

ESTUDOS MOLECULARES DE *Simulium incrustatum* LUTZ, (DIPTERA: SIMULIIDAE): VETOR DE *Onchocerca volvulus* NO FOCO DE ONCOCERCOSE HUMANA NA AMAZÔNIA, BRASIL

Maríza Magalhães Coêlho⁽¹⁾; Sérgio Luiz Bessa Luz⁽²⁾; Anthony John Shelley⁽³⁾; Koko Otsuki⁽⁴⁾; Neusa Hamada⁽⁵⁾.

Bolsista FIOCRUZ/CNPq/PIBIC⁽¹⁾; Pesquisador CPqL&MD/FIOCRUZ-AM⁽²⁾; Pesquisador NHM/UK⁽³⁾; Pesquisadora CPqL&MD/FIOCRUZ⁽⁴⁾; Pesquisadora INPA/CPEN⁽⁵⁾.

A espécie *Simulium incrustatum* Lutz, está relacionada com a transmissão da oncocercose no Brasil, sendo considerado vetor nas áreas hiperendêmicas do foco ao norte da Amazônia e aparece como sinonímia de *Simulium yarzabali* na Venezuela onde também apresenta importância na transmissão de oncocercose. *S. incrustatum* está amplamente distribuído em quase toda a extensão da América do Sul, sendo encontrado do Norte ao Sul do Brasil. Devido a essa extensa distribuição geográfica apresenta requerimentos e adaptações para diferentes condições ambientais, podendo representar um complexo de espécies crípticas.

Este trabalho teve como objetivo, caracterizar *S. incrustatum* mediante análise dos padrões de restrição de enzimas do fragmento amplificado, gel vertical de acrilamida e análise de seqüências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal. As análises comparativas foram realizadas utilizando *S. limbatum* do Estado de Roraima, Igarapé Murupú, que é uma espécie colocada no mesmo grupo *incrustatum*, do subgênero *Psaroniocompsa*, cujo sequenciamento já foi efetuado. Foram analisados espécimes de *S. incrustatum* procedentes do Estado de Roraima, Surucucus, área hiperendêmica de oncocercose. Foi realizada a extração de DNA genômico de *S. incrustatum* utilizando apenas os três pares de patas de cada indivíduo, seguindo o método de Flook et al. (1992). Foi realizado PCR utilizando oligonucleotídeos previamente estabelecidos, amplificando a região ITS, incluindo a região 5.8s (ITS+5.8s+ITS2), utilizando áreas altamente conservadas das regiões 18s e 28s do DNA ribossomal. Foram selecionadas cinco amostras de fragmento amplificado de *S. incrustatum* que apresentaram um padrão de bandas bem definidas, purificados utilizando *Concert Rapid PCR Purification System* e seqüenciados automaticamente utilizando *Big Dye Terminator Cycler*. As seqüências foram editadas no programa CHROMAS. Para alinhar as seqüências e fazer inferências filogenéticas foi utilizado o programa CLUSTAL. Quatro amostras de *S. incrustatum* e quatro de *S. limbatum* foram submetidas a uma eletroforese em gel vertical de acrilamida 5%. A análise do PCR-RFLP foi realizada utilizando uma enzima (*Alu I*) com cinco amostras de cada espécie. Através do gel de acrilamida foi observada diferença no

tamanho do produto amplificado entre essas espécies. A análise do PCR-RFLP indicou diferenças no padrão de restrição produzido pela enzima *Alu I*. Em *S. incrustatum* o produto foi clivado em 172 bp enquanto em *S. limbatum* foram produzidos dois fragmentos em 216 e 392 bp. O seqüenciamento de *S. incrustatum* revelou um comprimento de 549 bp. Através desse estudo foi observada a maior presença de A-T, confirmando os resultados obtidos por Aguilar et al.(2001), com *S. quadrifidum* e *S. cauchense* (fig. 1).

Até o presente, estes resultados têm contribuído satisfatoriamente na acumulação de informações que serão utilizadas no projeto básico e demonstram a importância das técnicas moleculares como uma “ferramenta” útil para auxiliar na taxonomia dos simúlídeos.

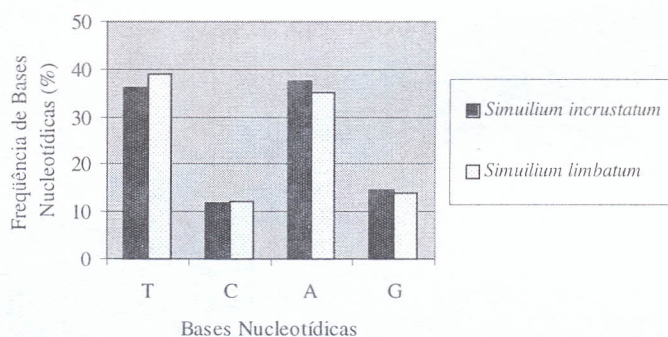


Figura 1 – Composição de Nucleotídeos dos fragmentos da região ITS de DNA ribossomal de *Simulium incrustatum* e *S. limbatum*.

Aguilar, M.A.A., 2001. Estudos Citotaxonômicos e moleculares de *Simulium quadrifidum* Lutz, 1917 e *Simulium cauchense* Floch & Abonnenc, 1946 (DIPTERA: SIMULIIDAE) na Amazônia, Brasil.

Flook, P. K.; Wilson, M.D.; Post, R. J.; 1992. The use of repetitive DNA probes in the analysis of natural populations of insects and parasites. In: Berry, R.J., Crawford, T.J. & Hewitt, G.M. (eds) genes in Ecology. British Ecological Society/ Black will Scientific Publications, Oxford.