre estas espécies, *Simulium guianense*, foi a que apresentou maior índice de infecção natural, sendo considerado o principal vetor da oncocercose, no foco amazônico brasileiro. (BOTTO *et al.* 2011; SHELLEY *et al.* 1997).

A área Yanomami possui ampla variedade de características biogeográficas, é formada por uma mistura entre ecossistemas de floresta e savana que resultam em floras e faunas específicas (CONCEIÇÃO, 2013).

A espécie *Simulium incrustatum* Lutz, está relacionada com a transmissão da oncocercose no Brasil, sendo considerado vetor nas áreas hiperendêmicas do foco brasileiro na Amazônia e aparece como sinonímia de *Simulium yarzabali* na Venezuela onde também representa papel importante na transmissão de oncocercose. (BOTTO *et al.* 2011; SHELLEY *et al.* 1997). É uma espécie considerada antropofílica e de ampla distribuição geográfica pelo Brasil, do Sul ao Norte do país e sendo encontrado em quase toda a extensão da América do Sul (COSCARÓN 1991). Essa extensa distribuição geográfica também é representativa em toda área do foco brasileiro e assim é possível que apresente requerimentos e adaptações para diferentes condições ambientais, podendo representar um complexo de espécies crípticas. Experiências recentes com este vetor sugeriram que ele pode desempenhar um papel muito mais importante na

transmissão da oncocercose do que se pensava anteriormente (BOTTO *et al.* 2011; GRILLET *et al.* 2008), porém sua importância tem sido discutida pelas dificuldades em diferenciá-lo de *S. limbatum*.

A espécie *Simulium limbatum* está classificada taxonomicamente dentro do subgênero *Psaroniocompsa* no subgrupo *Incrustatum* (ADLER & CROSSKEY, 2014), estudos epidemiológicos venezuelanos incriminam *Simulium limbatum* como vetor secundário de patógenos na Venezuela. (BASAÑEZ *et al.* 1988). No Brasil o potencial vetorial do *S. limbatum* não foi confirmado, tendo sua capacidade epidemiológica testada em infecção experimental (SHELLEY *et al.* 1987, 2010).

Acreditava-se que a distribuição de *S. limbatum* no estado de Roraima estava restrita em áreas de savana (SHELLEY *et al.* 1997). A recente descoberta da presença da espécie na região endêmica do foco brasileiro de oncocercose, na região de Xitei (floresta) levanta a hipótese de que essa espécie pode agir também como vetor de patógenos na porção brasileira do foco de oncocercose. Igualmente a isso, nas análises moleculares pode se observar a diferenciação das espécies de *S. limbatum* em dois “clusters” um para ambiente da floresta e outro para savana (CONCEIÇÃO, 2011).

Devido às similaridades morfológicas *S. incrustatum* e *S. limbatum* vêm sendo descritas como “*S. incrustatum* ou *S. limbatum*” (VIVAS-MARTINEZ *et al.* 1998), “*S. incrustatum/S. limbatum*” (BASAÑEZ *et al.* 1988) e “*S. incrustatum*” (GRILLET *et al.* 2008). Logo, questões sobre a distribuição e dinâmicas de transmissão da oncocercose no foco amazônico, por esses vetores, continuam existindo. E a capacidade vetorial de *S. limbatum* in vivo ainda não foi confirmada (SHELLEY *et al.* 1987,2010).

1.3. Estudos moleculares

Até meados dos anos 60, o estudo da diversidade dos organismos vivos dependia exclusivamente da análise de polimorfismos fenotípicos. Porém, a capacidade de geração de bons resultados está limitada pela relativa raridade das variantes fenotípicas, que são, além disso, de difícil quantificação (BEHURA, 2006). A aplicação de técnicas de caracterização molecular começou com o estudo de variantes proteicas (em particular isoenzimas), e se desenvolveu de forma extraordinária quando, a partir de 1980, foi possível detectar diretamente a variabilidade genética nas moléculas de DNA. O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite obter *in vitro* múltiplas cópias de um determinado segmento de DNA, abriu definitivamente a possibilidade de estudar os polimorfismos genéticos de forma eficiente e, portanto, em larga escala. (FRANCO *et al.* 2006)

Em estudos com simulídeos, muitas técnicas e genes já foram utilizados e descritos. A iniciativa DNA barcoding, utilizando o gene CO1, se mostrou um método confiável, onde semelhanças gênicas e taxas de evolução foram utilizadas para resolver problemas relacionados à taxonomia desses dípteros. (DAY *et al.* 2008, 2010; HERNÁNDEZ-TRIANA *et al.* 2012).

1.3.1. DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas presentes nas células eucariontes que têm como principal função o fornecimento de energia para as células. O genoma mitocondrial é uma molécula circular de DNA (DNAm_t) de fita dupla contendo 37 genes, dois dos quais codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam proteínas envolvidas na respiração celular (SIMON *et al.* 1994). Esta molécula está presente em múltiplas cópias (102-104) por

célula (idênticas para cada organismo individual na imensa maioria dos casos), é haploide (adquirida por herança materna), praticamente não sofre recombinação e apresenta taxas de evolução (acúmulo de mutações ao longo do tempo) mais altas do que o genoma nuclear (SACCONI *et al.* 2000; HAAG-LIAUTARD *et al.* 2008).

Desde 1980, DNA mitocondrial (mtDNA) vem sendo amplamente utilizado como uma ferramenta poderosa para estudos de animais. Através de estudos filogenéticos de DNA mitocondrial, três de suas características foram incriminadas como pontos-chaves para sua utilização, são elas: apresenta diferenciações genéticas de espécies para espécies, essencial para a caracterização molecular de diferentes espécies; conservação das suas regiões e organização das informações genéticas. (CASTRO, 2002)

Igualmente a isso, a diversidade genética, as relações filogenéticas entre espécies e entre populações geográficas, a filogeografia de diferentes linhagens e os efeitos de fenômenos demográficos na composição genética das populações estão entre os aspectos que podem ser estudados usando marcadores mitocondriais (SIMON *et al.* 1994).

Diferentes genes do DNAm têm sido extensivamente utilizados como marcadores moleculares em estudos sobre genética de populações de insetos (SIMON *et al.* 1994).

Um dos primeiros estudos envolvendo DNA mitocondrial e simúldeos, foram realizados experimentos com espécimes do complexo *Simulium damnosum*, utilizando o gene da sub-região 4 que codifica o NADHdesidrogenase - ND4, o objetivo era buscar a identificação molecular e as relações filogenéticas (TANG *et al.* 1995). Outra região do DNA mitocondrial, o gene cytochrome oxidase II – CO2, foi sequenciando completamente para analisar populações de espécies de simúldeos

norte americanos e estabelecer as relações filogenéticas com outros dípteros (PRUESS *et al.* 2000).

A utilização do gene mitocondrial cytochrome oxidase I – CO1 foi sugerida como base para a criação de um sistema global de identificação de espécies, sobretudo em animais. Esse sistema chamado *DNA Barcode of Life*, *DNA Barcoding* ou Código de Barras da Vida conquistou muita atenção da comunidade científica para uma ampla utilização desse gene (HEBERT *et al.* 2003).

Seguindo essa metodologia, diversos estudos de identificação e verificação de espécies foram testados por diferentes grupos trabalhando em diferentes áreas do Mundo. A utilização do gene mitocondrial cytochrome oxidase I – CO1 também foi utilizada para confirmação de espécies inglesas que apresentavam variações morfológicas em suas formas larvais (DAY *et al.* 2008). Identificação molecular de espécies neárticas (RIVERA & CURRIE, 2009) e de espécies da Europa (ILMONEN *et al.* 2009).

No Brasil, o CO1 demonstrou sua utilidade na descrição da variabilidade em diferentes populações de *Simulium guianense* principal vetor de oncocercose no Brasil (MATTOS, 2008), na descrição de uma espécie nova (HAMADA *et al.* 2010) e no estudo das relações evolutivas de diferentes populações de *Simulium guianense* (HERNÁNDEZ-TRIANA *et al.* 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Diversos vetores transmissores de patógenos ao homem apresentam também diferentes padrões epidemiológicos (SHELLEY, 2002).

O fator distribuição geográfica pode impor requerimentos e adaptações para diferentes condições ambientais, podendo representar um complexo de espécies crípticas inclusive com importância para a estratificação epidemiológica da oncocercose como ocorre no continente africano no complexo *S. damnosum*. Os estudos científicos no complexo *S. damnosum* são exemplos de como os processos de especiação agem ao longo da evolução. (ADLER & POST, 2010).

No Brasil estudos sobre simúldeos utilizando abordagem molecular, buscando entender processos de especiação, são escassos. A espécie *Simulium incrustatum* com sua ampla distribuição pelo Brasil, pode apresentar requerimentos e adaptações para diferentes condições ambientais, podendo representar um complexo de espécies crípticas.

O *Simulium limbatum* é incriminado como vetor da oncocercose na Venezuela. Em áreas de fronteira com o Brasil, com biomas de floresta, não havia sido encontrado. No lado brasileiro, acreditava-se que estava restrito as áreas de savana. No Brasil, a capacidade vetorial do *S. limbatum* foi testada, para verificar seu potencial de infecção, teste ao qual respondeu de forma positiva. Entretanto verificou-se que utilizando DNA mitocondrial CO1 identificaram a presença em áreas do foco brasileiro próximo a fronteira com a Venezuela na Serra Parima em malocas do Polo Base de Xitei (Xitei, Parimaú, Ketta), Haxiú (Haxiú) e de Parafuri (Parafuri). Inclusive em simpatria na área de Parafuri. (CONCEIÇÃO *et al.* 2013)

Com esse cenário, se destaca uma importante questão em referência a importância médica onde um dos principais requerimentos é a correta identificação

do vetor. *Simulium limbatum* é mais uma espécie vetora na área? Ferramentas moleculares auxiliam nessa identificação de modo conclusivo?

Nos programas de controle da oncocercose, os simulídeos são coletados para verificação de sua capacidade de infecção, para poder avaliar a efetividade do tratamento utilizado. Os simulídeos são coletados durante três dias seguidos por doze horas consecutivas. As coletas são realizadas utilizando tubos plásticos com etanol absoluto separados por hora. Após as coletas os laboratórios que realizam a análise identificam o material através do padrão do escudo para formação de pools e teste através de técnicas moleculares (PCR). Essa identificação é realizada em placas de petri onde o inseto está submerso em etanol o que distorce a imagem do padrão dos escudos e também dificulta a utilização da iluminação na correta posição para identificação.

Outro fator relevante é que o material proveniente dessas localidades apresenta alta densidade de insetos (milhares) e dessa forma levar a cabo a identificação individual torna inviável a realização do teste com a presteza e o tempo ideal para fornecimento das informações para o programa de controle.

Desse modo, muito provavelmente *S. limbatum* pode estar envolvido na transmissão e inclusive presente em outras áreas no foco brasileiro ainda não amostradas.

No estudo de CONCEIÇÃO *et al.* 2013, utilizando marcadores moleculares, além de identificar a presença de *S. limbatum* nas áreas do foco, foi possível através das análises das sequências identificar que entre as amostras utilizadas houve um agrupamento das populações da área do foco no ambiente de floresta e outro agrupamento da população fora da área do foco no ambiente de savana. Assim, uma nova questão é colocada: qual a estrutura populacional da espécie nas áreas de interseção entre floresta e savana?

Assim, no nosso estudo propomos utilizar populações de diferentes áreas amostradas e utilizar abordagem molecular para estimar a variabilidade genética populacional e a análise dos padrões de semelhança/diferença de fragmentos genômicas entre populações geográficas.

A análise da variabilidade genética em populações naturais de vetores pode contribuir, finalmente, à compreensão de fenômenos diretamente relacionados com aspectos epidemiológicos fundamentais. Por exemplo, diferenças genéticas interpopulacionais podem ser responsáveis por diferenças na capacidade e na competência vetorial ou na susceptibilidade do vetor aos agentes infecciosos ou aos inseticidas.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Caracterizar geneticamente diferentes populações de *Simulium incrustatum* e *Simulium limbatum*, dentro e fora do foco amazônico de Oncocercose.

3.2. ESPECÍFICOS

- Gerar sequências de *Simulium incrustatum* e *Simulium limbatum* utilizando o fragmento CO1 mitocondrial.
- Descrever os padrões de semelhança/diferença de entre populações geográficas de *Simulium incrustatum* e *Simulium limbatum*.
- Identificar as relações intra e interespecíficas através de estudos do padrão das sequências.
- Verificar as relações entre as diferentes populações geográficas por meio de estudos filogenéticos e filogeográficos;

4. METODOLOGIA

4.1. Espécimes, coleta e área de estudo

Os simuliídeos utilizados no estudo são exemplares adultos coletados em tubos com álcool 100%. Os exemplares de *Simulium incrustatum* foram coletados e doados por técnicos da FUNASA durante trabalho de campo nas áreas do foco de oncocercose, na reserva indígena Yanomami e os exemplares de *Simulium limbatum* coletados por técnicos da FIOCRUZ em áreas no município de Boa Vista no estado de Roraima.

Na área do foco foram coletados em três polos base: Xitei (área hiperendêmica), Haxiú (área hiperendêmica) e Parafuri (área mesoendêmica). Na área do polo base de Xitei foram coletadas nas aldeias de Xitei/Xitei, Parimaú e Ketta. Nas áreas do município de Boa Vista foram coletados no Igarapé Au Au, Igarapé Murupú e Igarapé Carrapato. Trabalhamos com um mínimo de cinco exemplares de cada localidade e máximo de quinze indivíduos (Figura 1).

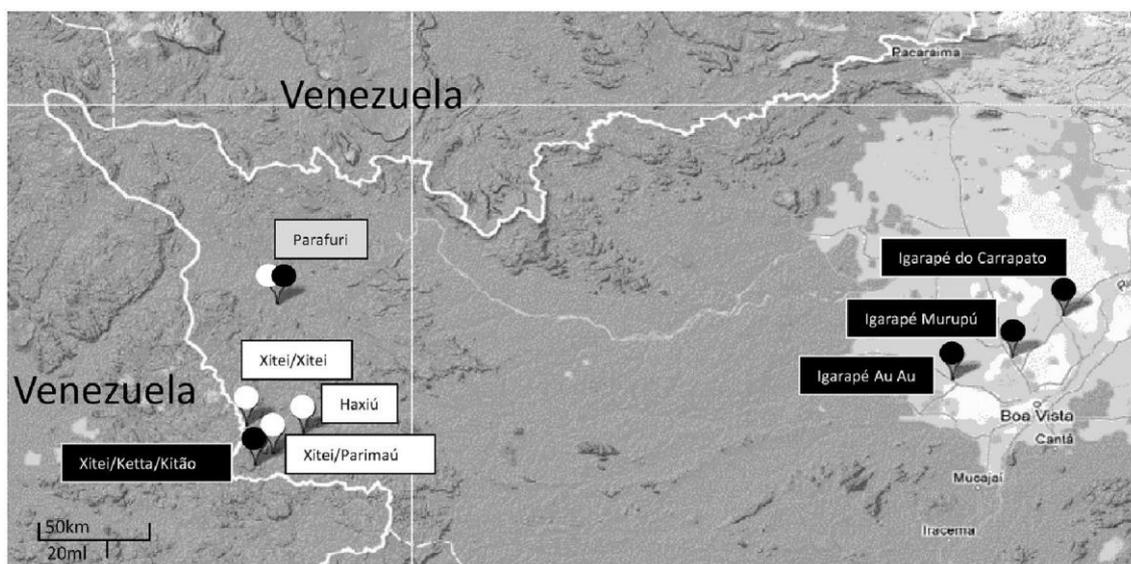


Figura 1 – Localização das áreas onde os espécimes foram coletados. As áreas cinza-claros representam ecótopos de Savana e as áreas cinza-escuro os ecótopos de floresta. Os indicadores e caixas pretas representam a espécie *S. limbatum*, os indicadores e caixas brancas representam a espécie *S. incrustatum* e a caixa cinza representa uma área onde ambas as espécies foram coletadas.

Tabela 1 – Locais de coleta; coordenadas; ecótopos; nome da espécie; numero de identificação das sequencias nos bancos de dados.

Collection site	Site co-ordinates	Ecology	Species	Sequence accession
Igarapé do Carrapato, Boa Vista – Roraima	2°58'39,46" N - 60°42'42,16" W	Savannah	<i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i>	HF9484456 HF9484454iii HF9484455i HF9484455ii HF9484455iii HF9484455iv HF9484455v HF9484455vii HF9484455x
Igarapé Murupú, Boa Vista – Roraima	3°1'11,06" N - 60°46'34,96" W	Savannah	<i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i>	HF9484454ii HF9484454iv HF9484455vi HF9484455viii HF9484455vii
Igarapé Au Au Boa Vista – Roraima	2°56'24,48" N - 61°3'2,71" W	Savannah	<i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i>	HF9484454i HF9484453i HF9484453ii HF9484453iii HF9484453iv HF9484453v HF9484453vi HF9484453vii
Xitei/Ketta/Kitão, Boa Vista – Roraima	2°31'42,9N - 63°55'92" W	Forest	<i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i>	HF9484449 HF9484451 HF9484448 HF9484450
Xitei/Xitei, Boa Vista – Roraima	2°36'428 N - 63°52'411" W	Forest	<i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i>	HF9484445iii HF9484456viii
Xitei/Parimaú, Boa Vista – Roraima	2°35'0,89N - 63°52'6,01" W	Forest	<i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i>	HF9484446iii HF9484446v HF9484447i HF9484447ii HF9484445ii
Haxiú, Boa Vista – Roraima	2°40'26,38" N - 63°44'7,65" W	Forest	<i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i>	HF9484446iv HF9484446vi HF9484446vii HF9484447iii HF9484445i
Parafuri, Boa Vista – Roraima	3°17'0,96" N- 63°50'52,98" W	Forest	<i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum Incrustatum</i> <i>Stmultum lmbatum</i>	HF9484446i HF9484446ii HF9484447iv HF9484452

4.2. Caracterização morfológica

Os espécimes adultos foram triados e identificados em uma placa de petri com álcool utilizando o padrão de escudo como referência seguindo a descrição de SHELLEY *et al.* (1997). Foram retirados os três pares de patas de cada exemplar e preservados para a etapa molecular. Os respectivos adultos foram separados individualmente em tubos com álcool 70% para posterior montagem em alfinetes entomológicos como materiais testemunhos para morfologia e depósito na Coleção de Trabalho da FIOCRUZ Amazônia.

4.3. Análises moleculares

4.3.1. Extração de DNA

O material preservado para as análises moleculares são as patas dos simúlídeos, retiradas cautelosamente com o auxílio de estiletos e pinças entomológicas. O material foi macerado com o auxílio de pistilos autoclavados e levados à extração de DNA, utilizando o kit de extração “DNeasy Blood and Tissue - Qiagen®”.

4.3.2. Amplificação e purificação de DNA

A amplificação do gene CO1 foi realizada utilizando os padrões de DNA barcoding com primers desenvolvidos por Folmer *et al.* (1994).

Os primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), os fragmentos amplificados tiveram cerca de 680 pares de bases. A reação de amplificação foi realizada seguindo as seguintes concentrações: tampão da reação [1X], MgCl₂ [2 mm], dNTPs [0.2mM], par de primers LCO1490 e HCO 2198 [0,4 µM] cada um, Taq DNA polimerase recombinante [5U/µL], 5 µL do extrato de DNA e H₂O ultrapura completando o volume final de 50 µL. As condições da reação foram: 2' iniciais à 94 °C, seguido 35 ciclos de 30" à 94 ° C, 30" à 49°C, 2' à 72 ° C e finalizando com 10' a 72 ° C e 4' ∞.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose as bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta. Os fragmentos foram purificados através das bandas cortadas do gel de agarose, utilizando o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” da Promega®.

4.3.3. Sequenciamento de DNA

As sequências foram obtidas através do sequenciador automatizado ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), utilizando kit para sequenciamento BigDye® v3.1. O protocolo do sequenciamento está disponível em: http://www.dnabarcoding.ca/CCDB_DOCS/CCDB_Sequencing.pdf.

Foi realizada a quantificação dos produtos de PCR por densidade óptica, utilizando um analisador de DNA ABI 3130 genético da Fundação de Dermatologia e Venereologia, Alfredo da Matta, Manaus (Amazonas).

4.4. Análises filogenéticas

As sequências consenso foram analisadas a partir correspondência entre as sequências senso e consenso do gene CO1 e, em seguida, foram alinhadas e editados usando software de bioinformática em metodologia padronizada (Crainey, *et al.* 2009, Crainey, *et al.* 2010). Pesquisas de “blasts” foram realizadas para assegurar que todas as sequências obtidas eram do gene CO1.

A construção de sequências consenso foi realizada a partir dos eletroferogramas em duplo sentido, e o alinhamento das mesmas através dos programas Lasergene SeqMan v7.0.0 (DnaStar2006) e BioEdit, respectivamente. As sequências foram agrupadas para realizar análises filogenéticas baseadas em distâncias genéticas utilizando o programa (TAMURA *et al.* 2011) e produzindo-se diagramas baseados em MaximumLikelihood. As sequências foram depositadas nas bases públicas de dados moleculares (GeneBank e EMBL).

5. RESULTADOS

5.1. Sequências de DNA mitocondrial CO1 de Simulídeos

As sequências de DNA foram obtidas utilizando o fragmento de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase 1. Um total de 42 espécimes capturados em oito localidades diferentes (Tabela 1). As coletas foram realizadas em dois ecossistemas diferentes, sendo 05 pontos de coletas classificados como floresta tropical e 03 foram classificados como savana (Figura 1 e Tabela 1). Os espécimes foram identificados morfologicamente como sendo 15 da espécie *S. incrustatum* e 27 *S. limbatum*.

Foi extraído o DNA, sequências senso e antisenso, dos 42 espécimes utilizando o fragmento de gene mitocondrial CO1. As sequências consenso foram depositadas nos bancos de dados moleculares do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL) e do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI); as sequências foram atribuídos os seguintes números de acesso: HF948445-HF948456.

5.2. CO1 como ferramenta para a identificação de vetores

O gene Citocromo Oxidase 1 (CO1) mostrou ser uma excelente ferramenta para a identificação de simulídeos. As sequências consenso obtidas, comparadas com DNA mitocondrial de outros invertebrados, confirmou a especificidade das sequências. Portanto, torna-se pouco provável que derivem de pseudogenes de origem mitocondriais ou nucleares. Todas as sequências foram obtidas, a partir de amostras de DNA alvo de simulídeos para uma análise mais detalhada.

Em análise preliminar, as 42 sequências geradas neste estudo foram alinhadas a um conjunto de 872 sequências únicas de CO1, derivadas de uma grande variedade de espécies de simulídeos. As 914 sequências analisadas tiveram

um corte em 519 nucleotídeos. As análises de todas essas sequências juntas, utilizando “*Neighbour joining*”, mostrou que os 42 espécimes do trabalho se reúnem em um único grupo monofilético.

A árvore de máxima verossimilhança (figura 2), mostra que no grupo monofilético há uma aparente subdivisão em dois grupos irmãos, que coincidem com as espécies identificadas morfológicamente, um grupo monofilético da espécie *S. incrustatum* com os 15 espécimes da área de floresta e outro grupo também monofilético com 27 espécimes de *S. limbatum*, sendo 5 da área de floresta e 22 de savana.

5.3. Diversidade genética de *S. limbatum* de diferentes ecótopos

Apenas utilizando identificação morfológica, verificando os padrões, não foi possível diferenciar a origem dos 27 espécimes de *S. limbatum* coletados para esse estudo. O sequenciamento de DNA utilizando o fragmento CO1 mostrou diferença evidente entre os espécimes coletados da área de floresta e aqueles coletados na savana.

Os espécimes de *S. limbatum* foram coletados em três diferentes áreas de savana (tabela 1). Estudos moleculares os agruparam em um mesmo grupo monofilético, porém o agrupamento destas sequências suporta a existência de espécimes de ecótopos diferentes ou de uma subespécie.

A existência de tal subgrupo é apoiada pela variação de nucleotídeos, variação essa encontrada até mesmo em amostras de um mesmo local. O que sugere uma relação mais antiga, por tempo suficiente, por apresentar diferenças nas ordens de nucleotídeos nas sequências. Entre os 22 espécimes de *S. limbatum* estudados, de ecótopo de savana, observou-se variação em apenas quatro posições de nucleotídeos dos 519 sequenciados. Todos esses polimorfismos de nucleotídeos

únicos (SNPs). Observou-se também que essa variação ocorre em 3 de cada 4 espécimes analisadas, o que sugere que os espécimes de *S. limbatum* coletados, nesse ecótopo de savana, sejam de origem mais antiga em relação aos de floresta tropical.

Os espécimes de *S. limbatum* coletados na floresta, no entanto, mostram níveis muito mais altos de diversidade, em relação aos espécimes coletados na savana, o que sugere uma origem ainda mais antiga e indicando, assim, que os indivíduos do ecótopo de savana podem ter evoluído de um ancestral da floresta. Nenhuma das cinco sequências de CO1, obtidas a partir de *S. limbatum* coletados em ecótopos de floresta, foram idênticas. As variações foram de até 13 posições de nucleotídeos (0,19-2,5%) dos 519 sequenciados.

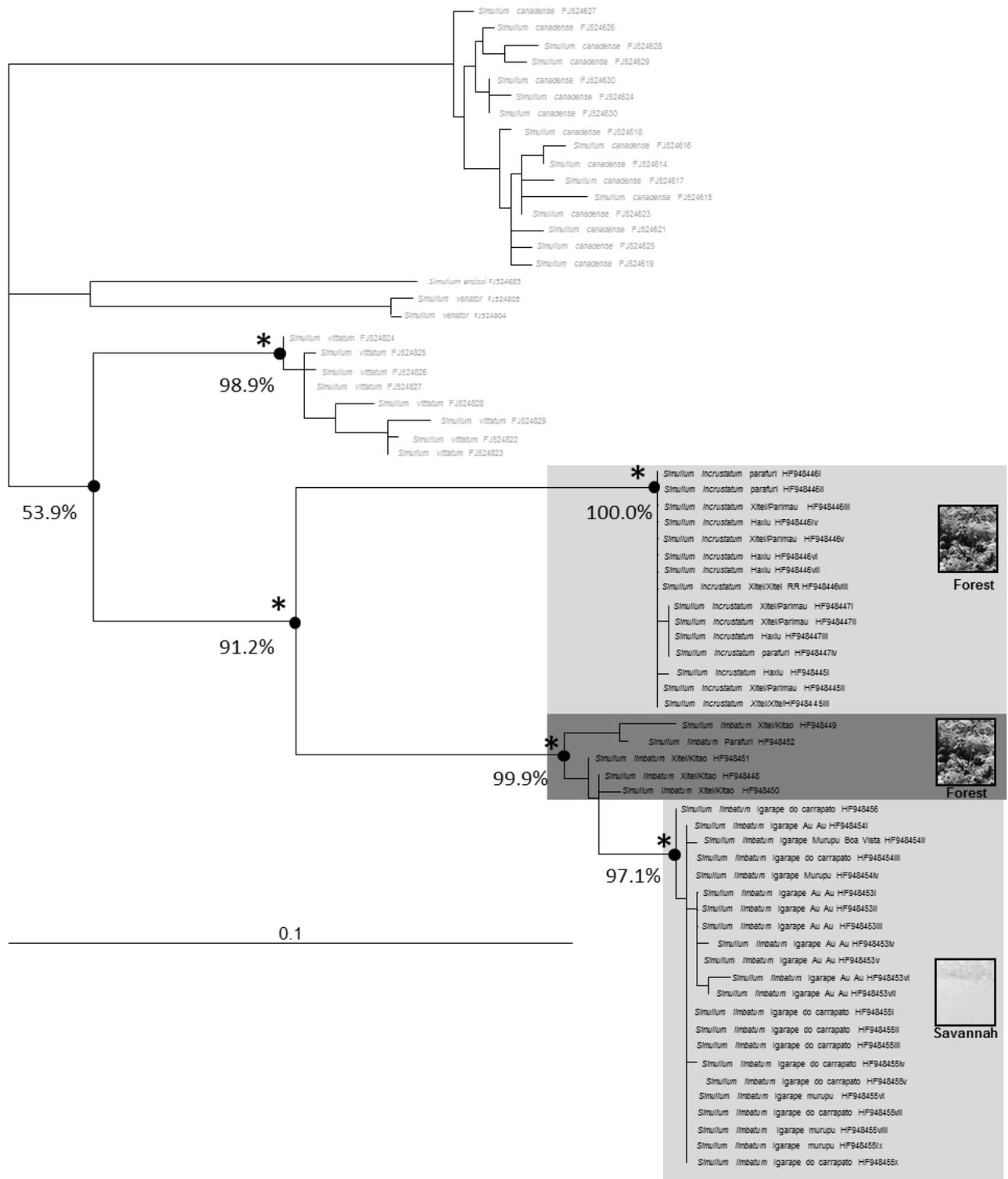


Figura 2 Árvore de Máxima Verossimilhança a partir de sequências de CO1 com 519 pb. Indicando o nome da espécie/local de coleta/numero de acesso ao banco de dados de sequencias. As caixas sombreadas destacam os diferentes ecótopos. Os valores de suporte genéticos estão em porcentagens, aqueles que possuem suporte <50% tanto para análises de árvores “Neighbour joining” quanto de Máxima Verossimilhança estão indicados com um asterisco.

5.4. Diversidade genética de *S. incrustatum*

As sequências obtidas dos espécimes de *S. incrustatum* apresentaram níveis de variação genética muito mais baixos que os espécimes de *S. limbatum* (Figura 2). Dos 15 espécimes de *S. incrustatum* foram encontradas variações nas posições de apenas 2 nucleotídeos (sendo uma mudança em um aminoácido conservador). As sequências de *S. incrustatum* variaram menos de 0,39%. Estes resultados sugerem assim que a espécie *S. incrustatum* passou pelo processo de especiação mais recentemente do que a espécie *S. limbatum*.

6. DISCUSSÃO

6.1. Utilização de CO1 para caracterizar *S. incrustatum*

Não houve clara distinção entre as sequências de CO1 das amostras coletadas de *S. incrustatum*, mesmo que estas tenham sido coletadas em diferentes áreas florestais. As sequências de CO1 coincidiram com as espécies identificadas anteriormente por métodos morfológicos. Foi apresentado o padrão do gênero *Simulium* como previsto.

As sequências analisadas não forneceram suporte para provar a existência de *S. incrustatum* em áreas de savana. Nos últimos anos vários estudos vêm sendo realizados, utilizando DNA mitocondrial associado a análises morfológicas o *DNA Barcoding of Life* (HEBERT *et al.* 2003), estudos como esses podem auxiliar no entendimento da dispersão geográfica desses potenciais vetores de oncocercose.

6.2. Confirmação de *S. limbatum* no foco Amazônico de oncocercose e a utilidade do CO1 para identificação de vetores.

As sequências obtidas dos espécimes de *S. limbatum* e *S. incrustatum* após análises filogenéticas obtiveram suporte através da formação de grupos monofiléticos, o que apoiou o *status* de espécie dos espécimes analisados. Estudos indicam a utilização de DNA mitocondrial, mais especificamente o fragmento CO1, como sendo uma importante ferramenta para o estudo de vetores invertebrados. Como o demonstrado nos estudos de simuliídeos do subgênero *Trichodagmia* com diversidade nucleotídica de cerca de 10% (HERNÁNDEZ-TRIANA *et al.* 2012), também utilizado para resolver problemas interespecíficos das espécies da família Simuliidae (DAY *et al.* 2008; HAMADA *et al.* 2010; ILMONEN *et al.* 2009). Estes estudos suportam utilização do CO1 do *DNA barcoding* para esse estudo com espécimes de *S. incrustatum* e *S. limbatum* relacionando-as com suas áreas de distribuição geográfica, assim como apoiam a utilização de CO1 para estudos com outros vetores do foco amazônico de oncocercose.

O estudo utilizando CO1 também é suportado pelo fato de os espécimes utilizados no trabalho terem sido coletados em locais onde as espécies de simuliídeos vivem em simpatria (Figura 2), locais onde a distinção clara e precisa utilizando metodologias filogenéticas mostrou que as espécies não sofreram isolamento geográfico, não havendo assim nenhuma introgressão entre as espécies.

Para enriquecimento do estudo são necessárias futuras inclusões de espécimes de outras áreas como as de transição entre ecótopos, para que possa ser realizada a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Semelhante estudo foi desenvolvido para a identificação e controle dos membros do complexo *Anopheles gambiae* (MWANGANGI *et al.* 2013; SCOTT *et al.* 1993). Mesmo sem a amostragem de todas as áreas acima descritas, as sequências desse trabalho

podem, ainda assim, fornecer grande ajuda para a identificação e incriminação de vetores.

As sequências de *S. incrustam* e *S. limbatum* utilizadas no trabalho, foram depositadas nos bancos de dados públicos, e servirão como ferramenta para auxiliar na identificação de vetores amazônicos. Um exemplo de como essa nova técnica poderia ser empregada com impacto imediato, no monitoramento de vetores é: enquanto a maioria dos trabalhos descreve *S. incrustatum* somente em áreas florestais, um relatório realizado pelo laboratório de referência brasileiro (Laboratório de Simulídeos e Oncocercose), relatou a presença de *S. incrustatum* em áreas de savana (Igarapé Murupu, perto de Boa Vista) (MARCHON-SILVA *et al.* 2007), entretanto estudos anteriores afirmam a exclusiva presença de *S. limbatum* nessas mesmas áreas (SHELLEY *et al.* 1997). Se esta discrepância está relacionada a erros de identificação ou a deslocamento de fauna, não está claro, o que podemos afirmar é que há uma necessidade de utilização de ferramentas confiáveis para a identificação desses vetores como o CO1.

Os principais pontos do trabalho é que as sequências obtidas podem ajudar (no futuro) a produzir uma imagem mais clara da distribuição de *S. incrustatum* nas áreas do foco amazônico de oncocercose e a certificar *S. limbatum* como espécie vetora. Embora tenha havido registros de infecções por *S. limbatum* no lado venezuelano do foco. (BASANEZ *et al.*..., 1988). Portanto dúvidas existem quanto a descrição correta desses simulídeos. (SHELLEY *et al.* 1997, 2010).

Os estudos moleculares pioneiros com *S. limbatum* foram realizados em regiões de savana do estado de Roraima, onde o status de espécie foi confirmado (SHELLEY *et al.* 1997). Somente parte dos materiais de *S. limbatum* utilizados neste estudo vieram destas áreas, porem todos foram comparados com as sequências de referência dos bancos de dados.

Devido ao fato de as amostras terem vindo de numerosas coleções (tabela 1), estes resultados com valores suportados geneticamente sugerem o CO1 da iniciativa *DNA barcode* como uma boa ferramenta para distinguir espécies por distâncias genéticas, com dados substanciais entre dois ou mais grupos com diferenças menores que 10% de nucleotídeos. Os resultados também sugerem a utilidade do gene CO1 para a identificação de outros vetores da oncocercose do foco Amazônico.

6.3. Potencial importância epidemiológica de *S. limbatum*

Os agrupamentos dos espécimes de *S. limbatum* na árvore de Máxima verossimilhança (Figura 2) distribuiu os indivíduos em dois grupos representados por diferentes ecótopos. A presença de *S. limbatum* em áreas de floresta necessita de uma maior amostragem de espécimes para determinarmos se tratasse de uma subespécie ou simplesmente um grupamento de espécie isolados geograficamente no ecótopo de floresta. Esse assunto levanta a hipótese da incriminação de *S. limbatum* como hospedeiro de oncocercose (SHELLEY *et al.* 1987). As análises moleculares apresentadas no trabalho podem ser utilizadas para solucionar o *status* vetorial desta espécie. Evidências sugerem que *S. limbatum* já se apresentou como vetor de *O. volvulus* na porção venezuelana do foco amazônico de oncocercose (BASANEZ *et al.* 1988), mas isto requer confirmação.

A identificação precisa das espécies vem desempenhando papel fundamental na compreensão da epidemiologia e controle da oncocercose na África (GARMS *et al.* 2009; TRAORÉ *et al.* 2009), deste modo a identificação precisa desses vetores no foco amazônico podem viabilizar esses benefícios.

6.4. Novas perspectivas sobre a origem de *S. limbatum*

As sequências CO1 utilizadas nesse estudo são de origem de DNA mitocondrial, portanto podem sofrer alterações quando parasitas como *Wolbachia* são encontrados nestes simúlideos (CRAINEY *et al.* 2010), porém não há, até o momento, nenhuma evidência de que as diversidades nas sequências de *S. limbatum* tenham sido afetadas desta maneira. Logo os maiores níveis de diversidade genética foram encontrados nos poucos espécimes de *S. limbatum* encontrados do ecótopo de floresta. O que sugere a hipótese de que *S. limbatum* tenha evoluído dos ecossistemas de floresta para a savana. Obviamente, para a afirmação dessa hipótese, se faz necessário o estudo de novas e maiores amostragens de espécimes de todas as áreas geográficas ao qual *S. limbatum* habita, incluindo áreas de transição entre ecótopos, para estudos de DNA mitocondrial e também DNA nuclear.

7. CONCLUSÕES

- A utilização do gene CO1 do *DNA barcoding* mostrou ser confiável para estudos com espécimes de *S. incrustatum* e *S. limbatum* relacionando-os com suas áreas de distribuição geográfica;
- Estudos moleculares permitem a correta identificação de vetores o que auxilia nos estudos epidemiológicos e evolutivos dos simulídeos de forma rápida e precisa;
- Os estudos deste trabalho, de modo geral, apoiam a utilização de CO1 para estudos com outros vetores do foco amazônico de oncocercose.

8. REFERÊNCIAS

ADLER, P. H; CROSSKEY, R. W. World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. The National History Museum. Londres, 2014.

ADLER P.H.; POST R.J. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infect Genet Evol.* v. 10(7): 846-65.2010.

ALMEIDA, H. T; PY-DANIEL, V; TÔRRES, A. V. S. Simuliidae (Diptera; Culicomorpha) no nordeste Brasileiro. *Entomologia y Vectores*, 6 (4): 323-337. 1999.

ANDREAZZE, R; PY-DANIEL, V. Atividade hematófaga mensal e infecção natural de *Psaroniocompsa incrustata* (Lutz, 1910) (Diptera, Culicomorpha, Simuliidae) vetor de *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) em Xitei/Xidea, área indígena yanomami, Roraima, Brasil. *Entomologia y Vectores* 6 (4): 415-440. 1999.

BASAÑEZ, M. G; YARZABAL, L; SUZUKI, H; NODA, S; TADA, I. The vectoral role of several blackfly species (Diptera: Simuliidae) in relation to human onchocerciasis in the Sierra Parima and Upper Orinoco regions of Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 82 (6): 597-611. 1988.

BEHURA, S. K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*.15: 3087-3113.2006

BEARZOTI P; LANE E; MENEZES J. Relato de um caso de oncocercose adquirida no Brasil. *Revista Paulista de Medicina* 70:102. São Paulo, 1967.

BOTTO, C.; VILAMIZAR, N.J.; JOCIK, Z.; CORTEZ, J.; ESCAKONA, M.; GRILLET, M.E.; BASANEZ, M.G. Landscape epidemiology of human Onchocerciasis in Southern Venezuela. *Encyclopaedia of Environmental Health*. Elsevier, Oxford, pp. 366–379. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. *Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015* / (Série C. Projetos, Programas e Relatórios). Brasília, ISBN 978-85-334-1934-6, 100 p. 2012

CASTRO, L.R; AUSTIN, A.D; DOWTON, M. Contrasting rates of mitochondrial molecular evolution in parasitic Diptera and Hymenoptera. *Mol Biol Evol* 19:1100-1113. 2002.

CHEKE, R. A.; GARMS, R. Indices of onchocerciasis transmission by different members of the *Simulium damnosum* complex conflict with the paradigm of forest and savanna parasite strains. *Acta Trop.* 2013 Jan; 125(1): 43-52. 2013

CONCEIÇÃO, P. A; ALMEIDA, T. A. P; LUZ, S. L. B. DNA *barcoding* de *Simulium incrustatum* vetor de *Onchocerca volvulus* em área hiperendêmica no foco Amazônico. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia. São Paulo. Anais do XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA. v. 2. p.1. 2011.

CONCEIÇÃO, P. A; CRAINEY, J. L; ALMEIDA, T. A. P; SHELLEY, A. J; LUZ, S. L. B. New molecular identifiers for *Simulium limbatum* and *S. incrustatum* s.l. and the detection of genetic substructure with potential implications for onchocerciasis epidemiology in the Amazonia focus of Brazil. *Acta tropica.* 127(2): 118-25. 2013.

COSCARÓN, S. Fauna de água dulce de la República Argentina. *Insecta, Diptera, Simuliidae* 38, FECIC, Buenos Aires, Fasc. II, 295pp. 1991.

CRAINEY, J. L; WILSON, M. D; POST, R. J. An 18S ribosomal DNA barcode for the study of *Isomermis lairdi*, a parasite of the blackfly *Simulium damnosum* s.l. *Medical and Veterinary Entomology* 23, 238-244. 2009.

CRAINEY, J. L; WILSON, M. D; POST, R. J. Phylogenetically distinct *Wolbachia* gene and pseudogene sequences obtained from the African onchocerciasis vector *Simulium squamosum*. *International Journal for Parasitology* 40, 569-578. 2010.

CROSSKEY, R. W. The natural history of blackflies. London, The British Museum of Natural History, 711 p. 1990.

CROSSKEY, R.W; Blackflies (Simuliidae). In: R.P. LANE, R.W. CROSSKEY, *Medical insects and arachnids.* Department of Entomology The Natural History Museum, Chapman & Hall Press, London, p. 723. 1996.

CUPP, E. W. Black flies and the agents they transmit. In BEATY, B. J; MARQUARDT, W. C. *The biology of diseases vectors.* University Press of Colorado. Colorado. 98-109 pp. 1996.

DAY, J. C.; GOODALL, T. I; POST, R. J. Confirmation of the species status of the blackfly *Simulium galeratum* in Britain using molecular taxonomy. *Med Vet Entomol.* Mar. 22(1):55-61. 2008.

FOLMER, O.M; HOEH, W; LUTZ, R; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 3: 294–299. 1994.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; DE BRITO, T.; BACCHI, C.E.; ALMEIDA, P. C de. *Patologia: Processos Gerais.* São Paulo: Atheneu, p. 257. 2006.

GARMS, R.; LAKWO, T.L.; NDYOMUGYENYI, R.; KIPP, W., RUBAALE, T.; TUKESIGA, E.; KATAMANYWA, J.; POST,R.J.; AMAZIGO, U.V. The elimination of the vector *Simulium neavei* from the Itwara onchocerciasis focus in Uganda by ground larviciding. *Acta Trop.* 111, 203–210. 2009.

GRILLET ME, VILLAMIZAR NJ, FRONTADO HL, *ET AL...* Vector competence of *Simulium oyapockense* s.l. and *S. Incrustatum* for *Onchocerca volvulus*: implications for ivermectin-based control in the Amazonian focus of human onchocerciasis, a multi-vector–host system. *Acta Tropica* 107: 80–89. 2008.

HAAG-LIAUTARD, C; COFFEY, N; HOULE, D; LYNCH, M; CHARLESWORTH, B. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 6(8): 204. 2008.

HAMADA, N. Aspectos ecológicos de *Simulium goeldii* (Diptera: Simuliidae) - Relação entre substrato e densidade de larvas. Rio de Janeiro: Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 84, supl. IV, 263-266. 1989.

HAMADA, N; PEPINELLI, M; MATTOS, A; LUZ, S.L.B. A new black fly species from Brazil, closely related to *Simulium guianense* Wise (Diptera, Simuliidae), revealed by morphology and DNA barcoding. *Zootaxa* 2428: 22-36. 2010.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A; BALL, S.L; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321. 2003.

HERNÁNDEZ-TRIANA, L.M., CRAINEY, J.L., HALL, A., FAITH, F., MACKENZIEDODDS, J., SHELLEY, A.J., ZHOU, X., POST, R.J., GREGORY, T.R., HEBERT, P.D.N. DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa* 3514, 43–69. 2012.

ILMONEN, J; ADLER, P. H. MALMQVIST, B; CYWINSKA, A. The *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae) in Europe: multiple character sets for assessing species status. *Zoological Journal of the Linnean Society* V. 156, Issue 4, 847–863p. Aug. 2009.

LIBÓRIO, R. A. Tese: Diagnóstico de zoonoses causadas por nematoides, trematódeas e cestoides em animais de produção no Estado do Tocantins. Universidade Federal Do Tocantins: Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical. Tocantins, 2011

MARCHON-SILVA, V.; CAER, J.C.; POST, R.J.; MAIA-HERZOG, M.; FERNANDES, O. Detection of *Onchocerca volvulus* (Nematoda: Onchocercidae) infection in vectors from Amazonian Brazil following mass Mectizan distribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 197–202. 2007.

MATTOS, A. Análise morfológica, citológica e molecular de diferentes populações de *Simulium guianense* vetor de oncocercose no Brasil. Tese de Mestrado - Instituto de Pesquisa da Amazônia, Manaus AM, 132pp. 2008.

MEDEIROS, J. F; PY-DANIEL, V. Atividade hematofágica e infecção natural de três espécies de Simuliidae (Diptera, Nematocera) em Xitei/Xidea, área indígena Yanomami, Roraima, Brasil. *Entomologia y Vectores* 6(3): 210-226. 1999.

MORAES M. A. P. Oncocercose entre os índios Yanomami. *Cad Saúde Pública* 7:503-14. São Paulo, 1991;

MORAES MAP, CHAVES GM. Um caso de oncocercose no território de Roraima, Brasil. *Ver. Inst. Med. Trop.* 16:110-3. São Paulo, 1974.

MORAES M. A. P. DIAS L. B. Oncocercose no Estado do Amazonas. *Rev. Inst. Med. Trop.* 14:330-3. São Paulo, 1972.

MWANGANGI, J.M.; MBOGO, C.M.; ORINDI, B.O.; MUTURI, E.J.; MIDEGA, J.T.; NZOVU, J.; GATAKAA, H.; GITHURE, J.; BORGEMEISTER, C.; KEATING, J.; BEIER, J.C.; Shifts in malaria vector species composition and transmission dynamics along the Kenyan coast over the past 20 years. *Malar. J.*, 12. 2013.

PEREIRA, D.S.; NOGUEIRA, N.O.; CANDIDO, A.O.; ALVES, P. & LEMES, E.Q. 2012. Infestações de *Simulium pertinax* e suas relações com o desequilíbrio ambiental. *Rev. Trop. Ciênc. Agrárias e Biol.*, 6:49-61.

PESSOA, F. A. C.; RIOS-VELÁSQUES, C. M.; PY-DANIEL, V. A new species of *Araucnephia* (Diptera: Simuliidae) in the northeast region of Brazil, *Zootaxa* (Online), v. 3343. 31-44. 2012.

PRUESS, K.P; ADAMS, B.J; PARSONS, T.J; ZHU, X; POWERS, O. Utility of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase II Gene for Resolving Relationship among Black Flies (Diptera: Simuliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 286-295. 2000.

PY-DANIEL, V; ANDREAZZE, R; MEDEIROS, J. F. O Projeto piloto Xitei/Xidea (Roraima). 1- Índices epidemiológicos da transmissão de *O. volvulus* (Leuckart, 1893) para os anos de 1995-1996. *Entomologia y Vectores* 7(4): 389-444. 2000.

RIVERA, J; CURRIE, D. C. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources Special Issue: Special Issue on Barcoding Life Volume 9, Issue Supplement s1, May, 224– 236 p.* 2009.

SÁ M.R; MAIA-HERZOG M. Overseas disease: comparative studies of onchocerciasis in latin America and Africa. *Hist. Ciências da Saúde Manguinhos*, 10:251-8, 2003.

SACCONE, G; Pane, A; Testa, G; Santoro, M; Martino G. Sex determination in medfly: a molecular approach. In *Area-Wide Control of Fruitflies and Other Pest Insects*, edited by K.-H. Tan. Penerbit USM, Penang. 491–496. 2000.

SCOTT, J.A.; BROGDON, W.G.; COLLINS, F.H. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 520–529. 1993.

SERVICE, M. W. *Medical entomology for students*. 4 ed, Londres: Cambridge University Press, 2008. Disponível em: http://books.google.com.br/books?id=wRrof4RLDuwC&pg=PA81&hl=ptBR&source=gbs_toc_r&cad=4

SHELLEY, A.J; LUNA DIAS, A.P.A; MORAES, M.A.P; PROCUNIER, W.S. The status of *Simulium oyapockense* and *S.limbatum* as vectors of human onchocerciasis in Brazilian Amazonia. *Medical and Veterinary Entomology* 1: 219-234. 1987.

SHELLEY, A. J; LUNA DIAS, A. P. A; MORAES, M. A. P; PROCUNIER, W. S; COUCH, C. A. Simuliidae and human onchocerciasis in the Amazonia focus, pp. 190-193, 1988.

SHELLEY, A.J; LOWRY, C.A; MAIA-HERZOG, M; LUNA DIAS, A.P.A; MORAES, M.A.P. Biosystematics studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. *Bulletin of The Natural History Museum London (Entomologia.)*, 66(1): 1-121. 1997.

SHELLEY, A. J. Oncocercose humana no Brasil: uma visão geral. *Cadernos de Saúde Pública* 18, 1167-1177. 2002

SHELLEY, A. J; HERNÁNDEZ, L. M; MAIA-HERZOG, M; LUNA DIAS, A. P. A. & GARRITANO, P. R. The Blackflies (Diptera: Simuliidae) of Brazil. *Aquatic Biodiversity of Latin America*. Pensoft publishers. Vol. 6. 821p. 2010.

SIMOM, Y. G. Tese: Controle de Simulídeos: Uma visão de gerenciamento. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina: Programa de pósgraduação em engenharia de produção. 2000.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reactions primers. *Annals of the Entomological of America*. 87(6): 651-701. 1994.

TAMURA, K; PETERSON, D; STECHER, G; NEI, M; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods - MEGA5. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739, 2011.

TANG, J; TOË, L; BACK, C; ZIMMERMAN, P.A; PRUESS, K; UNNASCH, T. R. The *Simulium damnosum* species complex: phylogenetic analysis and molecular identification based upon mitochondrial encoded gene sequences. *Insect Mol. Biol.* May; 4(2):79–88. 1995.

TRAORÉ, S.; WILSON, M.D.; SIMA, A.; BARRO, T.; DIALLO, A.; AKE, A.; COULIBALY, S.; CHEKE, R.A.; MEYER, R.R.F.; MAS, J.; MCCALL, P.J.; POST, R.J.; ZOURE, H.; NOMA, M.; YAMEOGO, L.; SEKETELI, A.V.; AMAZIGO, U.V. The elimination of the onchocerciasis vector from the island of Bioko as a result of larviciding by the WHO African Programme for Onchocerciasis Control. *Acta Trop.* 111, 211–218. 2009.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Onchocerciasis (river blindness): report from the InterAmerican Conference on Onchocerciasis. *Week Epidemiological Records.* v.78, p.361-364. 2003.