

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ALGUMAS ESPÉCIES DOS SUBGÊNEROS *Simulium* (*Thyrsopelma*), *S.* (*Trichodagmia*) E *S.* (*Hemicnetha*)

Fernanda Rodrigues SOARES¹; Alessandra CUNEGONDES²; Ana Claudia KAMINSKI³; Neusa HAMADA⁴.

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Colaboradora GCBEV/ INPA; ³Colaboradora UFAM/Coari; ⁴Orientadora CPEN/ INPA

1. Introdução

A validade de alguns subgêneros de Simuliidae na região Neotropical é controversa, sendo um exemplo dessa situação, os subgêneros *Simulium* (*Thyrsopelma*) Enderlein e *S.* (*Trichodagmia*) Enderlein. Crosskey (1988) considerou os subgêneros *S.* (*Trichodagmia*), *S.* (*Grenierella*) Vargas & Díaz Nájera e, *S.* (*Thyrsopelma*) como sinônimos para fins de inventário pelo fato da taxonomia desses três subgêneros não ser amplamente conhecida. Essa classificação tem sido seguida por alguns autores (e.g. Shelley *et al.*, 1997 e Hernandez *et al.*, 2005) e continua sendo utilizada no Inventário de Simuliidae do Mundo por Adler e Crosskey (2009). Entretanto, Miranda-Esquivel e Coscarón (2001) consideraram os subgêneros *S.* (*Trichodagmia*) e *S.* (*Thyrsopelma*) como válidos por meio de uma análise filogenética, baseados em caracteres morfológicos. *Simulium nunesdemelloi* Hamada, Pepinelli & Hernandez, 2006, descrita recentemente apresenta caracteres morfológicos de ambos subgêneros, indicando a necessidade de uma revisão dos caracteres utilizados para definir esses dois subgêneros ou para corroborar a sinonímia de *S.* (*Thyrsopelma*) com *S.* (*Trichodagmia*). Análises moleculares e cromossômicas poderão auxiliar na elucidação das relações entre as espécies desses dois subgêneros. Os subgêneros *S.* (*Trichodagmia*) e *S.* (*Thyrsopelma*) incluem algumas espécies altamente antropofílicas e, pelo menos duas, estão relacionadas com doenças que afetam o ser humano (Diaz *et al.* 1989; Shelley *et al.* 1997). Outras espécies antropofílicas, pertencentes a esses dois subgêneros, mas que até o momento não foram classificadas como vetores de agentes etiológicos causadores de doença ao ser humano, no Brasil, são *Simulium orbitale* Lutz, *Simulium hirtipupa* Lutz, *Simulium scutistriatum* Lutz e *Simulium lahillei* Paterson & Shannon (Miranda-Esquivel e Coscarón, 2001). Contrastando com o grande número de estudos morfológicos e citotaxonômicos (e.g. Hamada & Adler, 1999; Campos *et al.*, 2001; Hamada e Fouque, 2001), os estudos moleculares sobre as relações filogenéticas de Simuliidae ainda são escassos (e.g. Moulton, 2000; Pruess *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 2000). Os subgêneros *S.* (*Thyrsopelma*) e *S.* (*Trichodagmia*) apresentam espécies relacionadas à transmissão de doenças tropicais. *Simulium* (*Trichodagmia*) *nigrimanum* Macquart é incriminada como transmissora do Pênfigo Foliáceo (Diaz *et al.*, 1989), doença que acomete habitantes das áreas rurais da região Centro-Oeste do Brasil. *Simulium* (*Thyrsopelma*) *guianense* Wise é o principal vetor de *Onchocerca volvulus*, agente etiológico da onconcerose na região Amazônica do Brasil e da Venezuela, cuja manifestação mais severa é a cegueira. A necessidade do aumento do número de informações sobre *S.* (*Thyrsopelma*) e *S.* (*Trichodagmia*) é justificada pela inexistência de estudos baseados em dados moleculares que incluam esses subgêneros. Estudos filogenéticos podem fornecer importantes dados sobre a biologia das espécies em questão, servindo de base para estudos de comportamento e controle, já que esses subgêneros compreendem diversas espécies antropofílicas e vetores de doenças na região Neotropical. Além disso, estudos sobre a evolução dos grupos com posterior inclusão de dados biogeográficos podem auxiliar no entendimento de sua distribuição no território brasileiro e suas relações com os focos de doenças que acometem populações da região Amazônica.

O objetivo do trabalho foi caracterizar molecularmente algumas espécies dos subgêneros *S.* (*Thyrsopelma*), *S.* (*Trichodagmia*) e *S.* (*Hemicnetha*), *sensu* Miranda Esquivel & Coscarón para auxiliar no esclarecimento sobre as relações entre as espécies desses subgêneros, estimando a distância genética das mesmas através de análises filogenéticas com base em seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII).

2. Material e métodos

Foram analisados indivíduos das seguintes espécies do subgênero *S.* (*Thyrsopelma*): *S. guianense*, *S. hirtipupa*, *S. itaunense*, *S. scutistriatum*, *S. duodenicornium* e *S. perplexum*; subgênero *S.* (*Trichodagmia*): *S. nigrimanum*; subgênero *S.* (*Hemicnetha*): *S. cristalinum*, *S. lobatoi* e *S.*

rubrithorax. *Simulium perflavum*, do subgênero *S. (Ectemnaspis)* foi incluído nas análises como grupo externo. Populações provenientes de diferentes áreas geográficas foram, quando possível, analisadas para avaliar a variação intraespecífica.

O DNA foi extraído por kit de extração da Qiagen e amplificado pela reação de PCR, com os iniciadores desenhados por Simon (1994) e utilizando reagentes da PROMEGA. A purificação dos produtos amplificados foi realizada por kit da PROMEGA e o seqüenciamento foi feito em seqüenciador MegaBace 1000.

Foram obtidas 23 seqüências de boa qualidade, as quais foram conferidas em cromatograma pelo programa Chromas e devidamente alinhadas no programa Clustal X (parâmetro de abertura 15 - 6,6) e BioEdit 7 (manualmente).

As análises filogenéticas seguiram o modelo de Pruess *et al.* (2000), através do programa PAUP* e visualização das árvores no programa TreeView. As árvores iniciais foram obtidas através de uma busca heurística, com a opção de rearranjo de ramos de 30 réplicas com biseção-reconexão de árvores ("tree bisection-reconnection" - TBR).

Uma busca heurística também foi usada para produzir uma árvore de máxima verossimilhança (maximum likelihood tree - ML tree). O rearranjo de ramos foi feito utilizando-se do rearranjo TBR. A análise também assumiu o modelo HKY dois-parâmetros para frequências de bases desiguais (Hasegawa *et al.*, 1985). Sítios variáveis foram assumidos a refletir uma distribuição gama.

Para árvores de parcimônia, o suporte de nós foi estimado por suporte de ramos ("bootstrap") com 500 réplicas.

3. Resultados e discussão

Dois árvores foram geradas: máxima verossimilhança (ML) e parcimônia, as quais apresentaram a mesma topologia (Figura 1).

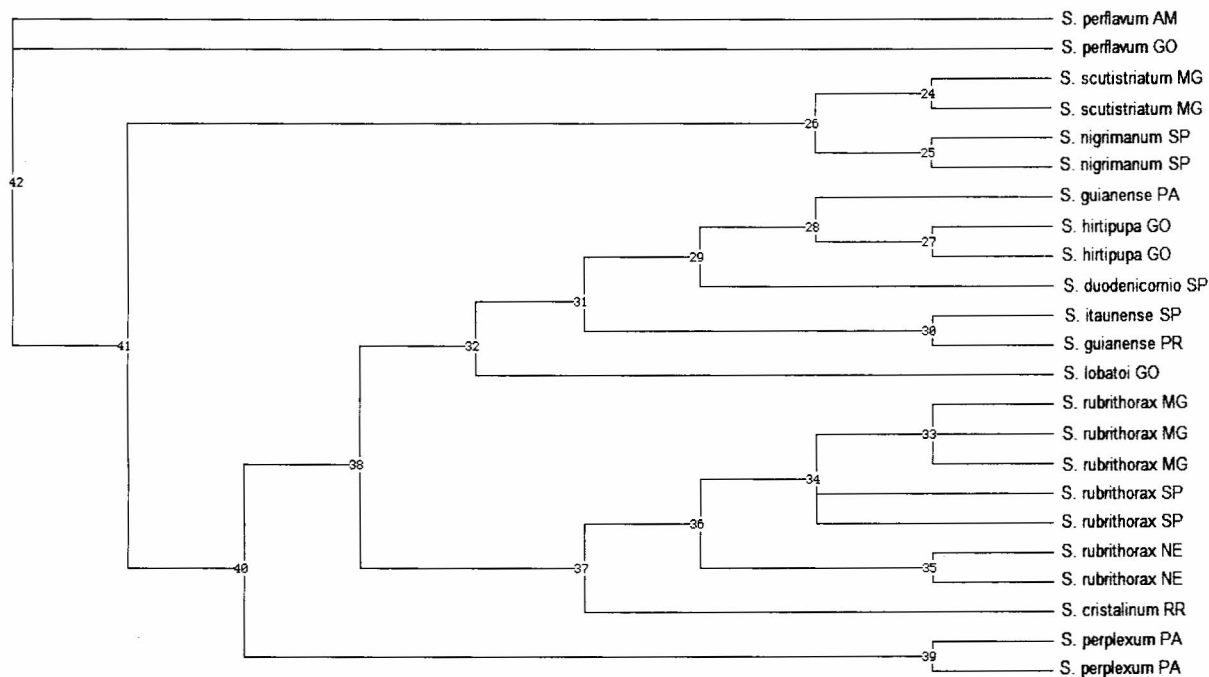


Figura 1: Árvore consenso das análises filogenéticas.

Simulium scutistriatum e *S. perplexum* não se posicionaram no grupo formado pelas outras espécies do subgênero *S. (Thyrsopelma)*, conforme esperado pela análise morfológica realizada por Miranda-Esquivel e Coscarón (2001), enquanto que *S. lobatoi* foi inserida mais próxima do grupo formado pelas espécies desse subgênero do que de *S. (Hemicnetha)*, conforme sugerido por Adler e Crosskey (2009). *Simulium scutistriatum* foi inserida no mesmo grupo que *S. nigrimanum*, nas árvores geradas por parcimônia e por verossimilhança de acordo com Miranda-Esquivel e Coscarón (2001) e Coscarón e Coscarón-Arias (2007), essas duas espécies pertenceriam a subgêneros

diferentes, como já mencionado acima. Uma comparação morfológica entre essas duas espécies, indica que o padrão de coloração dos adultos, a placa ventral dos machos e a forma do paraprocto das fêmeas são mais semelhantes entre *S. scutistriatum* e *S. nigrimanum*, do que essa primeira espécie e as outras espécies do subgênero *S. (Thyrsopelma)*, *sensu* Miranda-Esquivel e Coscarón (2001). A monofilia de *S. (Thyrsopelma)*, de acordo com Miranda-Esquivel e Coscarón (2001), é indicada pelo formato dos dentes do hipostômio da larva, pela presença de cerdas lanceoladas na cutícula da larva, por garras tarsais sem denticulos e pelo tamanho da gonapófise. Embora Coscarón e Coscarón-Arias (2007) indiquem a presença de cerdas lanceoladas na cutícula de larvas de *S. scutistriatum*, cerdas com esse formato não foram observadas nas larvas dessa espécie coletadas e examinadas no presente estudo. A larva de *S. perplexum* não era conhecida anteriormente e, um trabalho descrevendo esse estágio de vida está sendo realizado por Gomes e Hamada (comunicação pessoal). As larvas dessa espécie, assim como larvas de *S. scutistriatum* não possuem cerdas lanceoladas na cutícula, como as outras espécies de *S. (Thyrsopelma)*. Além disso, o paraprocto da fêmea e a placa ventral do macho dessa espécie apresentam formatos bem distintos das outras espécies do subgênero *S. (Thyrsopelma)*, *sensu* Miranda-Esquivel e Coscarón (2001) e, as garras tarsais apresentam um denticulo basal. Na análise filogenética realizada nesse estudo, utilizando informações moleculares, essa espécie não foi incluída no grupo que continha a maioria das espécies do subgênero *S. (Thyrsopelma)*. *Simulium guianense* apresentou diferenças bastante relevantes entre as duas populações, do norte e do sul do Brasil. Embora a pupa de *Simulium guianense* do Paraná seja semelhante a *S. guianense sensu strictu*, espécimes examinados dessa população agrupou-se com a espécie *S. itaunense*, corroborando informações morfológicas já observadas no estágio adulto. Nossos resultados posicionaram *Simulium lobato* mais próxima do grupo de espécies formado pelo subgênero *S. (Thyrsopelma)* do que do grupo de espécies formado pelo subgênero *S. (Hemicnetha)*. Dias *et al.* (2004) ao descreverem essa espécie não a inseriram em nenhum subgênero, entretanto, ela foi inserida em *S. (Hemicnetha)* por Adler e Crosskey (2009). Dessa forma, nossos resultados não corroboram a inserção de *Simulium lobato* nesse subgênero, como sugerido por Adler e Crosskey (2009). Miranda-Esquivel e Coscarón (2001) consideraram *S. (Thyrsopelma)* como grupo irmão de *S. (Trichodagmia)*, mas nossas análises indicam que *S. (Thyrsopelma)* tem como grupo-irmão *S. (Hemicnetha)*. Após as análises utilizando dados moleculares (COII) sugerimos que as espécies atualmente inseridas nos três subgêneros avaliados devem ter sua posição subgenérica revista. Espera-se que com a inclusão de espécies adicionais, dos diferentes subgêneros na análise, as relações entre as espécies se tornem mais claras.

4. Conclusão

Nossas análises preliminares sugerem que a inserção de algumas espécies nos subgêneros *S. (Thyrsopelma)*, *S. (Trichodagmia)* e *S. (Hemicnetha)* devem ser reavaliadas uma vez que, de acordo com os caracteres moleculares obtidos pelo gene COII, eles não representam um grupo monofilético.

Palavras-chave: Simuliidae, COII, Filogenia, Sistemática Molecular.

5. Referências

- Adler P.H.; Becnel, J.J. & Moser, B. 2000. Molecular characterization and taxonomy of a new species of *Caudosporidae (Microsporidia)* from black flies (Diptera: Simuliidae) with host-derived relationships of the North American caudosporids. *J Invertebr Pathol.* 75(2): 133-43.
- Campos, J.; Andrade, C.F. & Recco-Pimentel, S.M. 2001. Chromosomal comparisons among and within populations of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* (Diptera, Simuliidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(3): 365-9.
- Crosskey, R.W. 1988. An annotated checklist of the world's black flies (Diptera: Simuliidae). In: *Black flies: Ecology, Population Management and Annotated World List* (Ed. K.C. Kim & R.W. Merritt), pp. 425-520. Pennsylvania State Press, University Park, Pennsylvania.
- Diaz, L.A.; Sampaio, S.A.; Rivitti, E.A.; Martins, C.R.; Cunha, P.R.; Lombardi, C.; Almeida, F.A.; Castro, R.M.; Macca, M.L. Lavrado, C. *et al.* 1989. Endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J. Invest. Dermatol.* 92 (1): 4-12.

- Miranda-Esquivel, D.R. & Coscarón, S. 2001. Cladistic analysis of *Simulium* (*Trichodagmia*) and *Simulium* (*Tyrsopelema*) (Diptera: Simuliidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 132: 429-439.
- Hamada, N. & Adler, P.H. 1999. Cytotaxonomy of four species in the *Simulium perflavum* species group (Diptera: Simuliidae) from Brazilian Amazonia. *Syst. Entomol.* 24: 273-288.
- Hamada, N. & Fouque, F. 2001. Black flies (Diptera: Simuliidae) of French Guiana: cytotaxonomy and a preliminary list of species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(7): 955-9.
- Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
- Hernandez, L.M.; Shelley, A.J.; Dias, A.P.L. & Maia-Herzog, M. 2005. Redescription of the female, male, and pupa of *Simulium itaunense* D'Andretta & González B. (Diptera: Simuliidae). *Zootaxa* 896: 1-14.
- Moulton, J.K. 2000. Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera). *Syst. Entomol.* 25: 95-113.
- Pruess, K.P.; Adams, B.J.; Parsons, T.J.; Zhu, X. & Powers, T.O. 2000. Utility of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene for resolving relationships among black flies (Diptera: Simuliidae). *Mol Phylogenet Evol.* 16(2): 286-95.
- Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-686.
- Shelley, A.J., Lowry, C.A., Maia-Herzog, M., Luna Dias, A.P.A. & Moraes, M.A.P. 1997. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus of Brazil. *Bulletin of the Natural History Museum (Entomology)* 66: 1-121.