INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Integrado de Pós-Graduacão em Biologia Tropical e Recursos Naturais

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOLÓGICA DE DIFERENTES POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DE *Simulium guianense* Wise *s.l.*, NO BRASIL

ALINE ALMEIDA MATTOS

Manaus-Amazonas
Outubro-2007

ALINE ALMEIDA MATTOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOLÓGICA DE DIFERENTES POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DE *Simulium guianense* Wise *s.l.*, NO BRASIL

Neusa Hamada, Dra.

Sérgio Luiz Bessa Luz, Dr.

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus-Amazonas
Outubro-2007

FICHA CATALOGRÁFICA

M444 Mattos, Aline Almeida
Caracterização molecular e citológica de diferentes populações geográficas de *Simulium guianense* / Aline Almeida Mattos .--- Manaus : [s.n.], 2007.
109 p. : il.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2007
Orientador: Hamada, Neusa
Co-orientador: Luz, Sérgio Luiz Bessa
Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Simulium guianense. 2. Citotaxonomia. 3. Cromossomos politênicos. 4. Variabilidade genética. 5. DNA mitocondrial. 6. Vetor da oncocercose. I. Título.

CDD 19. ed. 595.77

SINOPSE

Estudo de variabilidade genética usando diferentes métodos: citogenético, pela análise do padrão de bandeamento de cromossomos politênicos e, molecular, pela análise de seqüências da região do gene mitocondrial COI, foi realizado em diferentes populações geográficas brasileiras de *Simulium guianense s.l.* Wise, principal espécie vetor da filária *Onchocerca volvulus* Leuckart, causadora da oncocercose no foco Amazônico

Dedico às pessoas que contribuíram para minha criação, formação pessoal e de valores: minha mãe Jacilene, meu pai Raimundo Nonato, minha avó Jurandir e meu avô João Ribeiro (*in memorian*).

À orientadora Neusa Hamada que tem me incentivado à pesquisa e conhecimento e não desistir, mas ultrapassar as barreiras.

AGRADECIMENTOS

Venho expressar minha verdadeira gratidão a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a finalização desta produção científica. Agradeço, principalmente por fazerem parte da minha vida nessa fase tão importante.

Ao meu Deus que me tem sustentado em cada detalhe e permitido a sabedoria e o entendimento para concluir essa etapa para louvor de seu nome.

À minha família que me apóia com muito amor e consideração. Em especial a minha mãe, Jacilene Mattos porque é uma verdadeira amiga, por sua compreensão ao entender minha ausência e por ser minha grande incentivadora, e ao meu pai, Raimundo Nonato, que nos encorajou aos estudos e ao futuro profissional.

À Dra. Neusa Hamada por sua orientação, cobrança, por não medir esforços na melhoria dos projetos executados e por sua amizade e companheirismo.

Ao Dr. Sérgio Luz pela co-orientação, apoio, pela ajuda na parte molecular do trabalho e por me ensinar a não entrar em desespero, mas manter a calma.

Ao Dr. Fernando Abach-Franch, da Fiocruz-AM e Jacqueline Batista, do Laboratório Temático do INPA pela colaboração e auxílio nos programas de seqüências, por todas suas sugestões, críticas e direcionamentos.

Às pessoas que me acompanharam na coleta do Pitinga, Domingos Leonardo, Jéferson Silva, Nayra Silva e Ana Pes.

Aos integrantes do grupo Mineração Taboca, que trabalham na Hidrelétrica do Pitinga que permitiram as coletas nessa na área: Cuzziol, Assis e José Maria.

Ao Dr. Anthony Shelley e Jacqueline Mackenzie, do Museu de História Natural de Londres, pelas seqüências de *Simulium duodenicornium* Pepinelli, Hamada & Strixino cedidas para serem utilizadas neste trabalho.

Às pessoas que me ajudaram nas fotos editadas: Márcio Cutrim, Sheyla Couceiro e Disley Sombra.

Aos professores do curso de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, que contribuíram para minha formação profissional.

Aos membros do conselho de curso, à coordenação e secretarias do GCBEv pelo esforço de manter um bom curso de pós-graduação no nível da instituição.

Aos colegas do laboratório de citotaxonomia, pela boa convivência, cooperação e coleguismo: Ângela Emy, Bruno Godoy, Carlos Azevêdo, Daiane Carrasco, Gilcélio Silva,

Claudimir Menezes, Lívia Fusari, Sheyla Couceiro, Isis Menezes, Ulisses Neiss e Patrícia Reis.

À Dra. Beatriz Ronchi Teles, coordenadora do curso de Entomologia pelo apoio e por estar sempre disponível para ajudar.

Ao meu amado Frank Glória por sua compreensão, apoio, respeito, incentivo e amor dedicado.

Aos meus amigos, por suas orações, carinho e horas de lazer: Débora Caldas, Jucimar, Pauline, Vanessa, Figuei, Érico, Mayara, Raquel, Willian e Elias.

À Fundação de Apoio e amparo à Pesquisa no Amazonas-FAPEAM, pela bolsa de estudo oferecida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, pela estrutura e por esse espaço que temos para pesquisa na região.

Ao Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz pelo apoio logístico, pelo laboratório cedido para a parte molecular do trabalho.

“Seja bendito o nome de Deus, de eternidade a eternidade, porque dele é a sabedoria e o poder [...] ele dá sabedoria aos sábios e entendimento aos inteligentes. Ele revela o profundo e o escondido. A ti, ó Deus de meus pais, eu te rendo graças e te louvo, porque me deste sabedoria e poder [...].”

(Daniel 2.20,23)

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA ii
SINOPSE ii
DEDICATÓRIA iii
AGRADECIMENTOS iv
SUMÁRIO vii
LISTA DE TABELAS x
LISTA DE FIGURAS xii
ABSTRACT xv
RESUMO xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL 1
1.1. Classificação geral e distribuição 1
1.2. Biologia dos Simulídeos 2
1.3. Importância da família Simuliidae 3
1.4 Estudos epidemiológicos 3
1.5. Espécies crípticas 4
1.6. Estudos citotaxonômicos 4
1.7. Estudos moleculares 7
1.8. Justificativa 9
2. OBJETIVOS 10
2.1. Geral 10
2.2. Específicos 10

Capítulo I
Citotaxonomia de populações de *Simulium guianense s.l.* Wise provenientes dos estados do Amazonas, São Paulo e Goiás, Brasil.
1.1. Introdução 11
1.2. Material e Métodos 13
1.2.1. Área de coleta e características físicas e físico-químicas dos criadouros de larvas de S. guianense. 13
1.2.2. Coleta e armazenamento do material 14
1.2.3. Triagem e identificação das larvas de *Simulium guianense s.l.* 17
1.2.4. Técnica citológica 21
1.2.4.1. Coloração e obtenção dos cromossomos politênicos 21
1.2.4.2. Elaboração e análise dos mapas citológicos 22

1.3. Resultados 23

1.3.1. Morfologia geral do Complemento cromossômico 25

1.3.2. Comparações entre o complemento cromossômico das três populações avaliadas com o citótipo A, estabelecido por Charalambous *et al.* (1996). 27

1.3.3. Inversões presentes nas três populações geográficas estudadas 28

1.4. Discussão 43

Capítulo II

Variabilidade genética entre nove populações geográficas de *Simulium guianense s.l.* Wise (Diptera: Simuliidae) utilizando o gene COI (subunidade I da Citocromo Oxidase) do DNA mitocondrial.

2.1. Introdução 47

2.2. Material e métodos 49

2.2.1. Coleta e armazenamento do material 49

2.2.2. Descrição das áreas de estudo 50

2.2.3. Principais características morfológicas de *S. guianense* 53

2.2.4. Técnica molecular 56

2.2.4.1.Extração de DNA total 56

2.2.4.2. Amplificação pela Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase–PCR do Gene Citocromo Oxidase 1 de DNA mitocondrial 56

2.2.4.3. Eletroforese dos produtos amplificados 57

2.2.4.4. Purificação das amostras 57

2.2.4.5. Reação de seqüenciamento 58

2.2.4.6. Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas 58

2.2.4.7 Validação das seqüências obtidas 59

2.2.4.8. Análise das seqüências nucleotídicas da região do gene mitocondrial COI 60

2.2.4.8.1 Análise das seqüências nucleotídicas e polimorfismos de DNA 60

2.2.4.8.2 Comparação entre populações 60

2.2.4.8.2.1. Distância genética entre populações 60

2.2.4.8.3. Estudo de genética populacional 61

2.2.4.8.4. Filogeografia de *S. guianense s.l.*, no Brasil 61

2.3. Resultados 62
2.3.1 Análise da composição nucleotídica e polimorfismo de DNA 62
2.3.2 Comparação entre populações 65
2.3.2.1. Distância genética entre as populações 65
2.3.2.2 Freqüência e relações entre haplótipos 66
2.3.3. Estudo de genética populacional 67
2.3.4 Filogeografia de *S. guianense s.l*, no Brasil 72
2.4. Discussão 75

3. CONCLUSÃO 79
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81
5. APÊNDICES 92

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Local de coleta dos exemplares de *Simulium guianense s.l.,* de diferentes estados do Brasil. Dados de localidade: coordenadas, datas e coletores.....13

Tabela 2 – Procedência dos quatro citótipos de *Simulium guianense s.l.* no estudo realizado por Charalambous *et al.* (1996).....13

Tabela 3 – Características físicas e físico-químicas dos criadouros amostrados de *Simulium guianense s.l.*.....23

Tabela 4 – Número de larvas de *Simulium guianense s.l.* coradas para exame de lâminas dos cromossomos politênicos, quantidade de lâminas lidas e não lidas de machos e fêmeas.....23

Tabela 5 – Leitura do complemento cromossômico de larvas de *Simulium guianense s.l.* das diferentes populações, lidas completamente (LC) e lidas incompletamente (LI).....24

Tabela 6 – Inversões encontradas nas populações de *Simulium guianense s.l.* dos estados do Amazonas, São Paulo e Goiás (rio Ponte de Pedra).....38

Capítulo 2

Tabela 7 – Local de coleta dos exemplares de *Simulium guianense s.l.*, em diferentes estados do Brasil, e informações sobre coordenada geográfica, tipo de vegetação da área, data, coletores e estágios de vida utilizados para extração de DNA total.....51

Tabela 8 – Local de coleta dos exemplares de *Simulium guianense s.l.,* de diferentes estados do Brasil e características ambientais dos criadouros mostrados.....52

Tabela 9 – Freqüência da composição nucleotídica e valores de substituições por transição e transversão do conjunto de seqüências de *Simulium guianense* de diferentes populações geográficas, do Brasil.....62

Tabela 10 – Valores medidas de diversidade genética para *Simulium guianense* de diferentes populações geográficas, no Brasil. Onde N= número de amostras; *S* = Número de sítios polimórficos; *K*= número médio de diferenças nucleotídicas; π= diversidade nucleotídica; π_2 = diversidade nucleotídica com a correção de Jukes & Cantor; *Hd*= número de diversidade haplotípica e h= número de haplótipos.....64

Tabela 11 – Matriz de distância baseado no modelo de substituição nucleotídica 2 Parâmetros de Kimura (10000 bootstrap).....66

Tabela 12 – Número de haplótipos encontrados nas diferentes populações geográficas de *Simulium guianense s.l.*, do Brasil.....68

Tabela 13. - Estudos populacionais de *Simulium guianense s.l.* pelo método de distância par a par, estimando os valores de F_{ST} (Estrutura populacional) inter e intrapopulacional, e valores de Nm (Número de Migrantes).....71

Tabela 14 – Matriz com resultados de AMOVA (Análise de Variância Molecular) e índices de diferenciação entre diferentes populações e grupos geográficos de *Simulium guianense s.l.* pelo método de distância das diferenças par a par.....72

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. Ciclo de vida de *Simulium daltanhani* Hamada & Adler (Diptera: Simuliidae) com os quatro estágios de desenvolvimento.....2

Figura 2. Processo de politenização em cromossomos interfásicos e formação de puffs.....5

Capítulo 1

Figura 3. Mapa com a localização dos pontos de coletas dos citótipos pré-estabelecidos por Charalambous *et al.* (1996) e das populações de *S. guianense s.l.*, analisadas no presente estudo.....15

Figura 4. Paisagem dos locais de coleta das larvas de *S. guianense s.l.*.....16

Figura 5. Características morfológicas de larvas de *S. guianense s.l.* coletadas nos estados do Amazonas e São Paulo.....17

Figura 6. Variação na coloração do corpo de larvas de último estádio de *S. guianense s.l.* coletadas nos estados do Amazonas e São Paulo.....18

Figura 7. Características morfológicas de larvas de último estádio de *S. guianense s.l.*, coletadas em Goiás, rio Ponte de Pedra 19

Figura 8. Larvas coradas para observação do sexo da larva.....21

Figura 9. Lâminas com cromossomos politênicos das larvas de último estádio de *S. guianense s.l.* impossibilitados de leitura..... 25

Figura 10. Região centromérica dos três cromossomos de *S. guianense s.l.*.....26

Figura 11. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *S. guianense s.l.* Braço IS (braço curto do cromossomo I) e IL (braço longo do cromossomo I) da população do Amazonas, rio Pitinga.....29

Figura 12. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *S. guianense s.l.* Braço IIS (braço curto do cromossomo II) e IIL (braço longo do cromossomo II) da população do Amazonas, rio Pitinga.....30

Figura 13. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *S. guianense s.l.* Braço IIIS (braço curto do cromossomo III) e IIIL (braço longo do cromossomo III) da população do Amazonas, rio Pitinga.....31

Figura 14. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *S. guianense s.l.* Braço IS (braço curto do cromossomo I) e IL (braço longo do cromossomo I) da população de São Paulo, rio Pardo.....32
Figura 15. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *S. guianense s.l.* Braço IIS (braço curto do cromossomo II) e IIL (braço longo do cromossomo II) da população de São Paulo, rio Pardo.....33
Figura 16. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *S. guianense s.l.* Braço IIIS (braço curto do cromossomo III) e IIIL (braço longo do cromossomo III) da população de São Paulo, rio Pardo.....34
Figura 17. Cromossomo politênico de larva de último estádio da forma atípica de *S. guianense s.l.* Braço IS (braço curto do cromossomo I) e IL (braço longo do cromossomo I) da população de Goiás, rio Ponte de Pedra.....35
Figura 18. Cromossomo politênico de larva de último estádio da forma atípica de *S. guianense s.l.* Braço IIS (braço curto do cromossomo II) e IIL (braço longo do cromossomo II) da população de Goiás, rio Ponte de Pedras.....36
Figura 19. Cromossomo politênico de larva de último estádio da forma atípica de *S. guianense s.l.* Braço IIIS (braço curto do cromossomo III) e IIIL (braço longo do cromossomo III) da população de Goiás, rio Ponte de Pedras.....37
Figura 20. Citótipos de *S. guianense s.l.* de diferentes populações geográficas, do Brasil.....39
Figura 21. Inversões polimórficas encontradas na população de *S. guianense s.l.*de São Paulo.....40
Figura 22. Inversões polimórficas encontradas na população de *S. guianense s.l* do Amazonas.....41

Capítulo 2

Figura 23. Características morfológicas em adultos de *Simulium guianense s.l.* Foto em vista frontal. A) Escudo do macho; B) Escudo de fêmeas.....53
Figura 24. Mapa do Brasil com as áreas de coleta de *S. guianense s.l.*.....54
Figura 25. Paisagem das localidades de coleta de *S. guianense s.l.* no Brasil.....55
Figura 26. Número de polimorfismos do tipo substituição, por transição e transversão, encontrados na composição nucleotídica do conjunto de seqüências de *S. guianense* de diferentes populações geográficas, do Brasil.....63

Figura 27. Histograma com os valores do número de sítios polimórficos (*S*); = número médio de diferenças nucleotídicas (*K*) e número de haplótipos (h) de *S. guianense s.l.* de diferentes populações geográficas, no Brasil.....65
Figura 28. Histograma das freqüências dos haplótipos encontrados nas populações de *S. guianense s.l.*, no Brasil.....69
Figura 29. Cladograma representativo das estimativas de relações entre os haplótipos de *S. guianense s.l.*, no Brasil.....70
Figura 30. Árvore filogenética não-enraizada de distância K2P de diferentes populações geográficas de *S. guianense s.l.*, da forma atípica de GO-Rio Ponte de Pedra e *S. duodenicornium*, com 10.000 bootstrap.....74

APÊNDICES

Figura 31. Machos adulto de *S. guianense s.l.*: Forma típica e forma atípica.....92
Figura 32. Genitália do macho *in situ*, de *S. guianense s.l.* Forma típica e forma atípica.....93

ABSTRACT

The species *Simulium guianense s.l.* Wise is incriminated as the main vector of *Onchocerca volvulus* Leuckart, which is the ethiologic agent of oncocerciasis in the Amazonian focus of the disease, located in the northern portion of South América. The objectives of this study were to analyze different populations of this species using polythene chromosomes and mitochondrial gene sequences of the COI region to evaluate the relationships among these populations. The specimens for the cytotaxonomic study were collected in the Brazilian states of Amazonas, São Paulo and Goiás (Rio Ponte de Pedra) and for the molecular study the specimens were collected in the states of Amazonas, Amapá, Goiás (Rios Ponte de Pedra and Verdão), Maranhão and Roraima (one population from the Homoxi oncocerciasis focus and two from sites outside of the focus: Caroebe and Surumu). The polythene chromosomes from the analyzed populations were compared with a standard map that had been previously established for this species. The cytological analysis indicates the presence of polymorphic inversion in the Amazonas and São Paulo populations; the population from Goiás (Rio Ponte de Pedras) had two fixed inversions. Comparing 702 bp from the COI mithochondrial gene in the nine studied populations, a considerable number of polymorphic sites were observed, thereby allowing population and phylogeographic analyses to be undertaken. A representative cladogram was constructed to analyse the relationships among the observed haplotypes. The cladogram suggests that the populations from the northern region of Brazil (Amapá, Amazonas and the Caroebe site in Roraima) share one haplotype, while the populations from the Amazonian focus (Homoxi site in Roraima) is most closely related to the population from the Surumu site in Roraima, as these populations share a common haplotype. The populations from São Paulo and Goiás, Rio Verdão (from the southeast and centro-west regions of Brazil, respectively) have high haplotypic variability, each specimen being represented by one haplotype. The population from the Rio Ponte de Pedra site in Goiás did not share haplotypes with any of the other populations studied, including the population from the Rio Verdão site in Goiás, located approximately 50 Km away in the same hydrological basin. The populations from Amazonas and the Caroebe site in Roraima had negative values of $F_{ST,}$ suggesting that they exchange alleles freely and do not show any genetic structure. The population from Maranhão is well sructured in relation to the others with a low number of migrants; this population appears to be derived from the population in São Paulo. The NJ phylogeographic tree constructed using the F_{ST} values indicates the division of the analyzed populations into two groups separated by the Amazon River. The northern group is represented by the populations in Amapá, Roraima (Surumu, Homoxi and Caroebe) and Amazonas, while the southern group is represented by Maranhão, the Rio Verdão site in Goiás, and São Paulo. The results obtained by cytological and molecular techniques suggested that the *S. guianense s.l.* populations analyzed, in general, do not constitute a species complex, as has been suggested by some authors, even though the populations had high genetic variability. The only exception is the population from Goiás (Rio Ponte de Pedra), which probably represents a species that is new to science.

Keywords: cytotaxonomy, COI, haplotype network, Simuliidae, oncocerciasis vector

RESUMO

A espécie *Simulium guianense s.l.* Wise é incriminada como principal vetor de *Onchocerca volvulus* Leuckart, causadora da oncocercose no foco Amazônico, localizado no norte da América do Sul. Os objetivos do presente estudo foram analisar diferentes populações dessa espécie utilizando cromossomos politênicos e seqüências da região do gene mitocondrial COI, para avaliar as relações entre essas diferentes populações. Para a análise cromossômica, os espécimes foram coletados nos estados do Amazonas, São Paulo e Goiás (Rio Ponte de Pedra) e para a análise molecular foram coletados nos estados do Amazonas, Amapá, Goiás (Rios Ponte de Pedra e Verdão), Maranhão e Roraima (uma população na área do foco de oncocercose-Homoxi e, duas fora da área do foco, Caroebe e Surumu). Os cromossomos politênicos das populações analisadas foram comparados com mapas estabelecidos anteriormente para essa espécie. As análises citológicas do padrão de bandas dos cromossomos politênicos mostraram inversões polimórficas, na condição heterozigota nas populações do Amazonas e São Paulo, e a de Goiás (Rio Ponte de Pedras) apresentaram duas inversões fixas. Comparando 702 pb da região do gene mitocondrial COI das nove populações estudadas, um valor considerável de sítios polimórficos foram observados, permitindo estudos populacionais e filogeográficos. Um cladograma representativo foi construído a fim de relacionar os haplótipos detectados, permitindo observar que as populações do norte, Amapá, Amazonas e RR-Caroebe compartilham um mesmo haplótipo, enquanto a área do foco Amazônico (RR-Homoxi) está mais relacionada com as populações de RR-Surumu, compartilhando um haplótipo em comum. As populações de São Paulo e Goiás, Rio Verdão (das regiões sudeste e centro-oeste, respectivamente) apresentam elevada variabilidade haplotípica, onde cada indivíduo é representado por um haplótipo. A população do Rio Ponte de Pedra, de Goiás não compartilhou haplótipos com as outras populações estudadas, nem mesmo com a do Rio Verdão, também em Goiás, localizada a aproximadamente 50 Km de distância. As populações do Amazonas e RR-Caroebe apresentaram valores negativos de $F_{ST,}$ sugerindo que elas, trocam alelos livremente, representando uma população sem estrutura genética. A população do Maranhão, que se mostrou bem estruturada em relação às outras, tem baixo número de migrantes, mas parece ser derivada da população de São Paulo. Usando os valores de F_{ST} uma árvore filogenética de NJ foi gerada e pode-se observar uma separação entre os grupos ao norte da calha do Rio Amazonas, representados por indivíduos do Amapá, RR (Surumu, Homoxi e Caroebe) e Amazonas, e outro ao sul da calha do Rio Amazonas (Maranhão, GO-Rio Verdão e São Paulo). Os resultados obtidos, utilizando técnicas citogenéticas e moleculares, sugerem que as populações de *S. guianense s.l.* analisadas, no geral, não fazem parte de um complexo de espécie, como sugerido por alguns autores, apesar de apresentar acentuada variabilidade genética. A exceção é a população de Goiás (Rio Ponte de Pedra) que, provavelmente, representa uma nova espécie para a Ciência.

Palavras chaves: citotaxonomia, COI, rede de haplótipos, Simuliidae, vetor de oncocercose.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação geral e distribuição

Os simulídeos são conhecidos popularmente por diversos nomes, como “black fly”, na língua inglesa e “jejene”, nos países latino-americanos (Crosskey, 1990). No Brasil, são designados “borrachudos”, no centro e sul do país e “piuns”, na região norte e nordeste (Campos-Gaona & Andrade, 1999). São pequenos insetos incluídos na ordem Diptera, com venação das asas pouco desenvolvida e pertencem à subordem Nematocera, família Simuliidae. Os adultos são, geralmente, de coloração escura e apresentam asas largas e têm aspecto corcunda (Triplehorn & Johnson, 2005).

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).

Esta família é dividida em duas sub-famílias: Simuliinae e Parasimuliinae e inclui aproximadamente 1.800 espécies. A sub-família Simuliinae tem distribuição cosmopolita, enquanto que a Parasimuliinae ocorre somente na região Neártica (Crosskey & Howard, 2004). Das 350 espécies neotropicais, cerca de 94 estão assinaladas para o Brasil (Crosskey & Howard, 2004). Todas as espécies dessa região pertencem à sub-família Simuliinae, que contém duas tribos, cada uma com apenas um gênero: Prosimuliini (*Lutzsimulium*) e Simuliini (*Simulium*). O gênero *Simulium* é subdividido em 45 subgêneros, dos quais 12 são Neotropicais (Adler *et al.*, 2004).

A espécie *Simulium guianense* Wise *s.l.*, 1911 tem sido colocada em dois subgêneros, *Trichodagmia* ou *Thyrsopelma*, dependendo da classificação utilizada pelo pesquisador (Crosskey & Howard, 2004, Miranda-Esquivel & Coscarón, 2001). Essa espécie apresenta ampla distribuição na América do Sul, sendo encontrada no Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Venezuela e Brasil. No Brasil, já foi registrada nos estados do Amapá, Amazonas, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro, Roraima, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins (Crosskey & Howard, 2004).

1.2. Biologia dos Simulídeos

Os Simuliidae são holometábolos, isto é, têm desenvolvimento completo. Seu ciclo de vida compreende quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 1).

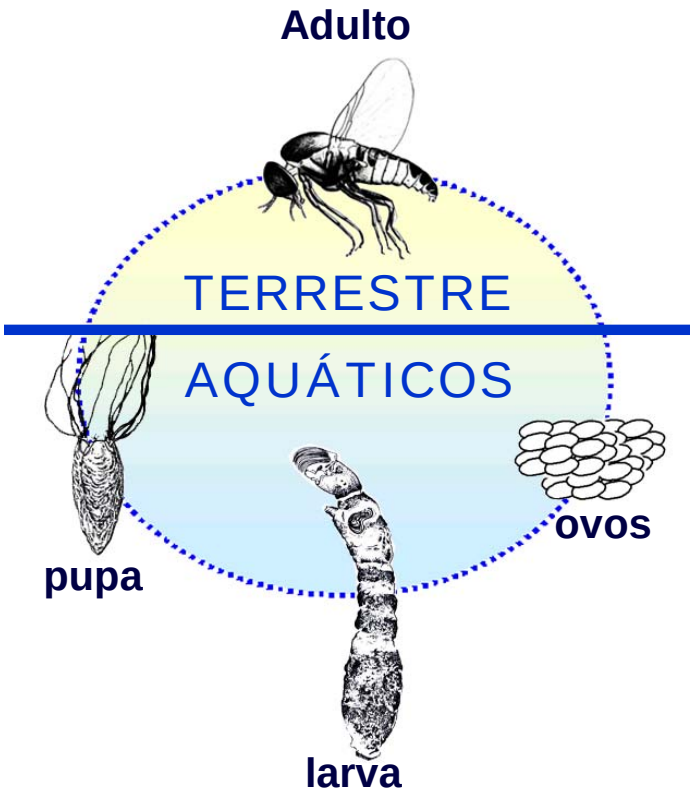

Figura 1– Ciclo de vida de *Simulium daltanhani* Hamada & Adler (Diptera: Simuliidae) com os quatro estágios de desenvolvimento.

Os estágios imaturos estão limitados a ambientes com água corrente e se prendem aos substratos por meio de um anel com ganchos, situado na extremidade posterior do abdome. As larvas são filtradoras não seletivas, alimentam-se de plâncton, perifíton ou pequenos macroinvertebrados (Alencar *et al*., 2001). O desenvolvimento larval passa por seis a nove estádios, de acordo com a espécie e/ou condições ambientais (Crosskey, 1990).

Os machos adultos, em sua maioria, se alimentam de néctar de flores ou seiva de plantas (Neves, 1979). As fêmeas adultas de algumas espécies podem ser autógenas (não necessitam de repasto sanguíneo para o amadurecimento de seus ovos) ou então são anautógenas (necessitam de uma refeição de sangue para maturação de seus ovos) (Cunha, 2001).

Os imaturos podem ser encontrados em uma ampla variedade de criadouros, desde cachoeiras, corredeiras e saídas de barragens até pequenos cursos d'água, com pouca

correnteza. São as fêmeas que definem o habita dos imaturos, de acordo com as condições físicas e químicas dos criadouros, uma vez que são elas que determinam onde os ovos serão depositados (Hamada & McCreadie, 1999).

1.3. Importância da família Simuliidae

Algumas espécies causam prejuízos econômicos quando em alta densidade, pois atacam o rebanho e trabalhadores rurais provocando grande incômodo, resultando em redução na produtividade agro-pastoril. Áreas turísticas também podem ser afetadas quando espécies antropofílicas dessa família se encontram em alta densidade, tornando essas áreas inacessíveis (Shelley *et al*., 1997; Campos-Gaona & Andrade, 1999). Entretanto, a maior importância desses insetos é na área médico-veterinária, uma vez que fêmeas hematófagas de algumas espécies podem ser potenciais vetores de agentes etiológicos como vírus, bactérias, protozoárias e helmintos (Adler, 1994).

Os simulídeos estão diretamente envolvidos na transmissão de leucocitozoonoses, conhecida como "malária" de aves, causada pelo protozoário *Leucocytozoon*. Podem também transmitir a oncocercose bovina, uma infecção não-patogênica causada por uma filária do gênero *Onchocerca*. Algumas espécies podem causar alergias nos rebanhos, reduzindo a produção de leite, diminuindo o peso do animal e a produção de ovos, em aves (Campos-Gaona & Andrade, 1999).

Em relação à sua importância médica, algumas espécies podem veicular agentes patogênicos causadores de doenças ao homem, tal como a Mansonelose, causada pela filária *Manzonella ozzardi* Manson com ocorrência no norte da América do Sul (Shelley *et al*., 1982); e uma das doenças humanas mais conhecida tendo os simulídeos como vetor, a Oncocercose, também denominada "cegueira dos rios" provocada pela filária *Onchocerca volvulus* Leuckart, endêmica na África, América Central e América do Sul (Shelley *et al*., 1997).

1.4. Estudos epidemiológicos

Shelley *et al.* (1997) apresentaram a distribuição e biologia, bem como uma chave de identificação de 40 espécies de simulídeos da área do foco de oncocercose na Amazônia, com ênfase no Brasil. Seis, das 14 espécies registradas na partes brasileiras do foco, são antropofílicas, sendo *S. guianense s.l.* e *Simulium incrustatum* Lutz as principais espécies vetores em altitudes elevadas (Auaris e Surucucus) e *Simulium oyapockense* Floch &

Abonnenc / *S. roraimense* Nunes de Mello em localidades de floresta de planícies (Toototobi, Catrimani, Mucajai, Parimiu) acompanhadas por *Simulium exiguum* Roubaud em certas estações em Toototobi e Catrimani (Shelley *et al*., 1997).

Estudos epidemiológicos, incluindo os índices de transmissão de *O. volvulus* na comunidade Watatas, no pólo-base Xitei/Xidea (área Yanomami) em Roraima, indicam que *S. guianense* é a espécie com maior potencial de transmissão mensal, no período da vazante dos criadouros, que compreende os meses de julho a outubro, ocorrendo com menor intensidade no período da seca (novembro-dezembro) (Py-Daniel *et al.*, 2000).

Em Minaçú (300 Km ao norte de Brasília, no estado de Goiás) um novo foco de oncocercose foi descoberto, tendo sido coletada com freqüência a espécie *S. guianense s.l.* junto com outras três também antropofílicas, com maior abundância na estação seca, enquanto que na estação chuvosa, desapareceram ou foram ausentes (Shelley *et al.*, 2001).

Como garimpeiros que trabalham em áreas hiper e mesoendêmicas do foco Amazônico, em Roraima, se deslocam constantemente para outras áreas de garimpo em todo Brasil (*e.g.* Pará, Mato Grosso, Rondônia, Goiás, Tocantins), e algumas dessas áreas abrigam espécies de Simuliidae vetores da *O. volvulus*, presumi-se que novos focos de oncocercose poderão surgir em outras regiões do Brasil (Shelley, 2002).

1.5. Espécies crípticas

Na família Simuliidae, assim como em outros Diptera, é comum a ocorrência de espécies crípticas, espécies que se assemelham em sua morfologia, mas são diferenciadas em aspectos biológicos e reprodutivos (Rothfels *et al*., 1979a). Muitas morfoespécies descritas provavelmente compõem complexos de espécies crípticas (Rothfels, 1988).

Na região Neotropical, oito das 11 espécies vetores de *O. volvulus* são suspeitas de comporem um complexo de espécies crípticas (Shelley *et al*. 1997). Variações nos hospedeiros utilizados por fêmeas de *S. guianense* de diferentes populações (por exemplo: no foco brasileiro de oncocercose, *S. guianense* é antropofílica em áreas de altitude elevada e zoofílica em altitudes mais baixas; no sul da Venezuela é zoofílica fora do foco e antropofílica dentro do foco). Estas variações de hábitos hematófagos sugerem que essa espécie possa ser composta por um complexo de espécies (Shelley *et al.*, 1997; Grillet *et al.*, 2001).

1.6. Estudos citotaxonômicos

A utilização de outros métodos de identificação, além de morfologia convencional usados em estudos tradicionais, é importante para auxiliar na resolução de problemas taxonômicos. Principalmente para determinar se espécies filogeneticamente próximas que apresentam similaridades morfológicas, nomeadas morfoespécies, são compostas por duas ou mais espécies crípticas (Rothfels, 1988).

Métodos citogenéticos, utilizando cromossomos politênicos, têm sido muito úteis para resolver esse tipo de problema na família Simuliidae (Muñoz de Hoyos, 1996; Hamada & Adler, 1999). Essa família, assim como outras da ordem Diptera, apresenta cromossomos politênicos (mais desenvolvidos nas células de glândulas salivares) que facilitam estudos dessa natureza (Guerra, 1988).

Cromossomos politênicos são cromossomos gigantes formados por uma série de endomitoses sem que ocorra a divisão do núcleo. Ocorre o pareamento cromômero a cromômero, dos pares homólogos, originando um padrão alternado de faixas transversais escuras e claras no cromossomo. Quando a politenização ocorre, replicando as cromátides, as faixas escuras e claras tornam-se evidentes, estabelecendo o padrão de bandas e interbandas, que caracteriza os cromossomos politênicos (Junqueira & Carneiro, 1998) (Fig. 2).

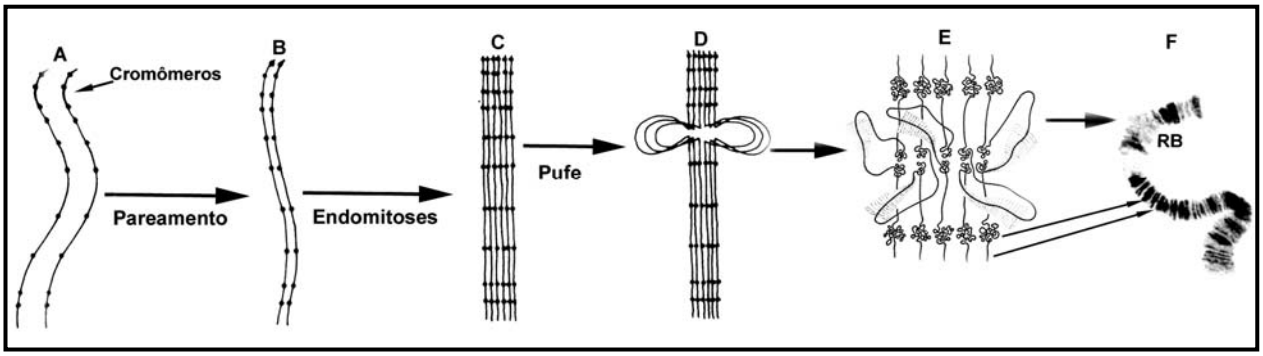

Figura 2. Processo de politenização em cromossomos interfásicos e formação de *puffs*. (Fonte: Modificada de Guerra, 1988 e Junqueira & Carneiro, 1998).

O padrão de bandas e interbandas dos cromossomos politênicos é espécie-especifico, e em geral é característica particular desse cromossomo em diferentes tecidos ou em diferentes fases de desenvolvimento (Zhimulev, 2001).

Quando os cromômeros tornam-se menos densos formam umas estruturas globulares conhecidas por *puffs*, essa descondensação é resultante de intensa atividade nessa região cromossômica em determinado período, com um aumento considerável de RNA, tendo um significado fisiológico (Polizeli, 1999). Estes *puffs* podem ser distinguidos como um

alargamento ou desaparecimento total da banda, tornando-se bem variados e conservados, podendo servir de marcadores para diferenciar os braços cromossômicos (Guerra, 1988).

Espécies de Simuliidae, em geral, apresentam número haplóide de n = 3, raramente n = 2, no caso de *Cnephia pallipes*, espécie da região Paleártica e do subgênero *Eusimulium* (Procunier, 1982; Leonhardt, 1985).

Os cromossomos são numerados de I a III, de acordo com o seu comprimento, sendo o I maior que o II, e este maior que o III. Os braços cromossômicos são caracterizados por seu tamanho relativo e pela presença de marcadores característicos de cada braço (Rothfels, 1988). Marcadores específicos de cromossomos politênicos, como inversões (fixas e polimórficas), heterobandas e puffs são úteis para caracterizar espécies, auxiliando na identificação e distinção das mesmas, em conjunto com métodos taxonômicos tradicionais (Kuvangkadilok *et al.*, 2003). O mapa cromossômico padrão é estabelecido a partir dos braços que apresentam a seqüência mais comum dentro de um grupo de espécies, sobre as quais as comparações estão sendo realizadas (Rothfels, 1979 a).

Citoespécies ou espécies crípticas podem ser definidas, dentro de morfoespécies analisadas, quando configurações dos cromossomos politênicos, e as variações intrapopulacionais são obtidas, elucidando a existência de um complexo de espécies juntamente com características morfológicas (Muñoz de Hoyos, 1996).

Na região Neotropical, quatro espécies de interesse médica, suspeitas de comporem complexos de espécies foram estudadas por meio de seus cromossomos politênicos: *Simulium metallicum* Bellardi que apresenta 12 citótipos (Arteaga & Muñoz de Hoyos, 1999), *S. oyapockense* dois citótipos, (Procunier *et al.*,1987), *Simulium ochraceum* Walker três citótipos (Hirai & Uemoto, 1983) e *S. guianense* quatro citótipos (Charalambous *et al.*,1996). No Brasil, poucas pesquisas citotaxonômicas com simulídeos têm sido realizadas, dentre elas, podemos citar as realizadas por Charalambous *et al*. (1996), que estudaram *S. guianense s.l.,* provenientes de cinco localidades brasileiras (Goiás, rios Tocantins e Mucambão; Amapá, Maranhão e Pará); Campos-Gaona *et. al*. (1996, 2001), que descreveram os cromossomos politênicos de *Simulium pertinax* Kollar da região sudeste e sul os quais foram comparados entre populações tratadas e não tratadas com inseticidas; Hamada & Adler (1999), descreveram os cromossomos de quatro membros do grupo *perflavum* da Amazônia, *Simulium rorotaense* Floch & Abonnenc, *Simulium perflavum* Roubaud, *Simulium trombetense* Hamada, Py-Daniel & Adler e *Simulium maroniense* Floch & Abonnenc (esta última espécie composta por quatro citótipos). Na Amazônia, espécies têm sido diferenciadas, por poucas inversões fixas, tais como *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello e

Simulium ulyssesi (Py Daniel & Coscarón) (Rios-Velasquez *et al.*, 2002) e *Simulium cauchense* Floch & Abonnenc e *Simulium quadrifidum* Lutz (Alvan-Aguilar *et al.*, 2005).

1.7. Estudos moleculares

Avanços nas técnicas de biologia molecular têm permitido a obtenção de importantes dados que têm sido integrados a análises sistemáticas, permitindo estudos sobre a estrutura genética de populações e possibilitando realizar inferências sobre divergências genéticas ocultas entre espécies crípticas ou espécies próximas (Sbordoni, 1993).

Uma ampla diversidade de marcadores moleculares, de proteínas a DNA, está disponível para pesquisas em entomologia, auxiliando estudos de filogenia, evolução, ecologia e dinâmica de população (Loxdale & Lushai, 1998). Dentre esses marcadores, podem ser citados: Eletroforese de aloenzima, RFLP (Longos Fragmentos Polimórficos de Restrição), Microssatélites, RAPD (Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados ao Acaso) e análises de seqüências de genes mitocondriais e nucleares amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Loxdale & Lushai, 1998).

Exemplos de pesquisas utilizando ferramentas moleculares para esclarecer questões sobre estrutura populacional em Diptera foram realizadas sobre *Anopheles albimanus* Wiedmann (PCR de NADH desidrogenase de DNA mitocondrial, subunidade 5-ND5), *Anopheles darlingi* Root (isoenzima, RAPD-PCR e Marcadores do Espaçador Transcrito Interno 2 de DNA ribossomal) e *Anopheles nuneztovari* Gabaldón (endonucleases de restrição nas seqüências de DNA mitocondrial) (Merida *et al.*, 1999; Manguin *et al.*, 1999; Scarpassa *et al.*, 2000).

Filogenias moleculares com espécies da subfamília Anophelinae puderam ser construídas a partir da combinação de dois conjuntos de seqüências de genes, usando a porção da subunidade 1 e 2 do gene de Citocromo Oxidase (COI e COII) e a subunidade menor do RNA ribossomal, 18S (Sallum *et al.*, 2002). Em barbeiros do gênero *Rhodnius,* análise das seqüências de Citocromo b, e subunidade maior do RNA ribossomal, e região variável do D2, separam uma espécie do grupo prolixus, com alta estrutura genética quando comparada com outras espécies desse grupo (Monteiro *et al.*, 2000).

O DNA mitocondrial (DNAmt) é composto pelas seguintes regiões codificantes: ND2, COI, COII, ATP, COIII, ND3, ND4, ND5, ND6, Cyt b, NDI, 16S e 12S (Loxdale & Lushai, 1998). Sendo muito utilizadas as seqüências do gene Citocromo Oxidase, subunidade I, na identificação de espécies crípticas e para estabelecer relações filogenéticas entre espécies relacionadas. Exemplos de estudo dessa natureza podem ser visualizados no estudo

das relações entre cinco populações de diferentes localidades de *Culicoides imicola* Kieffer e em *Chironomus* (Sharley *et al.,* 2004; Linton *et al*., 2002).

Pesquisas feitas em simulídeos usando marcadores moleculares têm sido desenvolvidas na resolução de problemas com classificações taxonômicas que envolvem espécies vetores de oncocercose, principalmente no complexo de espécies *Simulium damnosum* Theobald, do oeste da África, como exemplo podemos citar os trabalhos que envolvem as Regiões do espaçador intergênico (IGS) do rDNA, IGS 5'e 3' que foram seqüenciadas com o objetivo de desenvolver marcadores moleculares para cinco citoespécies do complexo de simulideos *S. damnosum,* do oeste da África (*Simulium sanctipauli*, Vajime & Dunbar *S. sirbanum* Vajime & Dunbar, *S. soubrense* Vajime & Dunbar, *S. squamosum* Enderlein e *S. yahense* Vajime & Dunbar). Porém nenhuma diferença específica nessas duas regiões foi detectada para essas espécies (Morales-Hojas *et al*., 2002a). Morales-Hojas *et al*. (2002b) ao descreverem as seqüências IGS-ETS, 18S e 28S do gene ribossomal de *S. sactipauli,* completaram o conjunto gênico de rDNA juntamente com o ITS-1, ITS-2 e 5,8, fazendo de *S. sanctipauli,* a segunda espécie de Diptera de importância médica, depois de *Anopheles albimanus* Weidemann, com o genoma do rDNA completamente seqüenciado.

Também seis membros do complexo *S. damnosum s.l.* (*S. damnosum s. str*., *S. sirbanum*, *S. sanctipauli, Simulium leonense* Boakye, Post & Mosha, *S. squamosum* e *S. yahense*) foram analisados por meio das seqüências dos genes de DNA mitocondrial, 16S e ND4, neste trabalho foi observado que o gene 16S é altamente conservado em espécies da África, mas quando comparado com espécies de simulídeos das América (*S. vittatum* Zetterstedt, *S. bivittatum* Malloch, *S. meridional* Riley, *S. decorum* Walker e *S. venustum* Say) mostrou-se bem distinto (Tang *et al.*, 1995).

Estudos em Simuliidae usando análises das seqüências de COI de DNAmt vem sendo realizados, mostrando grande êxito, para responder sobre radiação insular envolvendo o subgênero *Inseliellum*, na Polinésia Francesa (Joy & Conn, 2001), e em estudos filogeográficos intraespecífico em *Simulium tani* Takaoka & Davies, da Tailândia, permitindo inferências históricas e atuais da ecologia, estrutura genética da população e diversidade da espécie (Pramual *et al.,*2005).

Estudos similares, usando a análise das seqüências de COI de DNAmt em *S. guianense s.l.*, de nove populações geográficas, incluindo a população do foco de oncocercose no Brasil, estão sendo desenvolvidos neste trabalho para verificar a variabilidade genética e as relações filogeográficas entre as diferentes populações.

1.8. Justificativa

As variações morfológicas observadas em algumas espécies de Simuliidae são difíceis de serem interpretadas como intraespecíficas ou interespecíficas, sem informações adicionais, tais como dados citológicos e/ou moleculares. A identificação de espécies crípticas em populações de insetos vetores de doenças é essencial para estudos epidemiológicos (Shelley *et al*., 2000).

A espécie *S. guianense s.l.* é incriminada como uma das espécies vetores de *O. volvulus,* causadora da oncocercose ou cegueira dos rios no Brasil e na Venezuela. Devido a sua ampla distribuição geográfica e presença de populações antropofílicas e zoofilicas, essa espécie é suspeita de compor um complexo de espécies (Shelley, 1997).

Marcadores moleculares e estudos citotaxonômicos têm sido utilizados como ferramentas para distinguir espécies que compõem complexos de espécies. Entretanto, estudos com marcadores moleculares vêm sendo desenvolvidos, principalmente com *S. damnosun s.l.*, que é constituída por um complexo de espécies vetores da *O. volvulus* na África.

Enquanto nas extensas áreas endêmicas ocidentais da África o conhecimento da biologia dos citótipos do vetor em um país pode ser aplicado aos países vizinhos, permitindo um programa de controle continental, nas Américas a natureza do foco de oncocercose necessita de estratégias de controle individuais para cada foco, pois o padrão de endemicidade de oncocercose é diretamente relacionado à presença das espécies de simulídeos, e pesquisas de morfoespécies e citoespécies do vetor ainda estão em desenvolvimento para melhor entender a epidemiologia e conseqüentemente, como controlar essa doença (Shelley, 2002).

A distinção de espécies crípticas é essencial, já que estas podem apresentar biologia, distribuição e capacidade vetorial diferentes. Quando não é possível reconhecer a população alvo, em casos de espécies de interesse médico/veterinário, ou econômico, as ações de controle da populacional resultam em dispêndio extra de energia e dinheiro (Shelley, 2002). Polimorfismos cromossômicos têm sido comumente registrados em simulídeos e evidenciam variabilidade geográfica e/ ou temporal (Bedo, 1979). Porém, como as ausências de diferentes polimorfismos cromossômicos não necessariamente são evidências conclusivas de reduzida variabilidade genética entre populações, estudos moleculares podem ajudar a resolver esse tipo de incertezas (Campos-Gaona *et al*., 2001). As seqüências de DNA mitocondrial são uma das regiões de DNA mais usadas para estudos evolutivos, em diversos níveis taxonômicos. Por isso, estão sendo utilizadas em uma ampla variedade de estudos em insetos e em outros grupos de organismos, devido a maior facilidade de isolamento, amplificação e devido às suas propriedades evolutivas (Caterino *et al.*,2000). Estas propriedades incluem tamanho e arranjo

de genes relativamente conservados, porém com alta razão de mutação, falta de recombinação com herança materna (haplótipos), sendo, portanto, mais sensível a eventos demográficos (Ex: *bottlenecks*) (Freeland, 2005).

Dessa forma, o presente estudo tem como hipótese central, testar, por meio de marcadores citogenéticos e moleculares, se as diferentes populações geográficas de *S. guianense* analisadas representa um complexo de espécies crípticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar populações geográficas de *S. guianense* para determinar se há diferenças intra e interpopulacionais, usando como marcadores cromossomos politênicos e seqüências de DNA mitocondrial.

2.2. Específicos

- Caracterizar cromossomicamente, por meio de inversões (fixas ou polimórficas) e marcadores universais (*puffs*) três populações de *S. guianense s.l.*, provenientes dos estados do Amazonas, Goiás (rio Ponte de Pedra) e São Paulo;
- Elaborar mapas citológicos para populações de *S. guianenses.l.* dos estados do Amazonas, Goiás (rio Ponte de Pedra) e de São Paulo;
- Comparar populações de *S. guianense s.l.* dos estados do Amazonas, Goiás (rio Ponte de Pedra) e de São Paulo com citótipos pré-estabelecidos por Charalambous *et al*. (1996);
- Determinar a composição nucleotídica da região do gene mitocondrial COI e estimar a variabilidade genética de nove populações provenientes dos estados do Amapá, Amazonas, Goiás (rios Verdão e Ponte de Pedra), Roraima (Caroebe, Surumu e Homoxi), Maranhão e São Paulo;
- Descrever a composição haplotípica das nove populações e desenhar uma rede de haplótipos das populações;
- Verificar as relações entre as diferentes populações geográficas por meio de uma árvore filogenética.

CAPÍTULO I

Citotaxonomia de populações de *Simulium guianense s.l.* Wise provenientes dos estados do Amazonas, São Paulo e Goiás, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais características para o estudo citotaxonômico em Diptera é a presença de cromossomos politênicos encontrados nas glândulas salivares e em outros tecidos (Carson & Kaneshiro, 1976). Aspectos comportamentais e ecológicos em Diptera são habitualmente associados a rearranjos estruturais observados em cromossomos politênicos. Em insetos vetores de agentes etiológicos, essas características têm sido muitas vezes, utilizadas para distinguir espécies crípticas vetores e não-vetores, que são morfologicamente indistinguíveis (White & Killick-Kendrick, 1975).

Em espécies da família Simuliidae, cromossomos politênicos das glândulas salivares de larvas são excelentes ferramentas para estudos citogenéticos, devido ao tamanho, facilidade de obtenção e pelo número reduzido (geralmente três pares de cromossomos). Estes cromossomos são especializados, no sentido que cada um contém ácidos nucléicos específicos e componentes protéicos que formam uma estrutura apropriada a sua situação (Muñoz de Hoyos, 1990). Pesquisas citológicas neste grupo têm mostrado que muitas morfoespécies (definidas através da morfologia convencional) compreendem mais de uma espécie biologicamente isolada, que se diferenciam em seu hábito reprodutivo (Rothfels, 1956; Dunbar, 1959). Porém, menos de 10% da fauna geral de simulídeos tem sido estudada citologicamente (Crosskey, 1988).

Rothfels (1989) sugere que em Simuliidae, especiação simpátrica é predominante, e a principal base desse mecanismo são as diferenças encontradas no cromossomo sexual. Adler *et al*. (2004) acreditam que rearranjos cromossômicos possivelmente são as forças motrizes do processo de especiação. Rearranjos estruturais em cromossomos politênicos podem ser observados como deleções, inserções, duplicações, heterobandas (bandas heteromórficas), translocações e cromocentros (Adler *et al.*, 2004).

Inversão (isto é, reversão de 180° na seqüência de bandas) é o tipo mais comum de rearranjo encontrado e leva à supressão do *crossing-over* (recombinação genética). Podem ser

de dois tipos: interespecíficas (inversões fixas) e intraespecíficas (inversões flutuantes ou polimorfismos) (Adler *et al.*, 2004). A maioria das inversões que ocorrem nos braços cromossômicos são paracêntricas (que não envolvem o centrômero), apenas 3% das inversões são pericêntricas (que envolvem o centrômero) (Bedo 1977).

Muitas espécies crípticas de *Simulium* têm sido diferenciadas pelo estudo detalhado do padrão de bandeamento específico das seqüências de cromossomos politênicos (Vajime & Dunbar, 1975; Rothfels, 1979a; Post, 1986; Duque *et al.,* 1988; Boakye *et al.,* 1993). Na região Neotropical, estudos cromossômicos sobre espécies envolvidas na transmissão de oncocercose têm sugerido a existência de espécies crípticas nas principais espécies vetores, *S. ochraceum*, no México e Guatemala (Hirai & Uemoto, 1983; Hirai, 1987; Millest, 1992); em *S. metallicum*, na Guatemala e Venezuela (Hirai 1985; Conn 1990; Conn *et al.*, 1989; Artega & Muñoz de Hoyos, 1999), *S. oyapockense*, no Brasil e Venezuela (Procunier *et al.,* 1987), *S. exiguum*, no Equador (Procunier *et al.*, 1985) e, provavelmente, *S. guianense s.l.,* no Brasil e Venezuela (Charalambous *et al.*, 1996).

Problemas com controle de vetores podem surgir quando membros em simpatria de um complexo de espécies diferem em sua capacidade vetorial (Shelley *et al*., 1987) ou preferência de habitat (Adler, 1987). Dessa forma, informações detalhadas sobre as espécies vetores são importantes para integrar e complementar estudo sobre a morfologia convencional (Luz *et al*., 1996).

Poucas espécies de *Simulium* foram estudadas citotaxonomicamente no Brasil (Campos-Gaona *et al.*, 1996, 2001; Hamada & Adler, 1999; Rios-Velásquez *et al.*, 2002, Pereira, 2004; Alvan-Aguilar *et al.*, 2005), sendo que o único trabalho publicado com espécie vetor foi realizado sobre *S. guianense s.l.* onde foi detectada a presença de quatro citótipos, mas em populações fora da área do foco de oncocercose (Charalambous *et al.*, 1996).

A espécie *S. guianense s.l.* é o principal vetor nas áreas de altitude elevada do foco amazônico, tanto no Brasil como no sul da Venezuela (Shelley *et al.,* 1997, Grillet *et al.*, 2001) e, devido à sua ampla distribuição no Brasil tem sido suspeita de compor um complexo de espécies crípticas. Dessa forma, para suprir a falta de conhecimento sobre essas espécies e melhor entender a dinâmica da oncocercose e as possibilidades de expansão dessa doença no Brasil estudos que envolvem essa espécie precisam ser intensificados.

Pelos fatos expostos acima, o objetivo desse estudo foi comparar três populações geográficas de *S. guianense s.l.* com o citótipo padrão (Charalambous *et al.,* 1996), pré-estabelecidos para essa espécie utilizando técnicas citogenéticas (pela análise do padrão de bandeamento dos cromossomos politênicos das larvas).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de coleta e características físicas e físico-químicas dos criadouros de larvas e pupas de *S. guianense s.l.*

As larvas foram coletadas em três rios: Amazonas, município de Presidente Figueiredo (rio Pitinga, cachoeira Quarenta Ilhas), Goiás, município de Montividiu (rio Ponte de Pedra) e São Paulo, município de Terra Roxa (rio Pardo) (Figs. 3 e 4) (Tabela 1).

Características físicas e físico-químicas do criadouro, tais como temperatura (T), potencial hidrogeniônico (pH), condutividade (C), largura (L) e altitude (A), foram obtidas a fim de observar se características estruturais dos cromossomos politênicos estão relacionadas aos fatores ambientais.

Tabela 1. Local de coleta dos exemplares de *Simulium guianense s.l.,* de diferentes estados do Brasil. Dados de localidade: coordenadas, datas e coletores (AM = Aline Mattos; DLP = Domingos Leonardo Pereira; MT = Mateus Pepinelli; NH = Neusa Hamada).

Localidade	Coordenadas da área	Data	Coletor
Amazonas, Presidente Figueiredo, UHE do rio Pitinga, cachoeira 40 ilhas.	00°53'S; 59°34'W	31.08.2005	AM & DLV
Goiás, Montividiu, estrada Montividiu-Paraúna, rio Ponte de Pedra (Tributário do Rio Verdão)	17°10'S; 50°50'W	21.05. 2006	NH & MP
São Paulo, Terra Roxa, estrada entre Viradouro e Terra Roxa, rio Pardo.	20°48'S; 48°15'W	17. 09.2005	NH & MP

Os cromossomos politênicos de *S. guianense s.l.* das populações analisadas foram comparados com os mapas cromossômicos estabelecidos para essa espécie por Charalambous *et al*. (1996) (Fig. 3, Tabela 2), para populações de diferentes localidades do Brasil.

Tabela 2. Procedência dos quatro citótipos de *Simulium guianense s.l.* no estudo realizado por Charalambous *et al*. (1996).

Citótipos	Localidade
A	Goiás, Km 4 abaixo da Hidrelétrica da Serra da Mesa (48° 09`W;13° 15`S) próximo a Minaçu, rio Tocantins.
A	Goiás, Estrada Minaçu-Palmeriópolis, Fazenda Santo Antônio (48° 22`W; 13° 14`S), rio Mucambão.
B	Amapá, Oiapoque, Cachoeira Maripá (51° 50`W; 4° 8`S), rio Oiapoque.
C	Maranhão, 30 Km de Imperatriz, na BR010, estrada Araguaina - Imperatriz (47° 29`W; 5° 33`S), rio Tocantins.
D	Pará, 30 Km de barco de Altamira, Cachoeira Paratizão (52° 13`W; 3° 22`S), rio Xingu.

2.2. Coleta e armazenamento do material

As larvas foram coletadas diretamente do substrato, com o auxílio de pinça, e fixadas em solução Carnoy (álcool absoluto e ácido acético, na proporção de 3:1). Essa solução foi trocada no mínimo duas vezes no campo e uma no laboratório. Todos os frascos foram devidamente etiquetados e mantidos refrigerados no campo; no laboratório os frascos foram estocados a 4°C até a realização das análises.

2.3 Triagem e identificação das larvas de *Simulium guianense s.l.*

No laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos, da Coordenação de Pesquisas em Entomologia, do INPA, as larvas foram colocadas em placas de Petri contendo Carnoy e, sob microscópio estereoscópio, foram identificadas, segundo características citadas em trabalhos de Hamada & Grillet (2001) e Shelley *et al*. (2002).

As larvas de *S. guianense s.l.* apresentam cerdas em forma de raquete, distribuídas em alta densidade ao longo do corpo. Após dissecção do histoblasto branquial podem ser observados 12 filamentos branquiais com ápice pontiagudo e esclerotinizado (Fig. 5). As larvas das populações de São Paulo e Amazonas apresentam um padrão de coloração diferenciado, variando dos tons de vermelho, amarelo, cinza ao marrom (Fig. 6). As larvas da população de Goiás (rio Ponte de Pedra) não apresentam essa variação na coloração, e têm coloração cinza escura (Fig. 7). E também, como já descrito por Shelley *et al.* (2002), as larvas de Goiás apresentam um par de tubérculos pronunciados na região dorso-lateral dos seguimentos 1-6 do abdome. Além disso, observamos que as cerdas em forma de raquete são mais globosas e os filamentos branquiais não apresentam estriações como as larvas de *S. guianense s.l.* de outras localidades (Figs. 5 e 7).

Foram analisadas larvas de último estádio, caracterizadas pela presença do histoblastos branquiais parcialmente (cinzas) ou completamente formados (escuros) (Figs. 5 e 7).

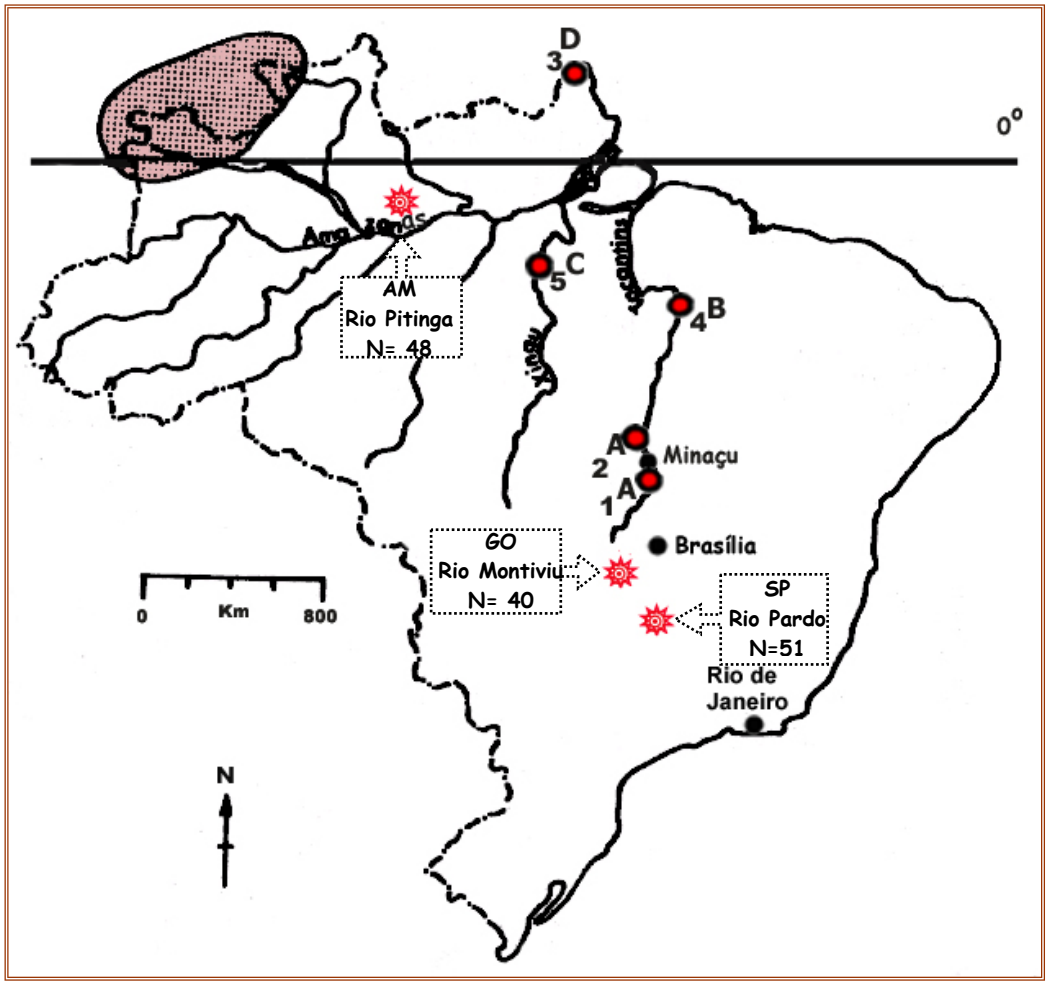

Figura 3. Mapa com a localização dos pontos de coletas dos citótipos pré-estabelecidos por Charalambous *et al.* (1996) (círculos em vermelho) e das populações de *Simulium guianense s.l.*, analisadas no presente estudo (estrelas em vermelho). Área hachurada representa área do foco de oncocercose. Fonte: modificado de Charalambous *et al.* (1996).

Figura 4. Paisagem dos locais de coleta das larvas de *Simulium guianense s.l.*: A) São Paulo, rio Pardo; B) Amazonas, rio Pitinga, cachoeira 40 ilhas; C) Goiás,rio Ponte de Pedra.

Figura 5. Características morfológicas de larvas de *Simulium guianense s.l.* coletadas nos estados do Amazonas e São Paulo. A) Larva de último estádio (setas indicando histoblasto braquial e cerdas ao longo do corpo). B) Histoblasto branquial com 12 filamentos. C) Cerdas ao longo do dorso. D) Detalhe das cerdas inseridas na cutícula.

Figura 6. Variação na coloração do corpo de larvas de último estádio de *Simulium guianense s.l.* coletadas nos estados do Amazonas e São Paulo, Brasil.

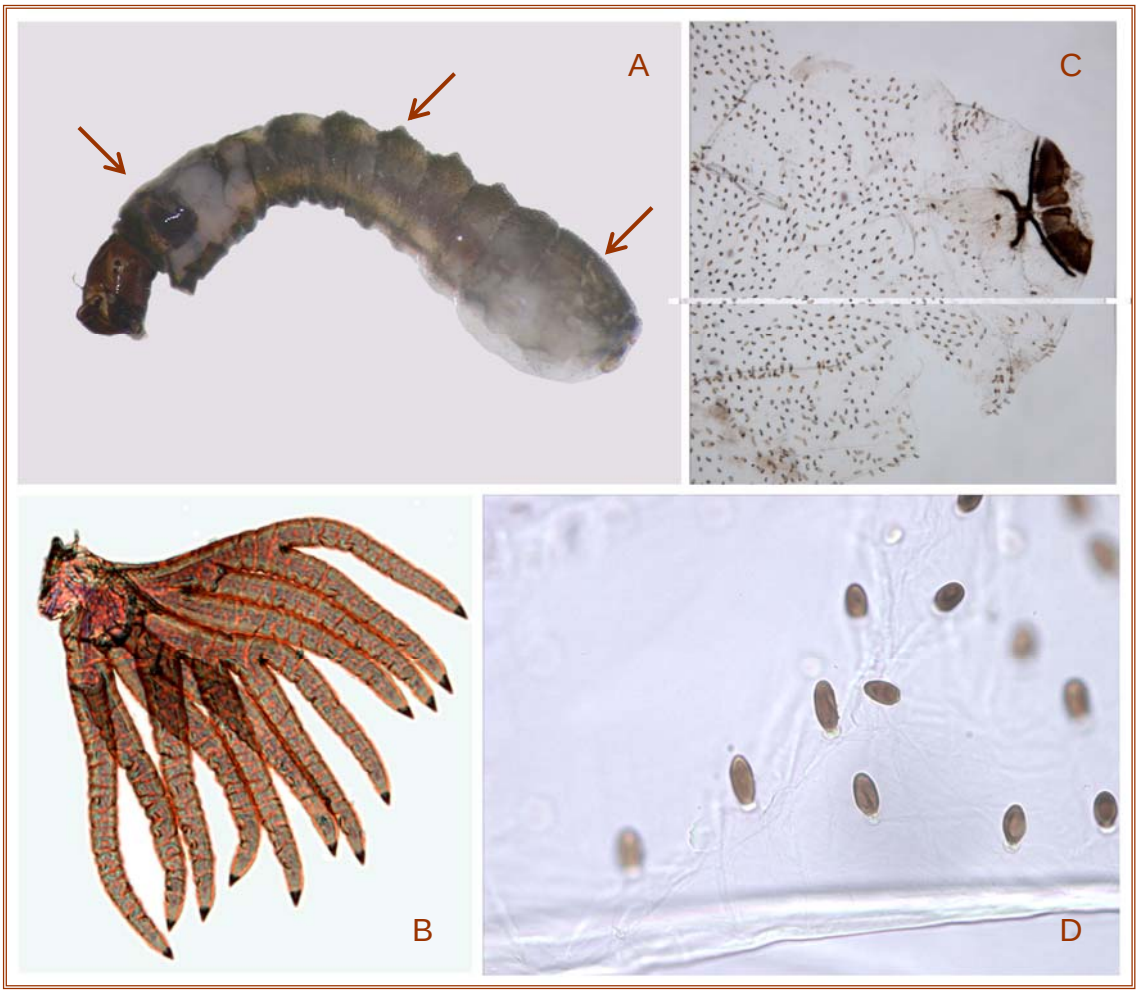

Figura 7. Características morfológicas de larvas de último estádio de *Simulium guianense s.l.*, coletadas em Goiás, rio Ponte de Pedra. A) Larva de último estádio (setas indicando histoblasto braquial, tubérculos e cerdas). B) Histoblasto branquial formado com 12 filamentos. C) Cerdas ao longo do dorso. D) Detalhe das cerdas inseridas na cutícula.

2.4. Técnica citológica

2. 4. 1. Coloração e obtenção dos cromossomos politênicos

Duas técnicas foram utilizadas para coloração dos cromossomos politênicos das larvas, o método de Feulgen (Rothfels & Dunbar, 1953), e a modificação dessa mesma técnica feita por Charalambous *et al.* (1996).

Na técnica de Feulgen é realizado um corte longitudinal, ventral no abdome da larva e esta é transferida para um frasco contendo água destilada, onde ela é mantida por 20 minutos. Após esse período, o excesso de secreção glandular é removido em papel absorvente úmido e a larva é transferida para um frasco contendo ácido clorídrico 1N (pré-aquecido por 30 minutos a 65ºC), por 10 minutos, na estufa. O ácido clorídrico é substituído por corante Feulgen, por 60 minutos, e depois, por água sulfurada, durante 12 minutos. Ao final, as larvas são lavadas em água destilada, duas vezes, por um minuto e mantidas refrigeradas, em água destilada, até a montagem da lâmina.

Na técnica de Feulgen modificada o procedimento é similar, mas a larva permanece em água destilada por 30 minutos. Após a retirada do excesso de secreção glandular, a larva é mantida por 30 minutos em ácido clorídrico 5N, em temperatura ambiente. Em seguida, as larvas são lavadas em água destilada por dois minutos, e são coradas com Feulgen por um período entre uma a três horas. O corante é substituído por água sulfurada, por 10 minutos, terminando com a lavagem em água e deixando refrigerar por duas a quatro horas, até a montagem das lâminas.

As técnicas de coloração que utilizam o corante Feulgen nos permitem a identificação do sexo da larva, observando *in situ* o formato do botão imaginal, oval para macho e alongado para fêmea (Figs. 8 A-D) (Puri, 1925). A identificação do sexo, por meio das gônadas, é importante para associar possíveis rearranjos cromossômicos com o sexo.

Em microscópio estereoscópio, a larva corada foi colocada sobre lâmina e as glândulas salivares foram removidas com alfinetes entomológicos, da região abdominal das larvas. Os núcleos das células contendo os cromossomos politênicos corados foram transferidos para uma gota de ácido acético a 50%, assim como uma das gônadas da larva, para posterior confirmação citológica do sexo. As gônadas do macho apresentam células com núcleos diferenciados enquanto que as fêmeas não (Figs. 8 E, F). Uma lamínula foi colocada sobre o material e os núcleos foram esmagados e examinados em microscópio óptico sob objetiva de imersão.

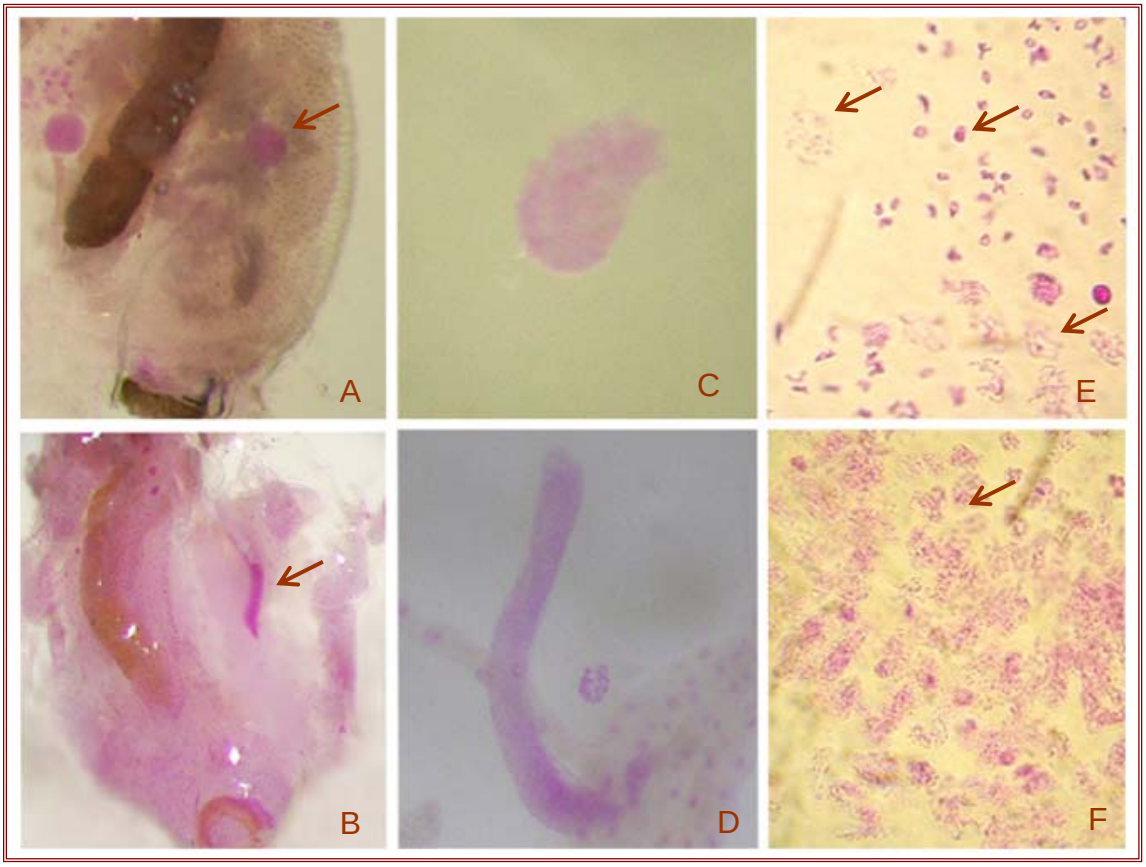

Figura 8. Larvas coradas para observação do sexo da larva; A) Larva do sexo masculino; B) Larva do sexo feminino. Setas indicam o botão imaginal *in situ*. C) Botão imaginal de macho, com formato oval D) Botão imaginal de fêmea, com formato alongado; E) Núcleos das células do botão imaginal da gônada de macho, em diferentes fases de desenvolvimento; F) Núcleos das células do tecido do botão imaginal da gônada de fêmeas, não diferenciados.

As lâminas preparadas são temporárias, mas pode-se prolongar sua vida útil conservando-as a -80°C.

As carcaças das larvas examinadas foram guardadas em tubos de plástico de 1,5 mL, com álcool 80%, etiquetadas e depositadas como material-testemunho na Coleção de Invertebrados do INPA.

2. 4. 2. Elaboração e análise dos mapas citológicos

Imagens dos braços cromossomos distendidos foram digitalizadas com auxílio de um capturador de imagens (Olympus Q-color 5 RTV) acoplado a um microscópio óptico. As imagens foram armazenadas em um banco de dados, para cada uma das populações analisadas, utilizando o software Q Capture e utilizadas para elaboração do mapa cromossômico.

Nos mapas cromossômicos, foram utilizadas as designações conforme a nomenclatura convencional para cromossomos politênicos de Simuliidae utilizada em estudos clássicos (Rothfels, 1978, Bedo, 1984), como segue abaixo:

Os cromossomos são numerados, em algarismos romanos, em ordem decrescente de acordo com o comprimento dos cromossomos, como I, II, III. O centrômero divide os braços cromossômicos em dois, um longo e outro curto, indicado como L e S, respectivamente. O complemento inteiro é dividido e numerado em 100 seções (1-100); o cromossomo I é dividido em 41 seções, o II em 30 e o III em 29. Inversões são numeradas em ordem de descoberta e codificadas com o braço em que ocorre (e.g.: uma inversão que ocorre no braço longo do cromossomo II é escrita IIL-1). A identificação dos braços cromossômicos é feita por marcadores específicos, conhecidos também como universais, as siglas foram assinaladas nos mapas e, mantidas em inglês. Por exemplo, o braço IS apresenta uma série de bandas finas na região terminal denominada rabo de perú: *Turkey tail* (Tt); o cromossomo IIS apresenta o Anel de Balbiani: *Ring of Balbiani* (RB) e o Trapezóide: *trapezoidal* (T); o braço IIL apresenta o marcador três bandas finas: *three Sharp* ('3'), localizado adjacente ao centrômero e o *Parabalbiani* (Pb), de posição variável nesse braço cromossômico, de acordo com a espécie. O cromossomo IIIS apresenta como marcadores a empola: *Blister* (Bl) e a cápsula: *capsule* (Ca).

A região organizadora do nucléolo tem localização fixa em uma mesma espécie, mas pode ocorrer em qualquer um dos três cromossomos, espécies relacionadas podem apresentar essa região na mesma seção ou em seção/braços cromossômicos diferentes.

As seqüências de bandas dos cromossomos dos espécimes analisados foram comparadas com o mapa padrão estabelecido para *S. guianense s.l.* por Charalambous *et al*. (1996). O citótipo A (população de Goiás, rio Tocantins e rio Mucambão) foi estabelecido como mapa padrão, pelos autores acima citados.

3. RESULTADOS

Os criadouros foram encontrados em altitudes que variaram entre 60 e 475 manm. A largura dos rios variou entre 40 e 100 m e, a temperaturas entre 21 e 29°C, com pH variando entre ácido a básico e condutividade elétrica abaixo de 10 µS/cm, com exceção do rio Pardo em São Paulo, que apresentou condutividade abaixo de 40 µS/cm (Tabela 3).

Tabela 3. Características físicas e físico-químicas dos criadouros amostrados de *Simulium guianense s.l.*: T = temperatura; C = condutividade elétrica, L = Largura do rio, A = altitude.

Local de Coleta-data	**Características ambientais**				
	T(°C)	**pH**	**C (µS/cm)**	**L(m)**	**A (manm)**
Amazonas, cachoeira 40 ilhas.	29	5,8	<10	±50m	60
Goiás, rio Ponte das Pedras.	21	6,7	<10	40m	671
São Paulo, rio Pardo.	26	7,6	<40	100m	475

Foram coradas 139 larvas, sendo 51 da localidade de São Paulo, 48 do Amazonas e 40 de Goiás (Tabela 4). Das duas metodologias de coloração utilizadas, as melhores lâminas obtidas foram as que seguiram o protocolo proposto por Charalambous *et. al*. (1996). Com a técnica de Feulgen convencional, os cromossomos coravam fracamente. Das 139 lâminas analisadas, 64% (n = 89) puderam ser lidas, enquanto que 36% (n = 50) não, por não corar de forma adequada, por problemas na montagem ou na qualidade dos cromossomos (Tabela 4) (Figs. 9A-F).

Do total de espécimes analisados completamente (n =89), 53% pertenciam ao sexo masculino e 42% ao feminino (Tabela 5). Não foi observado nenhum rearranjo cromossômico (inversões, heterobandas, expressão do Organizador Nucleolar ou assinápses) ligado ao sexo, indicando que o sistema sexual das populações analisadas é X0Y0.

Tabela 4. Número de larvas de *Simulium guianense s.l.* coradas para exame de lâminas dos cromossomos politênicos, quantidade de lâminas lidas e não lidas de machos e fêmeas.

Local de coletas	N (larvas coradas)	Lâm. Não lidas	Lâminas Lidas	
			Machos	Fêmeas
São Paulo	51	24	21	6
Amazonas	48	17	14	17
Goiás	40	9	12	19
Total	139	50	47	42

O complemento cromossômico de diferentes populações foi lido nas seguintes proporções: 53% (n = 27) para população de São Paulo, rio Pardo; 64,5% (n = 31) para população do Amazonas, Cachoeiras 40 Ilhas; e 77,5% (n = 31) para população de Goiás, rio Ponte de Pedra. (Tabela 5).

Tabela 5. Leitura do complemento cromossômico de larvas de *Simulium guianense s.l.* das diferentes populações, lidas completamente (LC) e lidas incompletamente (LI).

Locais de coleta	São Paulo (N= 27)		Amazonas (N=31)		Goiás (N=31)	
Braço cromossômico	LC	LI	LC	LI	LC	LI
IS	11 (43,31%)	7 (26,92%)	21 (67,74%)	3 (9,68%)	16 (51,61%)	3 (9,68%)
IL	12 (46,15%)	8 (30,77%)	22 (70,97%)	1 (3,22%)	14 (45,16%)	5 (16,13%)
IIS	20 (76,92%)	2 (7,69%)	23 (74,19%)	5 (16,13%)	14 (14,16%)	6 (19,35%)
IIL	16 (61,53%)	1 (3,85%)	21 (67,74%)	5 (16,13%)	14 (14,16%)	4 (12,90%)
IIIS	18 (69,23%)	2 (7,69%)	26 (83,87)	2 (6,45%)	18 (58,06%)	6 (19,35%)
IIIL	18 (69,23%)	6 (23,08%)	23 (74,19%)	4 (12,90%)	10 (32,26%)	7 (22,58%)

Foram obtidas 3942 fotos dos diferentes braços cromossômicos de *S. guianense s.l.*, sendo 868 de São Paulo, 841 do Amazonas e 524 de Goiás. Essas imagens foram armazenadas em um banco de dados para montagem dos mapas citotaxonômicos das populações de São Paulo, Amazonas e Goiás.

3.1. Morfologia geral do Complemento cromossômico

O complemento cromossômico de *S. guianense s.l.* das três populações geográficas estudadas, consiste de três pares de cromossomos diplóide (2n= 6), assim como na maioria das espécies de *Simulium* estudadas (*e.g*. Dunbar, 1959; Rothfels, 1979a, Campos *et al*., 1996; Kuvangkadilok *et al.*, 2003).

O tamanho dos cromossomos politênicos observado foi similar ao relatado na literatura, sendo o I> II> III, sendo o cromossomo I aproximadamente metacêntrico, enquanto os cromossomos II e III são submetacêntricos, com razão entre os braços de quase 1:2, o que é comumente encontrado neste grupo de insetos (Hirai *et al.*, 1994; Artega & Muñoz de Hoyos, 1999).

A região centromérica dos três cromossomos é bem distinta. O cromossomo I (IC) apresenta essa região bem expandida, compostas por bandas pouco nítidas. O cromossomo II (IIC) e III (IIIC) apresentam essas regiões bem conspícuas e semelhantes entre si. O IIC tem bandas dispostas paralelamente, com pouca definição, enquanto IIIC apresenta, em uma das cromátides, bandas paralelas e na outra, transversal (Fig. 10).

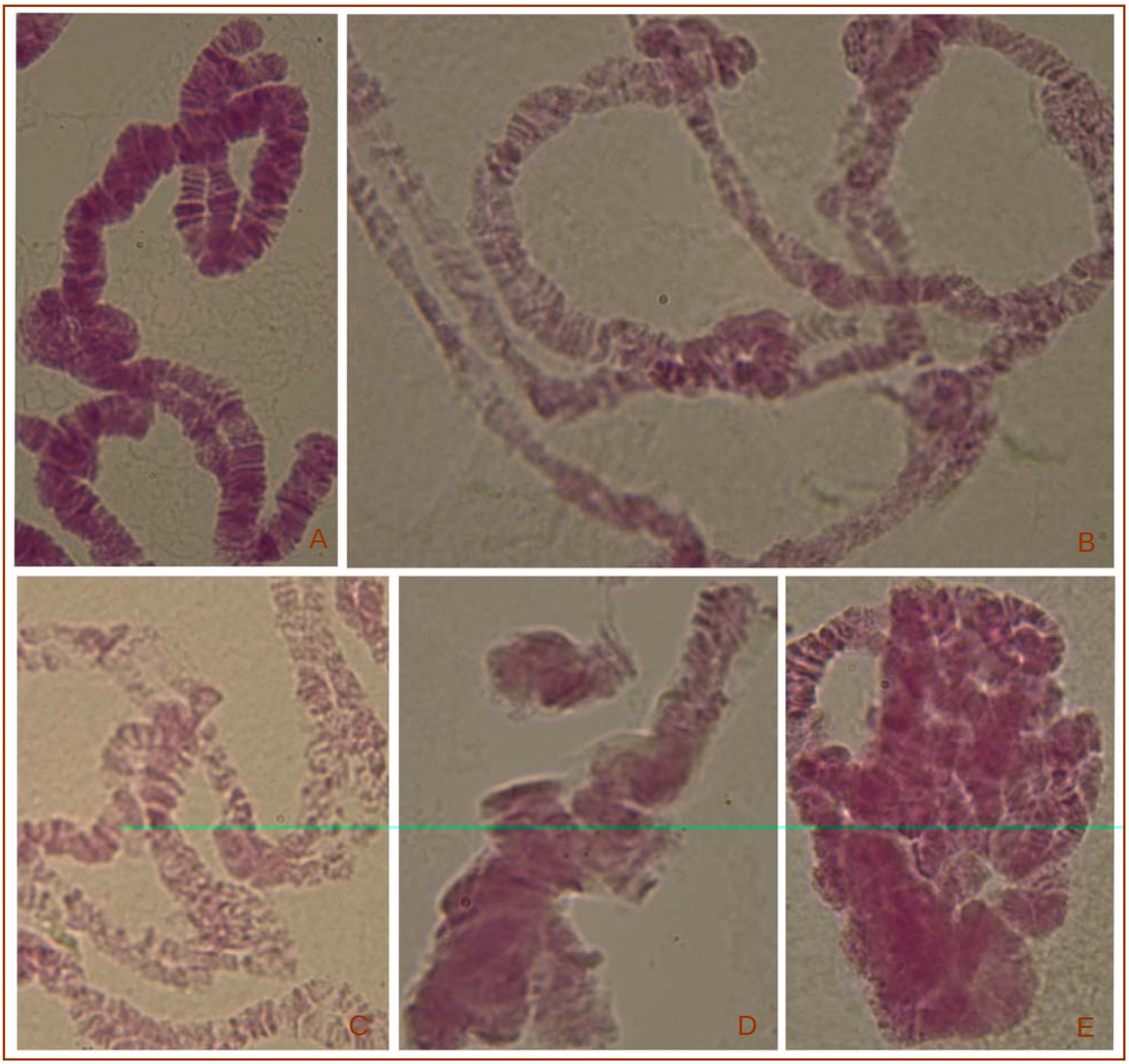

Figura 9. Lâminas com cromossomos politênicos das larvas de último estádio de *Simulium guianense s.l.* impossibilitados de leitura. A) Cromossomos muito corados; B) Com bandas pouco nítidas; C) Cromossomos degradados; D) Cromossomos quebrados; E) Cromossomos com braços enrolados.

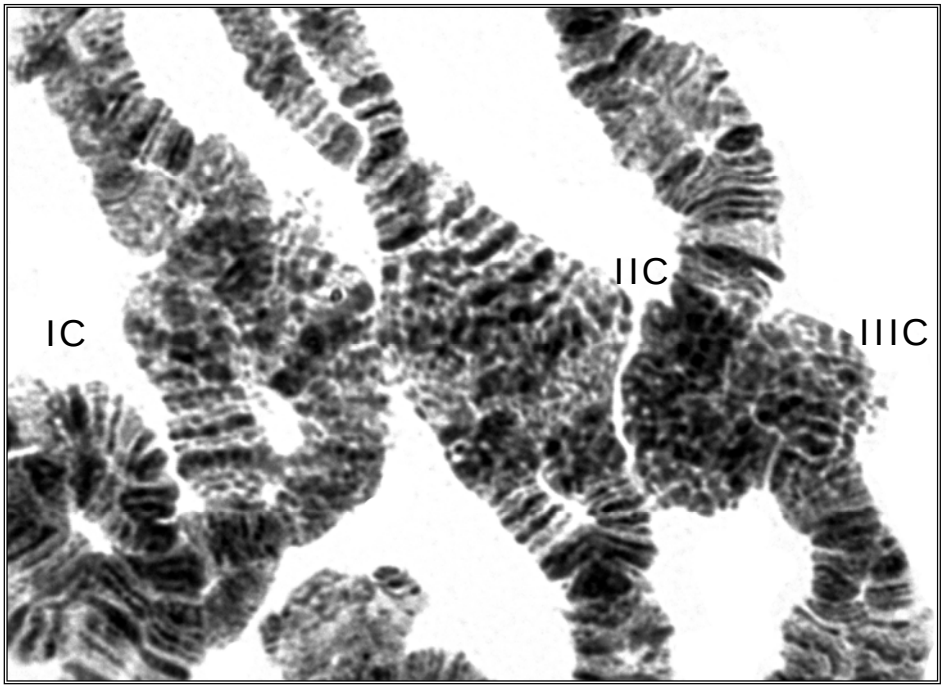

Figura 10. Região centromérica dos três cromossomos de *Simulium guianense s.l.* Nota: IC= Centrômero do Cromossomo I; IIC= Centrômero do Cromossomo II; IIIC= Centrômero do Cromossomo III.

3.2. Comparações entre o complemento cromossômico das três populações avaliadas com o citótipo A, estabelecido por Charalambous *et al.* (1996).

As populações de *S. guianense s.l.* estudadas apresentam seqüências de bandas nos três cromossomos similares às observadas no mapa padrão de *S. guianense s.l.*, citótipo A (Charalambous *et al*., 1996), com exceção das populações de Goiás que apresentam inversões fixas.

Cromossomo I (Figs. 11, 14 e 17)**:** Nas três populações geográficas estudadas, os marcadores que definem cada braço, tais como: dois pares de bandas pesadas, *Turkey Tail* (Tt) (seção1), uma banda fina entre duas pesadas 'sanduiche' (seção7), *Blister* (BI) (seção 13), e três bandas pesadas ('3') (seção16) foram encontrados nas mesmas posições no IS, tais como vistos no citótipo A (Charalambous *et al.*, 1996). Da mesma forma, os marcadores que caracterizam o braço IL, no citótipo A, banda pesada na seção 26, pequena *Blister* (BI) na região 35 e três bandas pesadas na seção 40, se encontram na mesma posição. A expressão homozigótica expandida (+/+) da 'Região Organizadora do Nucléolo' (NOR) não difere do padrão, ocorre uma quebra do braço IL nessa região, nas seções 24 e 25. Regiões assinápticas foram observadas com freqüência, nas regiões 16 a 18, 20 a 26, 31 a 32 e 37 a 40.

Cromossomo II (Fig. 12, 15 e 18)**:** Tal como observado no citótipo A (Charalambous *et al.*, 1996), os marcadores que determinam cada braço do cromossomo II foram encontrados nas mesmas posições, nas populações estudadas, no IIS: *Double bubble* (db) (seção 42), o 'Anel de Balbiani' (RB) (seção 49), o 'trapezóide' (T) (seção53); igualmente, no IIL, caracterizado pelo *Parabalbiani* (Pb) (seção 64), 'banda cinza' (gb) (seção 66).

O centrômero (IIC) está presente na seção 54. E esta seção compõe uma região assináptica que compreende as regiões 53 a 55; Assinápses também estão presentes na seção 62, 64 a 66 e 70 a 71.

As seções 67 a 68 diferem do citótipo A, no *puff* observado na seção 68, após as três bandas pesadas, que é expresso na seção 67, sem que ocorra inversão, esta característica foi observada nas três populações geográfica de *S. guianense s.l.* estudadas.

Cromossomo III (Fig. 13, 16 e 19)**:** Os principais marcadores que distinguem os braços cromossômicos estão localizados nas mesmas seções em que foram encontrados no citótipo A. No IIIS, o *Blister* (BI) e grupo de bandas pesadas (seção 74), a *Cápsula* (Ca) (seção 78), e o centrômero na seção 83, que se mostra assináptica, bem como as regiões 81 a 84, 90 92 e 100.

3.3. Inversões presentes nas três populações geográficas estudadas

As comparações foram feitas com o mapa padrão, estabelecido anteriormente e, com os outros citótipos encontrados para essa espécie por Charalambous *et al*. (1996) (Fig. 20).

Nas populações de São Paulo e Amazonas, foram observadas quatro inversões polimórficas paracêntricas, na condição heterozigota (ip), três delas não foram observadas nos citótipos estabelecidos anteriormente e uma, na população do estado do Amazonas, foi observada no citótipo A, de Goiás (rio Mucambão) (Tab. 6).

Na população de Goiás (rio Ponte de Pedra) estudada foram observadas inversões homozigotas (ii) não observadas em outras populações examinadas da mesma espécie (Tabela 6), indicando uma diferenciação maior.

A população do Amazonas apresentou inversões heterozigotas no braço IS, compreendendo as seções 8 a 12, na freqüência de 25%; e no braço IIL, na região que inclui as seções 58 a 63, na freqüência de 23% (Fig. 21).

Na população de São Paulo foram localizadas inversões nas condições heterozigotas nos braços IL e IIIS. No braço IL, a inversão abrange as seções 27 a 31, aparecendo na

freqüência de 45%. No braço IIIS, a inversão abrange as seções 78 a 80, na freqüência de 5% (Fig. 22).

Inversões homozigotas foram visualizadas nos braços IIS e IIIS, dos cromossomos politênicos da população de Goiás (rio Ponte de Pedra), em todos os indivíduos examinados (Figs. 18 e 19). Essas inversões envolvem os principais marcadores que identificam cada braço, no IIS abrange as regiões 43 a 50, envolvendo o 'Anel de Balbiani' (RB), que pode ser visto mais distal em relação ao centrômero, em vez de estar na região mediana. No IIIS, a região invertida envolve as seções 73 a 76, envolvendo o *Blister* (BI).

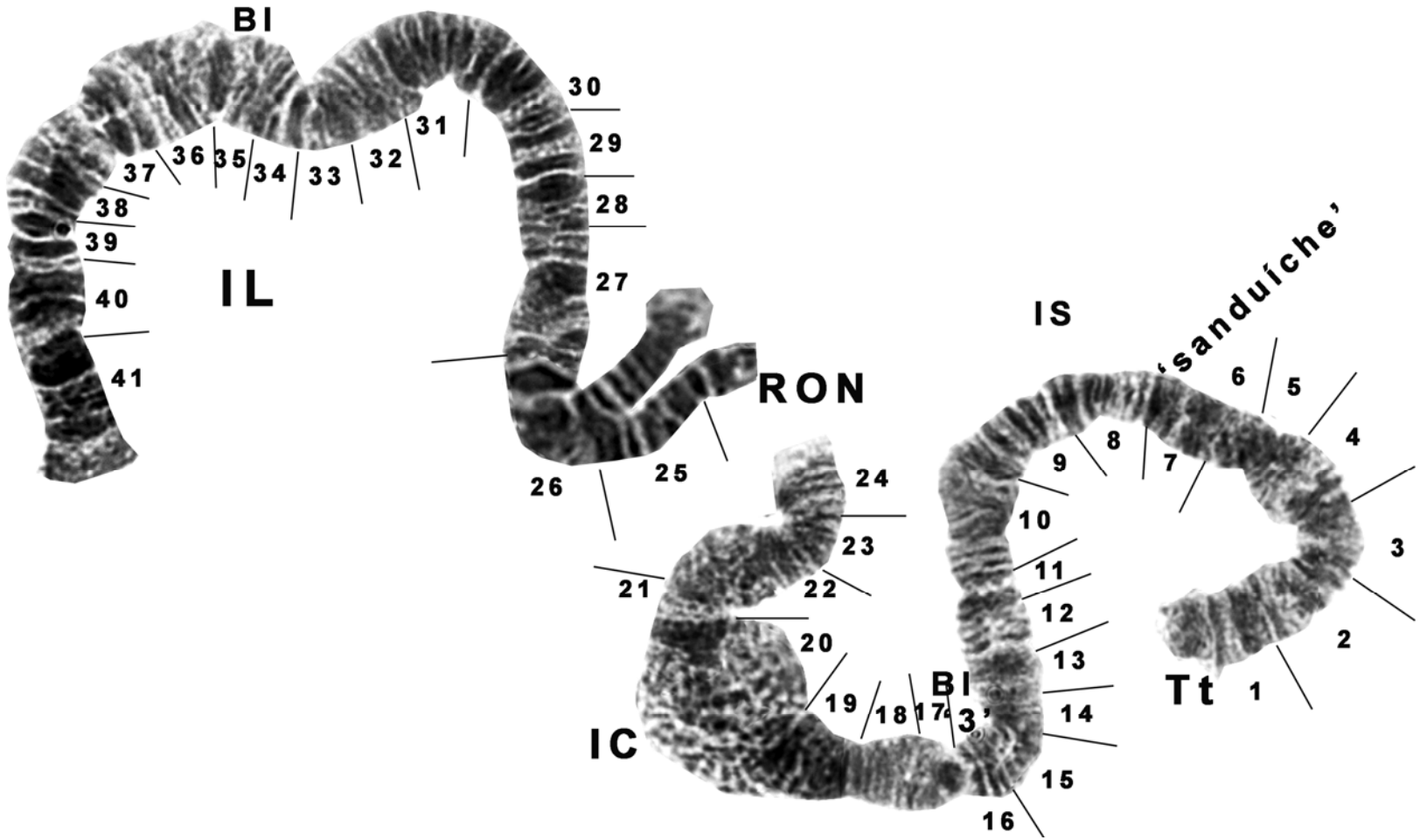

Figura. 11. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *Simulium guianense s.l.* Braço IS (braço curto do cromossomo I) e IL (braço longo do cromossomo I) da população do Amazonas, rio Pitinga.

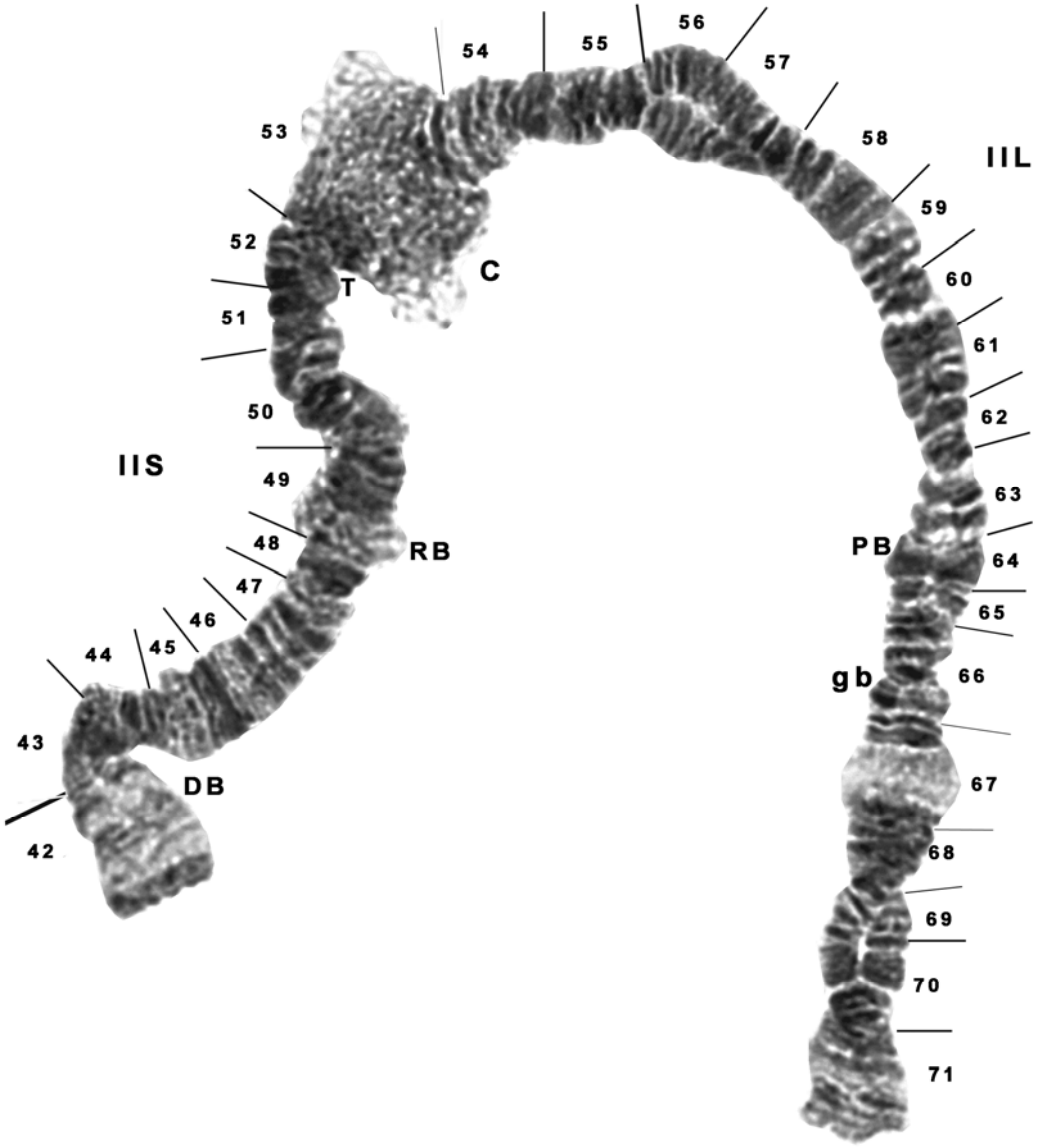

Figura. 12. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *Simulium guianense s.l.* Braço IIS (braço curto do cromossomo II) e IIL (braço longo do cromossomo II) da população do Amazonas, rio Pitinga.

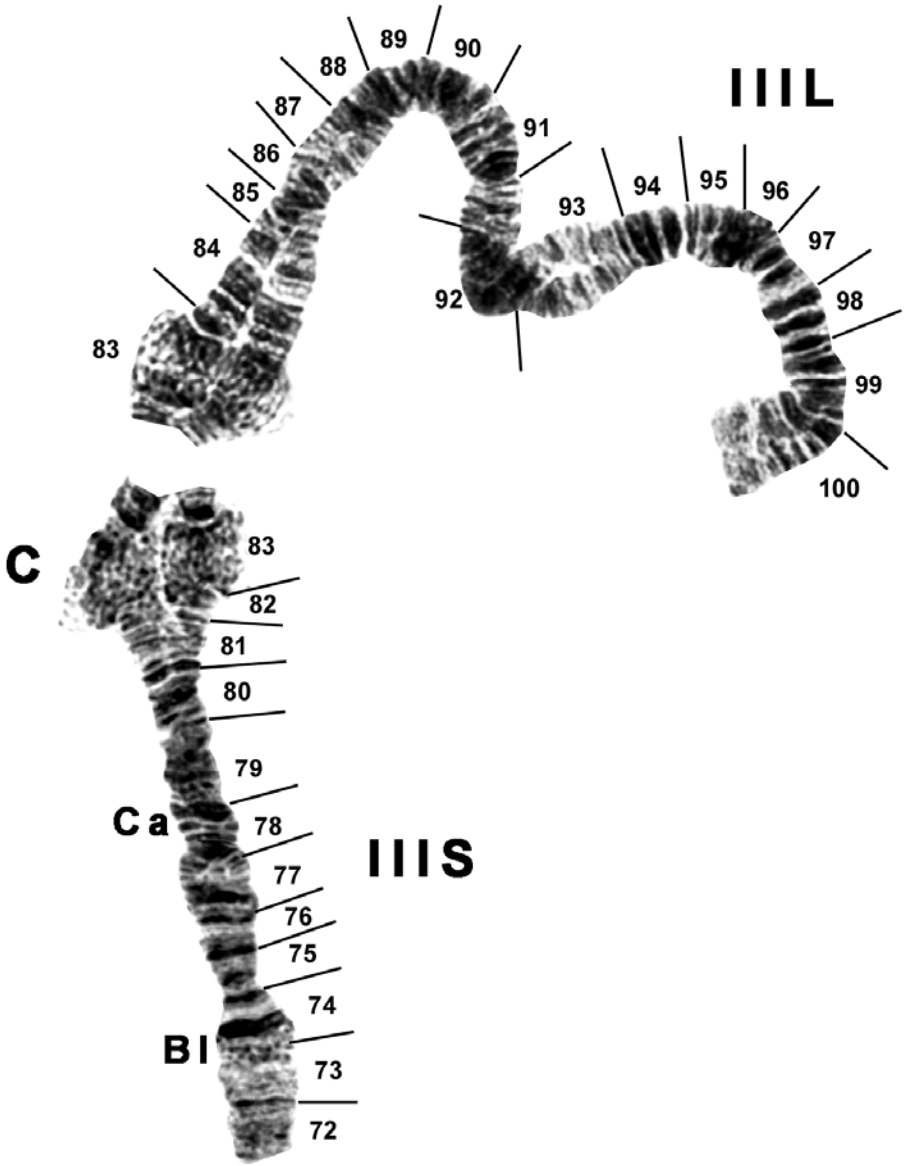

Figura. 13. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *Simulium guianense s.l.* Braço IIIS (braço curto do cromossomo III) e IIIL (braço longo do cromossomo III) da população do Amazonas, rio Pitinga.

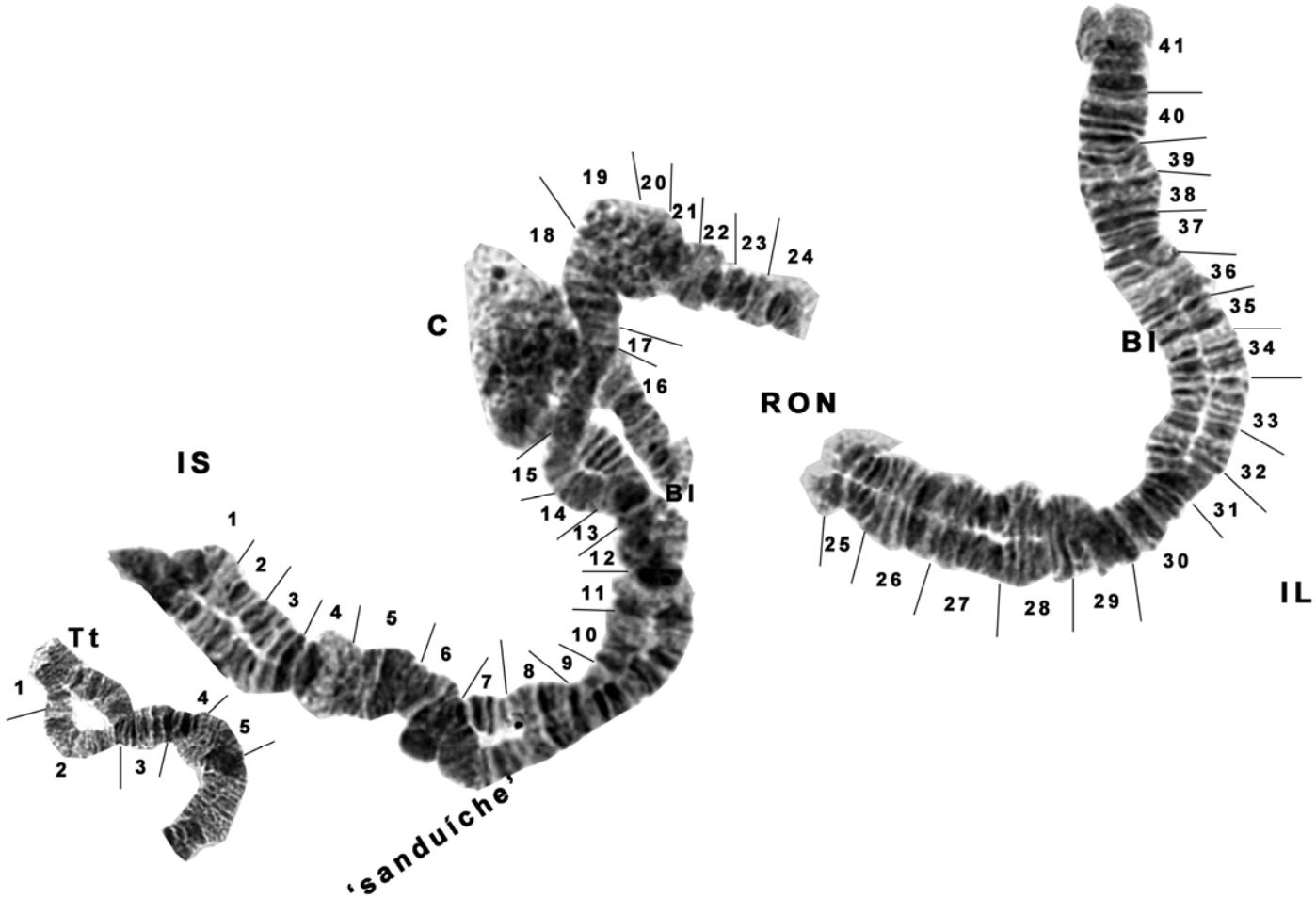

Figura. 14. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *Simulium guianense s.l.* Braço IS (braço curto do cromossomo I) e IL (braço longo do cromossomo I) da população de São Paulo, rio Pardo.

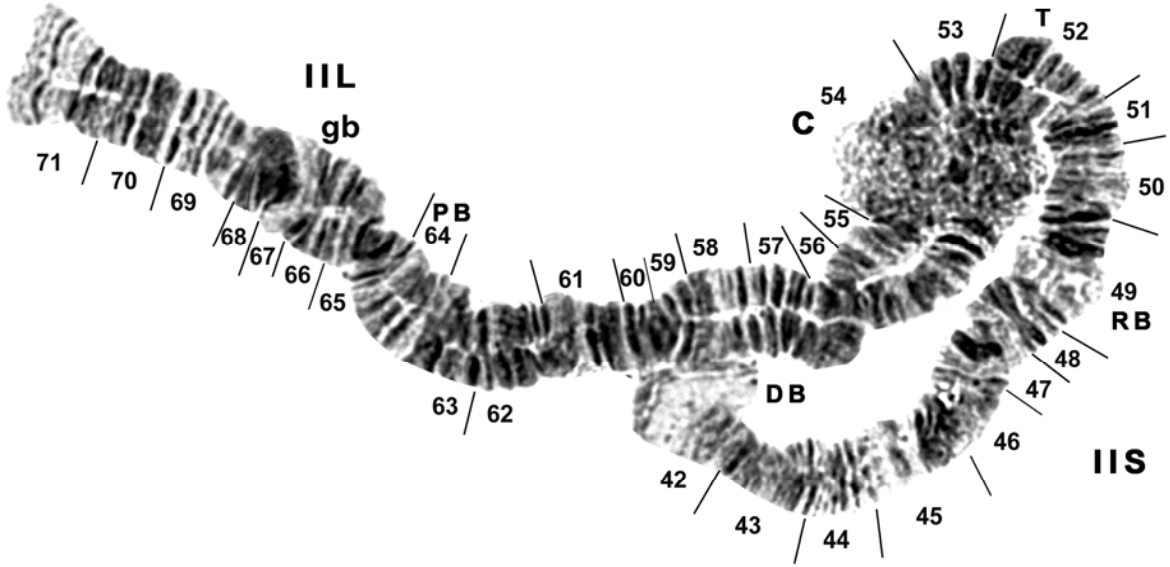

Figura. 15. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *Simlium guianense s.l.* Braço IIS (braço curto do cromossomo II) e IIL (braço longo do cromossomo II) da população de São Paulo, rio Pardo.

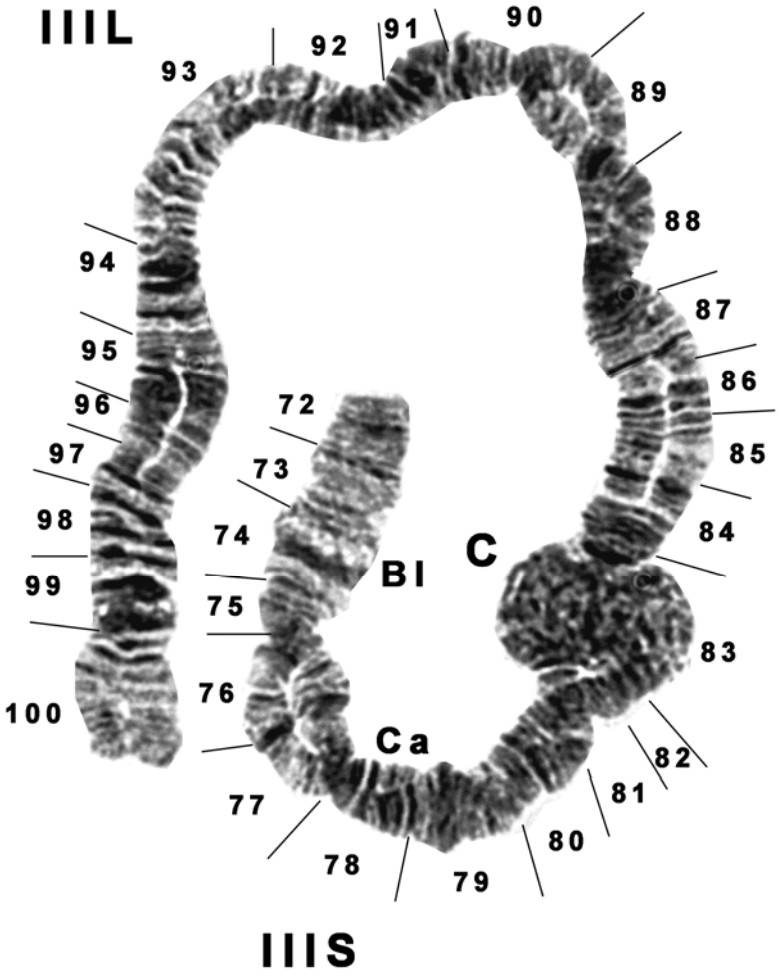

Figura. 16. Cromossomo politênico de larva de último estádio de *Simulium guianense s.l.* Braço IIIS (braço curto do cromossomo III) e IIIL (braço longo do cromossomo III) da população de São Paulo, rio Pardo.

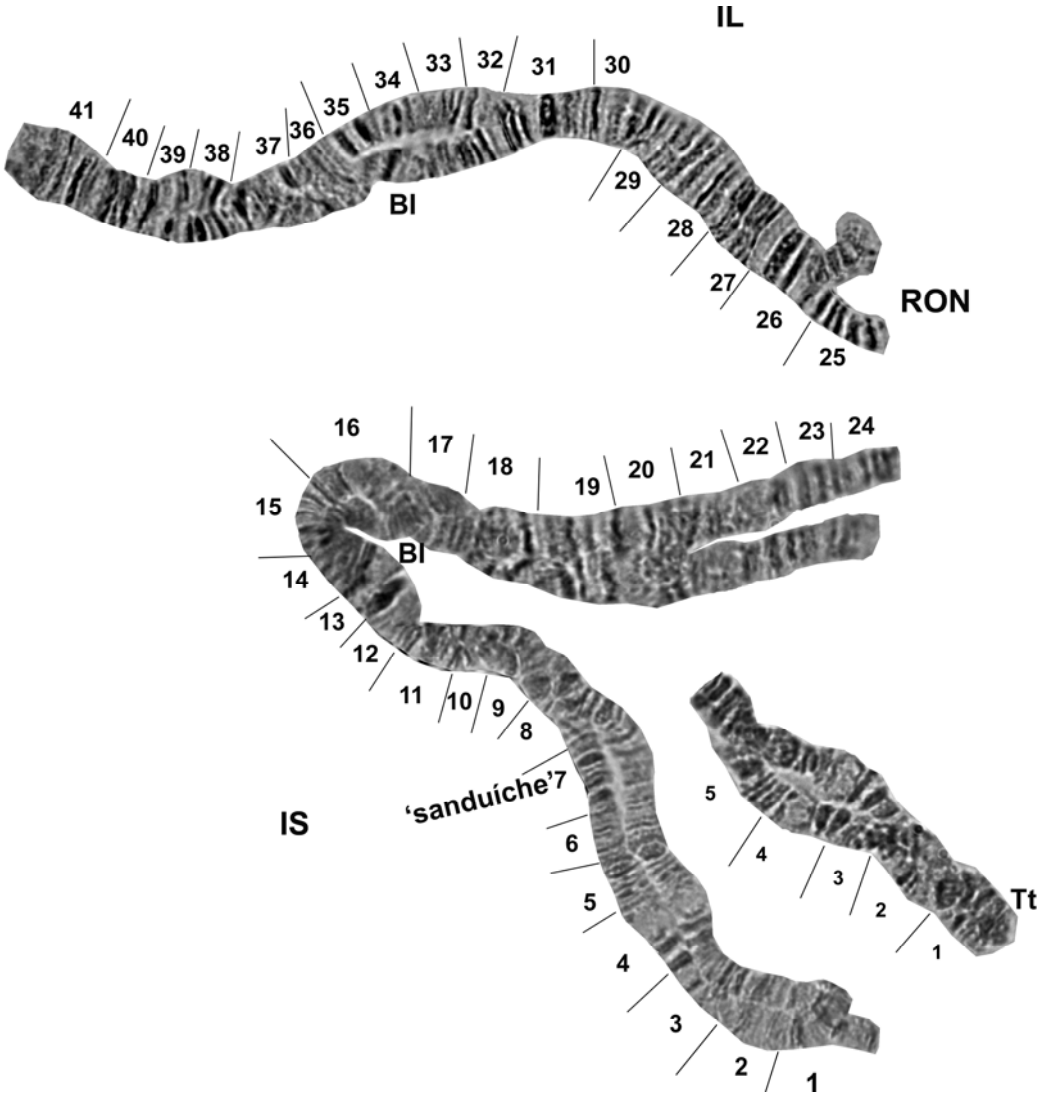

Figura. 17. Cromossomo politênico de larva de último estádio da forma atípica de *Simulium guianense s.l.* Braço IS (braço curto do cromossomo I) e IL (braço longo do cromossomo I) da população de Goiás, rio Ponte de Pedras.

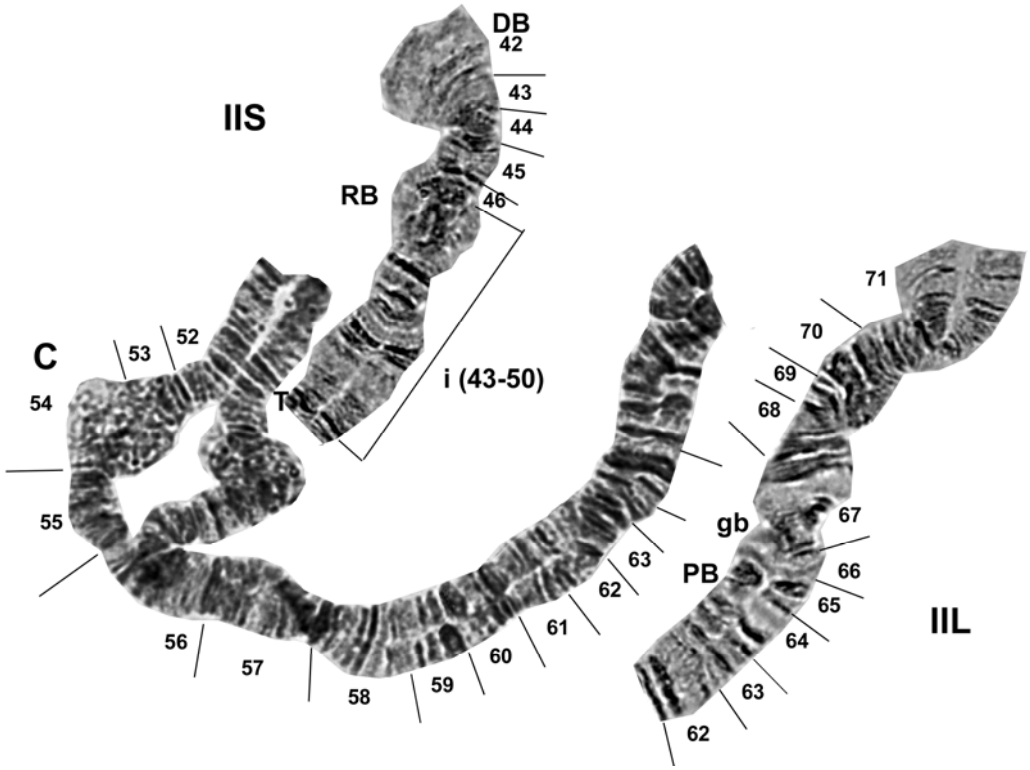

Figura. 18. Cromossomo politênico de larva de último estádio da forma atípica de *Simulium guianense s.l.* Braço IIS (braço curto do cromossomo II) e IIL (braço longo do cromossomo II) da população de Goiás, rio Ponte de Pedras.

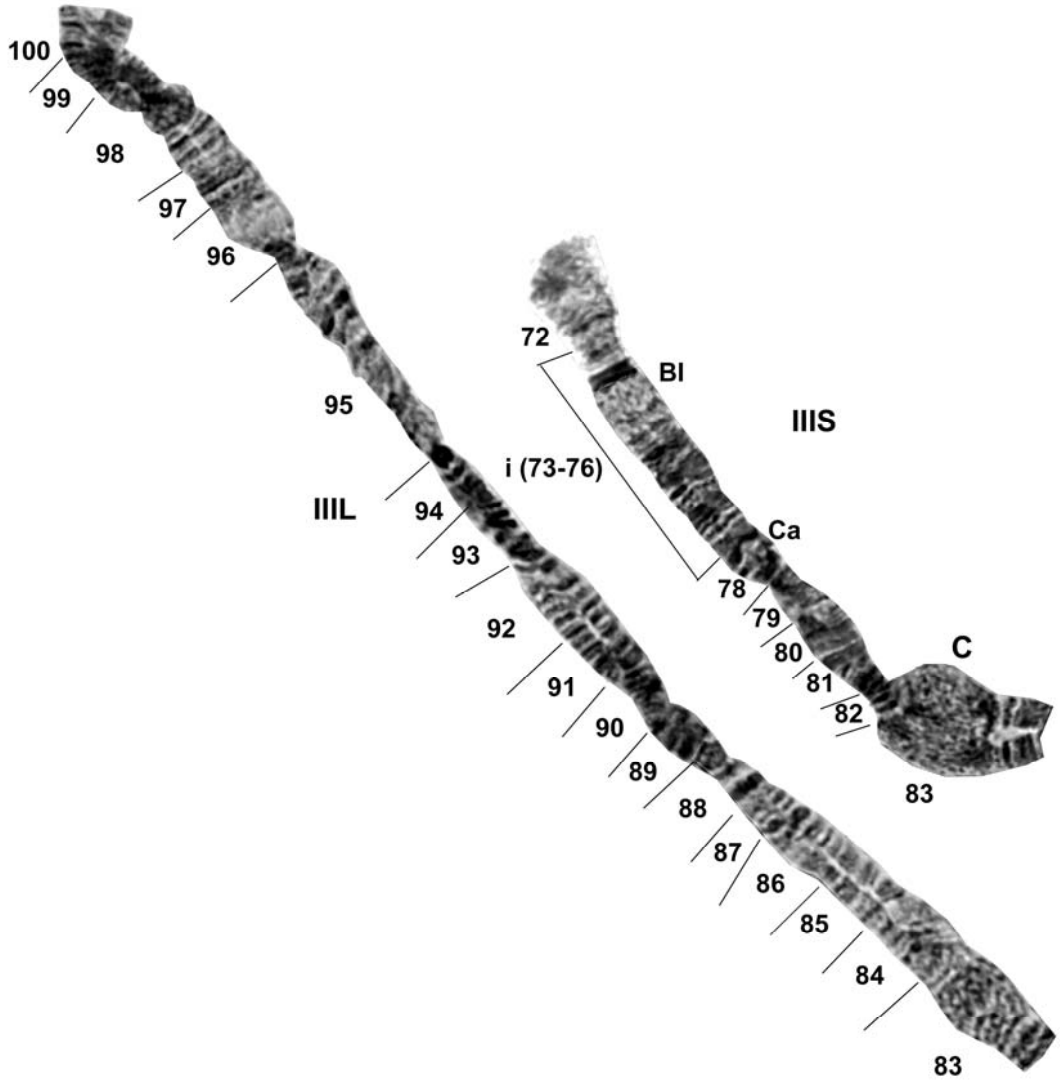

Figura. 19. Cromossomo politênico de larva de último estádio da forma atípica de *Simulium guianense s.l.* Braço IIIS (braço curto do cromossomo III) e IIIL (braço longo do cromossomo III) da população de Goiás, rio Ponte de Pedras.

Tabela 6. Inversões encontradas nas populações de *Simulium guianense s.l.* dos estados do Amazonas, São Paulo e Goiás (rio Ponte de Pedra). Nota: número de larvas lidas; pp=braços padrão (sem inversão); pi=braços padrão/invertido (inversão heterozigota); ii=braços invertido/invertido (inversão homozigota).

Localidades	São Paulo				Amazonas				Goiás			
Braços/ configurações	N	pp	ip	ii	N	pp	ip	ii	N	pp	ip	ii
IS	18	18	0	0	24	8	6 (8-12)	0	18	0	0	0
IL	20	11	9 (27-31)	0	23	23	0	0	19	19	0	0
IIS	22	22	0	0	28	0	0	0	20	0	0	20 (47-51)
IIL	17	17	0	0	26	0	6 (58-63)	0	18	18	0	0
IIIS	20	19	1 (78-80)	0	28	0	0	0	24	0	0	24(73-75)
IIIL	24	24	0	0	27	0	0	0	17	17	0	0

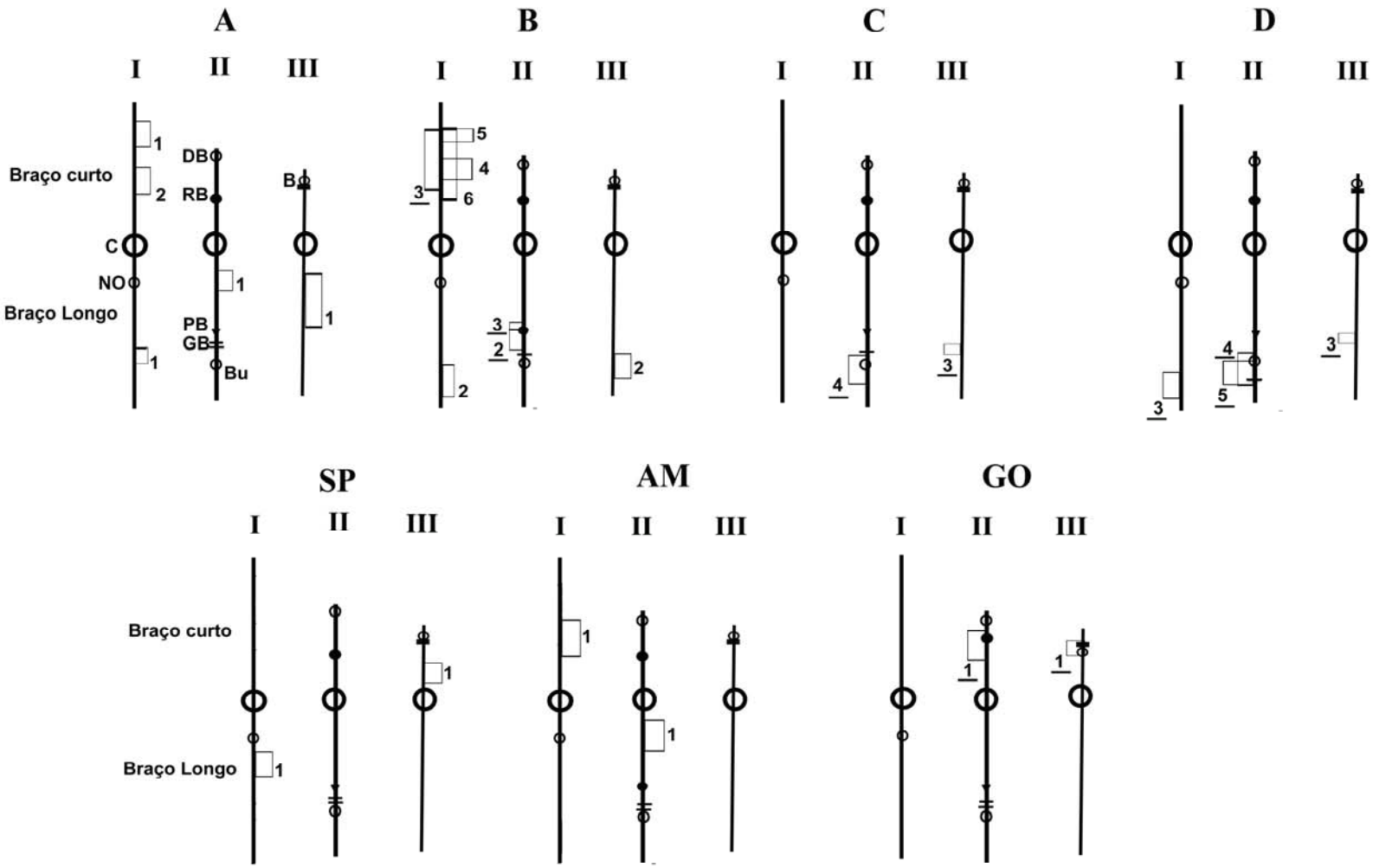

Figura 20. Citótipos de *Simulium guianense s.l.* de diferentes populações geográficas, no Brasil: Onde: A, B, C e D são os citótipos encontrados por Charalambous *et al.* (1996) e SP, AM e GO os citótipos encontrados em São Paulo, rio Pardo, Amazonas, Cachoeira 40 Ilhas e Goiás, rio Ponte das Pedras, respectivamente. Inversões fixas estão representadas a esquerda com os números sublinhados e inversões polimórficas a direita.

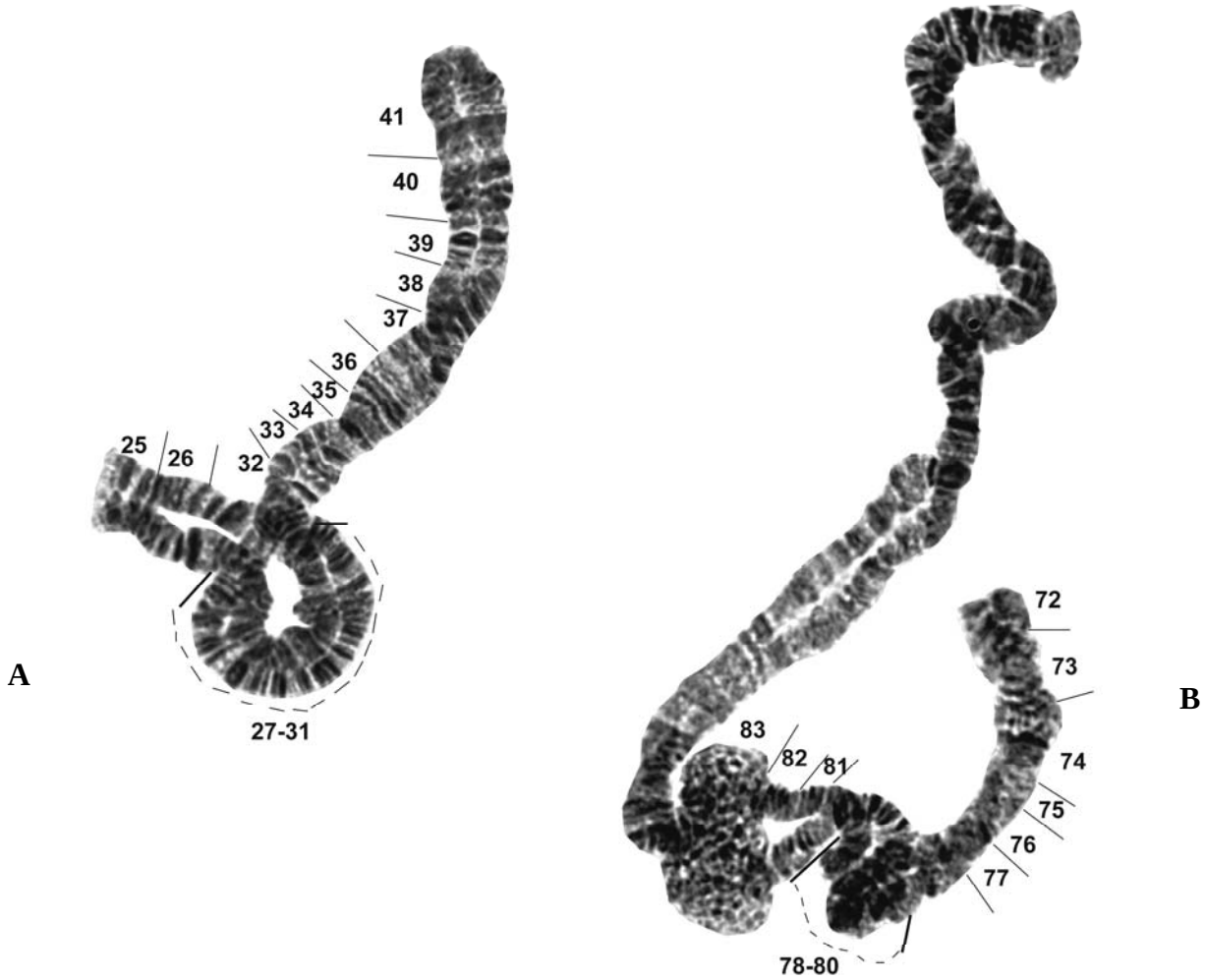

Figura 21. Inversões polimórficas encontradas na população de *Siulium guianense s.l.* de São Paulo. A) Cromossomo I: IL-seções 27-31; B) Cromossomo III: IIIS-seções 78-80.

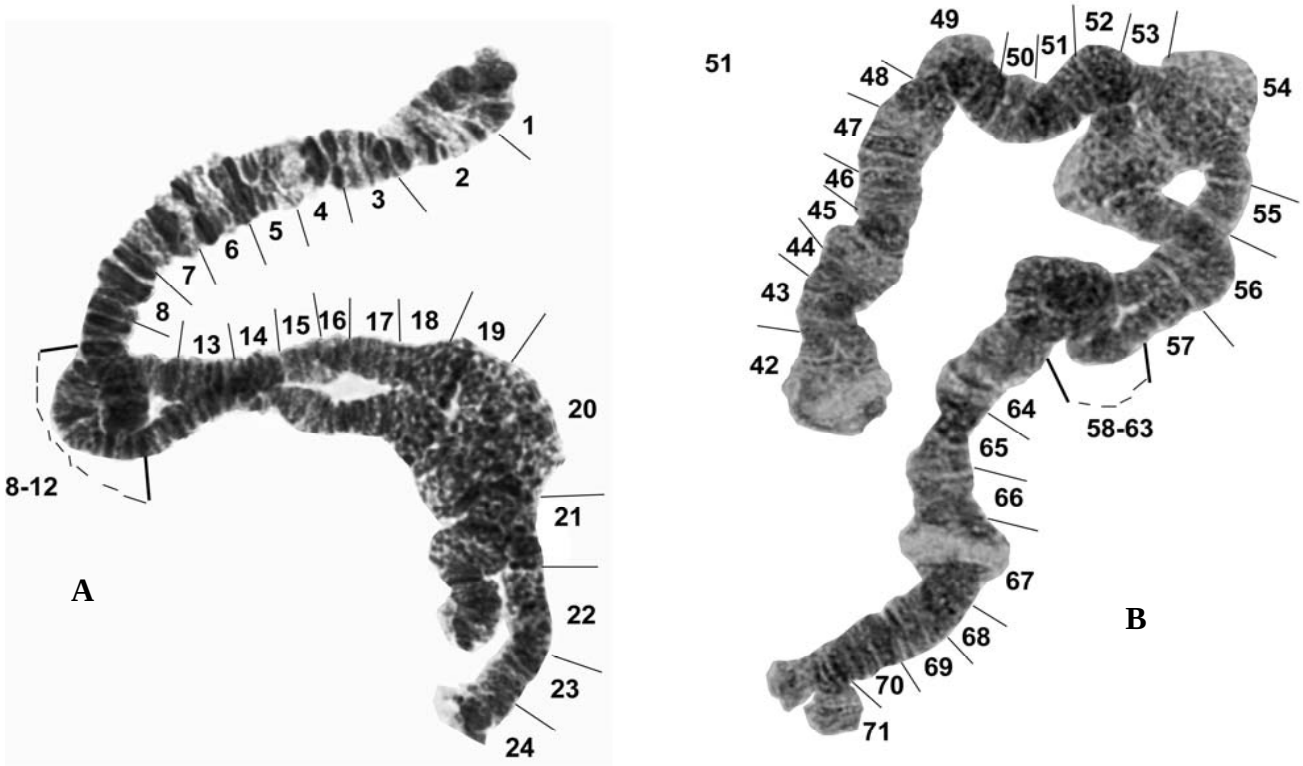

Figura 22. Inversões polimórficas encontradas na população de *Simulium guianense s.l* do Amazonas: A) Cromossomo I: IS-seções 8-12; B) Cromossomo II: IIL-seções 58-63.

4. DISCUSSÃO

Embora *S. guianense s.l.* esteja altamente correlacionada com espécies de plantas da família Podostemaceae (Py-Daniel *et al*., 1999), as larvas podem ser observadas colonizando diferentes substratos, como pedras, pedaços de galhos, raízes da vegetação marginal. A variação na coloração do corpo de larvas de *S. guianense s.l.* não parece estar relacionada aos diferentes criadouros, pois larvas com pigmentação variável foram encontradas em populações geográficas do Amazonas e São Paulo. Porém, em Goiás todas as larvas apresentam tons de verde e cinza escuros como observado por Shelley *et al.* (2002).

Charalambous *et al.* (1996) ao correlacionarem diferenças na coloração do corpo e o sexo das larvas de *S. guianense s.l.*, observaram, no citótipo D, que as fêmeas apresentarem com mais freqüência a coloração do corpo azul. Esse tipo de associação não foi realizado neste trabalho, mas também foi observado no citótipo Aguarico de *S. exiguum,* em que larvas machos tendem a ser marrons enquanto fêmeas são predominantemente verdes (Procunier *et al.,* 1985), e em *S. quadrifidum* e *S. cauchense* cujas larvas machos são castanho-claros ou cinzento e fêmeas são cinza- escuras ou escuras (Alvan-Aguilar *et al.*, 2005).

Diversos fatores podem estar relacionados ao baixo número de lâminas que puderam ser completamente lidos seu conjunto cromossômico. Dentre eles podemos citar: falha no processo de montagem das lâminas, problemas na fixação das larvas durante a coleta, condições do criadouro (temperatura e pouca disponibilidade de alimento), refletindo em cromossomos deteriorados e de qualidade inferior (McCreadie & Colbo, 1991; Ríos-Velasquez *et al.*, 2002).

A região Organizadora do Nucléolo (RON), no cariótipo de cromossomos politênicos das três diferentes populações geográficas de *S. guianense s.l.* está localizado entre as seções 24 e 25, do braço IL na mesma posição dos quatro citótipos descritos por Charalambous *et al.* (1996) para essa espécie.

A espécie *Simulium hirtipupa* Lutz e *Simulium duodenicornium* Pepinelli, Hamada & Trivinho, pertencentes ao mesmo subgênero de *S. guianense s.l.*, apresentam a RON no mesmo braço cromossômico IL (dados não publicados do Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos do INPA), enquanto que *Simulium scutistriatum* Lutz, também pertencente ao mesmo subgênero, apresenta a RON no braço IIIL (dados não publicados do Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos do INPA). Estudos citogenéticos em espécies *S. quadrifidum* e *S. cauchense*, de outro subgênero, *Psaroniocompsa*, também mostraram a localização da RON em braços diferentes, no IIIS e IS, respectivamente (Alván-Aguilar *et al.*,

2005). Estudos indicam que espécies filogeneticamente relacionadas apresentam a localização da RON conservada (Adler & Kim; 1986; Rothfels, 1987).

Um aspecto que se assemelha à espécie *S. metallicum*, citótipo L (Artega & Muñoz de Hoyos, 1999) é a região centromérica do cromossomo II, que está em constante assinápse, ao contrário do observado por Rothfels & Dunbar (1953) que citam que, geralmente, essa região é sináptica.

Rearranjos cromossômicos fixos, diferenças cromossômicas ligadas ao sexo e surgimento de simples arranjos de polimorfismos cromossômicos, indicam a existência de populações reprodutivamente isoladas (Rothfels, 1956). Não foram observados rearranjos ligados ao sexo, nas populações estudadas. Segundo Rothfels (1979b), em muitos representantes dos gêneros Simuliidae, o X e Y genético parecem semelhantes em análise microscópica dos cromossomos, sendo esta uma característica basal do grupo. Entretanto, há diversas espécies em que esses dois cromossomos diferem citologicamente, por meio de diferenças em inversões simples ou complexas, um ou mais polimorfismos, ou heterocromatização de amplas regiões, sendo, geralmente, o sexo masculino o heterogamético. Explicações de elementos transponíveis são as mais utilizadas, para explicar a determinação do sexo em Simuliidae (Brockhouse, 1985). Porém a relação desse mecanismo com machos, não é uma regra, pois nas espécies *S. exiguum* (Procunier *et al.*, 1985), *S. oyapockense*, forma Manabi (Procunier *et al.*, 1987), *S. metallicum* (Conn *et al.*, 1989), *Simulium yaeyamaense* (Hadi *et al.*, 1995), *S. maroniense* (Hamada & Adler, 1999) e *Simulium argentiscutum* (Dados não publicados do laboratório de Citotaxonomia e Insetos aquáticos do INPA), o sexo heterogamético é o feminino.

O consenso geral é que não somente a diferenciação cromossômica do X e Y é um processo adaptativo, como também pode estar envolvido na especiação do grupo (Rothfels, 1979 b, 1987; Post, 1982; Procunier, 1982). Essa idéia é reforçada por Feraday *et al.*, (1989), ao explicar que diferenciação no sistema de cromossomo sexual é mantida por seleção, e que a pressão de seleção em gene ligado ao sexo pode variar em diferentes áreas. Espécies estreitamente relacionadas em Simuliidae freqüentemente diferem na localização genômica da região que determina o sexo (Brockhouse, 1985).

Modificações nas estruturas cromossômicas são abundantes em Simuliidae e parecem estar associadas ao processo de especiação (Rothfels, 1979 b). Das três populações de *S. guianense s.l.* analisadas, duas apresentaram inversões polimórficas, não associadas ao sexo e, a outra, de Goiás, rio Ponte de Pedra, apresentou duas inversões fixas, uma no cromossomo IIS e outra no IIIS.

Além da presença de inversões fixas, diferentes das observadas nas outras populações correspondentes aos citótipos determinados por Charalambous *et al.* (1996), as larvas apresentaram coloração mais escura e tubérculos na região dorso-lateral, do abdome (Fig. 7), características morfológicas observadas nas populações próximas da área de estudo, coletadas anteriormente por Shelley *et al.* (2002). Outras diferenças morfológicas foram indicadas, durante o desenvolvimento desse estudo, tais como: a ausência de estriações nos filamentos branquiais do histoblasto branquial da larva (Dados não publicados do laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos).

A inversão polimórfica paracêntrica, IIL-1 (58-63), observada na população do Amazonas na freqüência de 23% foi à mesma encontrada por Charalambous *et al.* (1996) na população de Goiás, Mucambão (citótipo A) (Figura 21). Esse fato corrobora os estudos que sugerem que inversões heterozigotas estão relacionadas a adaptações em diferentes áreas geográficas (Dobzhansky, 1973). E também, que a quantidade de polimorfismo presente em uma população deve ser proporcional à variedade de habitas que ela explora (da Cunha, 1960). Essa inversão observada pode estar relacionada com as características do criadouro das duas populações, que se distribuem em áreas a jusante de usinas hidrelétricas e, provavelmente estejam sujeitas às pressões seletivas similares.

Estudos moleculares sugerem que inversões polimórficas são sistemas dinâmicos e indicam padrão de desequilíbrio e variação que são típicos de complexos de genes co-adaptados. Inversões polimórficas em Diptera têm sido relacionadas com tamanho do corpo, resistência a DDT e pesticidas, infecção a nematódeos, predação, características de micro-habitat, variações climáticas sazonais e variações em cline (Orengo & Prevosti, 2002; Brooke *et al.*, 2002; Hardikar & Nath, 2001; Bayoh *et al.*, 2001). No entanto, em Simuliidae, não há estudos que indiquem em que alelos estão os genes responsáveis por responder a diferentes variáveis ambientais, e também, onde estão localizados nos cromossomos. Estudos citogenéticos são limitados a determinar complexos de espécies, como em *S. metallicum* (Conn *et al.*, 1989), relacionar citótipos a diferentes paisagens ecológicas, como em *S. maroniense* (Hamada & Adler, 1999) e resistência a inseticidas, como em *S. damnosum* (Procunier, 1989).

Nossos resultados junto com os de Charalambou *et al.* (1996) sugerem que além da ampla distribuição de *S. guianense s.l.* no Brasil, essa espécie parece ter alta variabilidade em nível citológico, pelas análises de bandas de seus cromossomos politênicos. Neste estudo, diferente dos resultados obtidos em estudos anteriores, a maioria das inversões encontradas foram as polimórficas, nas populações do Amazonas e São Paulo. A única população que

apresentou inversões fixas foi a de Goiás, rio Ponte de Pedra, que também se mostrou diferente nas características morfológicas das larvas e pupas, sugerindo que ela pode representar uma espécie distinta de *S. guianense s.l.* Estudos cromossômicos realizados no Brasil corroboram essa conclusão, pois indicam que espécies morfologicamente distintas podem ser diferenciadas por apenas uma ou poucas inversões fixas (Hamada & Adler, 1999, Rios-Velasques et al., 2002, Alvan Aguillar, *et al.,* 2005).

Capítulo II

Variabilidade genética de nove populações geográficas de *Simulium guianense s.l.* Wise (Diptera: Simuliidae) do Brasil, utilizando o gene COI (subunidade I da Citocromo Oxidase) do DNA mitocondrial.

2.1. INTRODUÇÃO

Avanços nas técnicas moleculares têm permitido esclarecer questões em diversas áreas da pesquisa sobre insetos. Entre estas, podemos citar biologia da conservação, controle de pragas, epidemiologia, biologia evolutiva, estrutura populacional e tem aberto novas perspectivas no estudo das relações sistemáticas em diversos níveis de classificação (Roderick, 1996; Avise, 2000, Behura, 2006).

Métodos moleculares têm sido amplamente usados em estudos sobre Simuliidae para identificar espécies, entender relações filogenéticas e, principalmente, para auxiliar na determinação de espécies crípticas (Pruess *et al.*, 1992, 2000; Moulton 2000, 2003; Post & Flook, 1992; Brockhouse *et al.*, 1991, 1993; Tang *et al.,* 1995, 1996; Duncan *et al,* 2004).

Espécies crípticas são aquelas que não podem ser facilmente separadas por estudos convencionais de morfologia, mas podem ser diferenciadas por aspectos ecológicos, reprodutivos, genéticos e capacidades vetoriais. A distinção de espécies crípticas em vetores é essencial para estratégias de controle e estudos epidemiológicos.

Simulium guianense s.l. é considerada vetor primário de oncocercose nas áreas hiperendêmicas de oncocercose, do foco Amazônico. Essa espécie tem hábito hematofágico diferenciado, sendo zoofílica em áreas mais baixas e antropofílica nas regiões mais elevadas. Hipóteses sobre essa espécie compor um complexo de espécies crípticas têm sido levantadas devido a essas diferenças no hábito hematofágico e por sua ampla distribuição geográfica (Shelley *et al*. 1997, Shelley 2002). Essa espécie já foi registrada no Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Venezuela e Brasil (nos estados do Amapá, Amazonas, Espírito Santo, Goiás, Pará, Rio de Janeiro, Roraima, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins) (Crosskey & Howard, 2004). Shelley *et al*. (2002) descreveram a larva de uma forma atípica de *S. guianense s.l.*, oriunda de Goiás, caracterizadas morfologicamente por apresentar um par e

tubérculos proeminemtes na superfície dorso-lateral dos seguimentos abdominais 1-6; alta densidade de cerdas presentes no integumento abdominal (Fig. 7- Capítulo I).

Estudos citogenéticos, por meio da comparação do padrão de bandas de cromossomos politênicos de *S guianense s.l.* foram realizados em cinco populações geográficas do Brasil, quando foram caracterizados quatro citótipos (Charalambous *et al.*, 1996). Entretanto, o referido trabalho não incluiu populações das áreas do foco de oncocercose (Charalambous *et al.*, 1996), uma vez que até hoje, apenas fêmeas adultas foram coletadas nessa área. Populações geográficas, diferentes das incluídas no estudo acima, foram avaliadas no presente estudo (ver Capítulo I), onde foram caracterizados três citótipos adicionais. Dois citótipo, do Amazonas e São Paulo, apresentaram rearranjos polimórficos e no citótipo de Goiás foram observadas duas inversões fixas em braços cromossômicos diferentes (Capítulo I). A presença dessas configurações cromossômica diferenciadas, junto com características morfológicas distintas das larvas de *S. guianense s.l.*, descritas anteriormente por Shelley *et al.* (2002) como forma atípica, de amostras provenientes de áreas próximas da área onde esse citótipo foi coletado, sugerem que esse citótipo representa uma espécie distinta de *S. guianense s.l.* (ver Capítulo I).

Como os melhores resultados obtidos em estudos citogenéticos, que utilizam cromossomos politênicos, necessitam usar o estágio larval, onde o padrão de bandas tem melhor definição, em determinadas espécies que não é possível identificar os criadouros, este tipo de pesquisa se torna limitada. Um exemplo, já citado anteriormente, é a espécie *S. guianense s.l.* que, até o momento, não foi coletada em seus estágios imaturos na área do foco Amazônico. Dessa forma, técnicas moleculares baseadas na reação de PCR representam importantes ferramentas para auxiliar a esclarecer problemas dessa natureza, pois podem ser utilizadas em qualquer fase de desenvolvimento do indivíduo. Pesquisas utilizando essas ferramentas têm sido realizadas para distinguir espécies de Simuliidae, que são morfologicamente isomórficas, auxiliando na sua identificação taxonômica (Pruess *et al.*, 2000).

Um aspecto essencial para o êxito em estudos moleculares é a seleção do gene a ser utilizado, que depende da questão a ser resolvida. Em animais ocorrem dois tipos de genoma, o Nuclear e o Mitocondrial (Caterino *et al.*, 2000).

Diversos estudos têm utilizado o genoma mitocondrial, principalmente em espécies vetores, devido a características peculiares tais como: altas taxas de evolução, quando comparado ao genoma nuclear; muitas regiões conservadas, possibilitando o uso do

mesmo oligonucleotídeo iniciador (*primer*) em estudos de diferentes táxons de insetos; herança materna e falta de recombinação. Assim, esse gene representa um único *locus* genético, e com isso, embora diferentes genes possam mostrar diferentes níveis de variação, eles não podem ser interpretados como *locus* independente (Avise, 1991, 1994; Simon *et al.*, 1994). E, a freqüência de um único haplótipo dentro da população mostra flutuações mais rápidas do que as freqüências dos genes de DNA nuclear, mostrando-se mais sensível a eventos que interferem no tamanho da população (Roderick, 1996). Assim, seqüências dos genes de DNAmt têm sido muito utilizadas para fazer inferências sobre parâmetros populacionais, tais como fluxo gênico, tamanho efetivo da população e história evolutiva (Avise, 1994).

Vários estudos sobre simulídeos têm utilizado seqüências do genoma mitocondrial como marcadores moleculares. O mais comum tem sido o uso do gene ribossomal, subunidade 16 S, para estimar filogenias de espécies crípticas (Xiong & Kocher, 1991, 1993; Tang *et al.*, 1995), relações filogenéticas entre espécies vetores de oncocercose humana e bovina de diferentes regiões geográficas do mundo (Tang *et al.*, 1996) e variação genética (Tang *et al.*, 1998). O gene mitocondrial 16 S RNAr tem permitido estudo de relações mais basais, porém resolve fracamente relações intraespecíficas (Xiong & Kocher, 1993; Tang *et al.*, 1996). Outros genes mitocondriais, entre eles NAD desidrogenases, subunidade 4, também foram testados para determinar relações filogenéticas no complexo *S. damnosum* apresentando suficiente variabilidade para diferenciar as seis espécies desse complexo (Tang *et al.*, 1995).

Para resolver relações filogenéticas em níveis sistemáticos mais baixos ou mesmo em nível específico, seqüências de Citocromo Oxidase, subunidade 1 e subunidade 2, têm se mostrado altamente informativos (Pruess *et al.*, 2000; Joy & Conn, 2001; Pramuel *et al.*, 2005; Finn *et al.*, 2006).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi comparar diferentes populações geográficas de *S. guianense s.l.* usando o gene mitocondrial COI, incluindo espécimes da área do foco Amazônico, para conhecer a variabilidade desta espécie e inferir sobre diferenciação genética, estrutura populacional e relações filogeográficas.

2. 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Coleta e armazenamento do material:

Os espécimes estudados foram coletados em nove localidades do Brasil: Amapá (rio Oiapoque, cachoeira Maripá), Amazonas (rio Pitinga, cachoeira Quarenta Ilhas), Goiás (rio Ponte de Pedra), Goiás (rio Verdão), Maranhão (rio Farinha, cachoeira da Prata), São Paulo (rio Pardo), Roraima (rios Caroebe e Surumu), e uma localidade do foco amazônico, localizado na área dos Yanomamis, em Roraima (Homoxi) (Fig. 23).

As larvas e pupas foram coletadas diretamente do substrato, com o auxílio de pinça, em todas as áreas amostradas, com exceção de Roraima (Homoxi), onde as fêmeas adultas foram coletadas em atividade de antropofilia (antes de exercer a hematofagia). Os espécimes foram fixados em álcool absoluto, etiquetados e refrigerados a 4°C.

Informações gerais das localidades em que foram realizadas as coletas de imaturos e adultos e as características físico-químicas dos criadouros estão listados nas Tabelas 7 e 8. Essas informações foram obtidas na tentativa de relacionar os haplótipos observados com as variáveis ambientais observadas.

Material testemunho dessa pesquisa será depositado na Coleção de Invertebrados do INPA.

2.2.2. Descrição das áreas de estudo

AMAZONAS, Rio Pitinga, Cachoeira 40 Ilhas (Fig. 24a). Criadouro se localiza em região de floresta; tem vegetação ripária, entretanto, sofre impacto ambiental, pois a cachoeira está localizada abaixo da hidrelétrica de Pitinga. O leito do rio é rochoso e arenoso, em algumas partes. As larvas e pupas utilizam diversos substratos, tais como, raízes submersas, galhos secos, folhas secas e pedras. Esse rio é tributário do rio Uatumã, que é afluente do rio Amazonas.

RORAIMA, Rio Caroebe (Fig. 24b). Criadouro se localiza em região de floresta, mas em uma região com muita atividade agropastoril; tem vegetação ripária e, o leito do rio é rochoso e arenoso. Larvas e pupas colonizam macrófitas aquáticas da família Podostemacea. Esse rio é tributário do rio Jatapu, que por sua vez, é tributário do rio Uatumã, que pertence à bacia hidrográfica do rio Amazonas.

RORAIMA, Homoxi (Fig. 24c). A área de coleta das fêmeas está localizada nos limites da área dos índios Yanomamis, situada em uma região montanhosa da Serra Parima, na divisa com a Venezuela, onde ficam as cabeceiras do rio Mucajaí. Nesta localidade a

floresta é densa, com altos declives e vestígios consideráveis de exploração por garimpo, tais como solos nus (em garimpos mais recentes), vegetação composta de gramíneas cobrindo cascalheiras (em garimpos abandonados) e vegetações secundárias (em garimpos mais antigos) (Coelho *et al.*, 1998; Le Tourneau & Albert, 2005).

Tabela 7. Local de coleta dos exemplares de *Simulium guianense s.l.*, em diferentes estados do Brasil, e informações sobre coordenada geográfica, tipo de vegetação da área, data, coletores e estágios de vida utilizados para extração de DNA total. Nota: AM = Aline Mattos; DLP = Domingos Leonardo Pereira; MT = Mateus Pepinelli; NH = Neusa Hamada; SL = Sérgio Luz; UB = Ulysses Barbosa; VL = Victor Landeiro.

Localidade	**Coordenadas da área**	**Tipo de vegetação**	**Data**	**Coletor**	**Estágios utilizados para o estudo**
Amazonas, Presidente Figueiredo, Hidrelétrica do Pitinga, Rio Pitinga, Cachoeira Quarenta Ilhas.	00°53'S; 59°34'W.	Floresta	31.08.2005	AM & DLV	Pupas
Roraima, São João da Baliza, Vicinal 32, Rio Caroebe.	01°02'N; 59°55'W.	Floresta	28.09.2005	NH	Larvas
Roraima, Homoxi, área dos Yanomamis, divisa com Venezuela.	02° 29' N, 63°43'W.	Floresta	29.07.2005	SL	Adultos
Roraima, Rio Surumu, Vila Pereira.	04° 13'N; 60° 46'W.	Savana	13.12.2001	SL	Larvas
Amapá, Rio Oiapoque, Cachoeira Maripá-	03°48'N; 51°53'W.	Floresta	26.07.2000	NH & UB	Larvas
Maranhão, Rio Farinha, Cachoeira da Prata.	06°59'S; 47°09'W.	Cerrado	11.08.2001	NH	Larvas e pupas
Goiás, Montividiu, Estrada Montividiu-Paraúna, Rio Ponte de Pedra (Tributário do Rio Verdão)	17°10'S; 50°47'W.	Cerrado	15.07.2002	NH	Pupas
Goiás, BR Estrada para Rio Verde, Rio Verdão	17°32'S; 50°33'W.	Cerrado	20.05.2006	NH, VL & MP	Pupas
São Paulo, Terra Roxa, Estrada entre Viradouro e Terra Roxa, Rio Pardo.	20° 04'S; 48°15'W.	Cerrado	17.11.2005	NH & MP	Larva e pupas

RORAIMA, Rio Surumu (Fig. 24d). O criadouro está localizado em uma área de vegetação tipo Cerrado e tem vegetação ripária. O leito é rochoso e arenoso e os imaturos utilizam como substrato, macrófitas aquáticas (Podostemaceae). Esse rio pertence à bacia hidrográfica do rio Branco, que é afluente do rio Negro.

AMAPÁ, Rio Oiapoque, Cachoeira Maripá (Fig. 24e). Criadouro está localizado em área de floresta e tem vegetação ripária. O leito é rochoso e arenoso e os imaturos foram coletados em macrófitas aquáticas, Podostemaceae. Esse rio deságua diretamente no mar.

Tabela 8. Local de coleta dos exemplares de *Simulium guianense s.l.,* de diferentes estados do Brasil e, características ambientais dos criadouros amostrados. Nota: T = temperatura; C = condutividade elétrica, A = altitude; (-) sem informação.

Local de Coleta	**Características dos criadouros de imaturos**				
	T(°C)	**pH**	**C (µS/cm)**	**Largura (m)**	**A (manm)**
Amazonas, Rio Pitinga, Cachoeira 40 ilhas	29	5,8	<10	50	60
Roraima, São João da Baliza,Vicinal 32, Rio Caroebe.	33,4	7,26	<30	70	112
Roraima, Rio Surumu, Vila Pereira.	26	7,4	<30	150	-
Amapá, Rio Oiapoque, Cachoeira Maripá.	28	6,9	-	100	-
Maranhão, Rio Farinha, Cachoeira da Prata.	25	7,4	<50	60	148
Goiás, Montividiu, Estrada Montividiu-Paraúna, Rio Ponte de Pedra (Tributário do Rio Verdão).	18	6,5	<10	40	671
Goiás, Estrada para Rio Verde, Rio Verdão	20	7,3	<20	100	519
São Paulo, Terra Roxa, Estrada entre Viradouro e Terra Roxa, Rio Pardo.	26	7,6	<40	100	475

MARANHÃO, Rio Farinha, Cachoeira da Prata (Fig. 24f). Criadouro está localizado em área de Cerrado e apresenta vegetação ripária. O leito é rochoso e os imaturos de Simuliidae utilizam Podostemaceae como substrato. Esse rio é afluente direto do rio Tocantins.

GOIÁS, Rio Ponte de Pedra (Fig. 24g). Está localizado em área de Cerrado, mas com grandes áreas ocupadas por agricultura, tem vegetação ripária. O leito é rochoso e arenoso e os imaturos utilizam plantas da família Podostemacea e, folhas e galhos da vegetação marginal como substrato. Esse rio é tributário do rio Verdão, que pertence à bacia hidrográfica do rio Paraná. Esse ponto de coleta foi próximo do local coletado no rio Verdão.

GOIÁS, Rio Verdão (fig. 24h). Está localizado em área de Cerrado, mas com grandes áreas ocupadas por agricultura, tem pouca vegetação ripária. O leito é rochoso e arenoso e os imaturos utilizam plantas da família Podostemacea e, folhas e galhos da vegetação marginal, como substrato. Esse rio pertence à bacia hidrográfica do rio Paraná.

SÃO PAULO, Rio Pardo (Fig. 24i). Está localizado em área de Cerrado, em área com grande atividade agrícola e passa por diversos centros urbanos, tem pouca vegetação ripária. O leito do rio é rochoso em algumas áreas e arenoso em grande parte. O substrato

utilizado pelos imaturos foi plantas aquáticas, Podostemaceae. Esse rio pertence à bacia hidrográfica do rio Paraná.

2.2.3. Principais características morfológicas de *S. guianense s.l.*

Larvas, pupas e adultos foram identificados segundo os trabalhos de Coscarón (1991), Hamada & Grillet (2001) e Shelley *et al.* (2002). As principais características das larvas e pupas são filamentos branquiais em número de 12, espessos, com ápices pontiagudos e esclerotinizados (Fig. 5 e 7 - Capítulo I). Enquanto que os adultos se distinguem das espécies próximas, principalmente por características da genitália, tais como formato da placa ventral no macho e paraprocto na fêmea. Os machos apresentam o escudo negro, com bandas prateadas/nacaradas, enquato nas fêmeas o escudo apresenta cerdas agrupadas, formadas por escamas dispostas em fileiras (Fig.23).

Figura 23. Características morfológicas em adultos de *Simulium guianense s.l.* Foto em vista frontal. A) Escudo do macho; B) Escudo de fêmeas.

Figura 24. Mapa do Brasil com as áreas de coleta de *Simulium guianense s.l.*. Imagem obtida pelo programa Google Earth *v. 4.0.2737* (www. googleearth.com), acessado em 03 de jan de 2007.

Figura 25. Paisagem das localidades de coleta de *Simulium guianense s.l.* no Brasil: A) Amazonas, (rio Pitinga); B) Roraima, rio Caroebe; C) Roraima, Homoxi; D) Roraima, rio Surumu; E) Amapá, rio Oiapoque; F) Maranhão, rio Farinha; G) Goiás, rio Ponte de Pedras; H) Goiás, rio Verdão; I) São Paulo, rio Pardo.

2.2.4. Técnica molecular

2.2.4.1.Extração de DNA total

O DNA total foi extraído individualmente de larvas, pupas e/ou adultos fixados em álcool absoluto; a extração foi realizada de acordo com as instruções do Kit *Dneasy Tissue Handbook* da Qiagen (2003). Em eppendorf contendo 180 μL de PBS (1x), cada espécime foi macerado, após o processo foram adicionados 20 μL de proteinase K e 200μL de tampão AL e homogeneizado. O material homogeneizado foi incubado a 70°C por 10 minutos e após esse procedimento foi adicionado 200 μL de etanol 100%, em seguida foi transferida para uma coluna especial e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. Foi adicionado 500 μL de tampão AW1 e novamente centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O tubo de 2 mL com o precipitado foi descartado e a coluna foi colocada em um novo microtubo de 2 mL. Em seguida foi adicionado 500 μL de tampão AW2, centrifugado a 14.000 rpm por três minutos. Então a coluna foi transferida para outro microtubo de 2 mL, onde foi adicionado 200 μL de tampão AE diretamente na membrana da coluna e incubado por um minuto em temperatura ambiente. Após incubar centrifugou-se a 8.000 rpm por um minuto e preservou-se o conteúdo do microtubo que é a primeira eluição de DNA, identificada como **1° DNA.** Para obter a segunda eluição, **2° DNA,** colocou-se a coluna em outro microtubo de 2 mL, adicionou-se 200 μL do Buffer AE diretamente na membrana da coluna e centrifugou-se a 8.000 rpm por um minuto, o precipitado foi preservado e identificado e a coluna foi dispensada. As eluições de DNA mantidas em microtubos foram conservadas a –20°C.

As partes esclerotinizadas das larvas (cápsula cefálica e histoblasto branquial), pupas (exúvia e filamentos branquiais) e adultos (cápsula cefálica e escudo) foram conservadas em eppendorf de 2 mL como material testemunho.

2.2.4.2. Amplificação pela Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase–PCR do Gene Citocromo Oxidase 1 do DNA mitocondrial

A amplificação do gene mitocondrial COI de *S. guianense* foi realizada utilizando-se os primers desenvolvidos por Simon *et al.* (1994) e Lunt *et al.* (1996), os mesmos usados para *Simulium tani* Takaoka & Davies, da Tailândia (Pramual *et al*., 2005). Que correspondem às respectivas seqüências:

***Primer 1-Forward* (fita leve):** C1-J-2195: 5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3'.

***Primer 2-Reverse* (fita pesada):** UEA10: 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'.

A Reação em Cadeia da Polimerase foi realizada em volume total de 50 µL, contendo, para uma reação, 38,5 µL de ddH_2O, 1x tampão de PCR (5 µL), 2,0mM de $MgCl_2$ (2 µL), 0,2 mM de cada dNTPs (1 µL), 0,4 µL de cada um dos primers (0,5 µL), 2 unidades (5U/µL) de *Taq polymerase* (0,5 µL) e 2µL de DNA (diluído de 1:20 a 1:40 em água milli-Q), conforme o protocolo de Pramual *et al.* (2005).

As amostras foram levadas ao temociclador Perkin-Elmer 980, que foi programado para 36 ciclos sucessivos, com o seguinte perfil de reação:

- Desnaturação das fitas complementares de DNA mitocondrial: 94°C durante 5 minutos. Seguindo à 95°C por 1 minuto.
- Anelamento dos *primers*: 45°C por 1 minuto.
- Elongamento das seqüências amplificadas: 72°C por 10 minutos.

2.2.4.3. Eletroforese dos produtos amplificados

Os produtos de PCR foram checados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados em brometo de etídio (3µg mL^{-1}). Como marcador molecular foi utilizado o *ladder* de 100 pb. Foi usado um controle negativo (amostra sem DNA) e positivo (amostra com material amplificado anteriormente com sucesso).

A cuba do gel foi submetida a uma voltagem de 100V e 89 mA por 40 minutos e em seguida o gel foi examinado sob transluminador ultravioleta para verificar a presença de bandas e compará-las ao tamanho correspondente ao marcador molecular.

2.2.4.4. Purificação das amostras amplificadas

Cada produto de PCR foi previamente purificado, a fim de eliminar produtos não incorporados, tais como *primers*, dNTPs, sais e outras moléculas de baixo peso molecular obtidos em procedimentos de PCR.

As amostras foram tratadas conforme instruções do fabricante do Kit de purificação *Concert Rapid PCR Purification System* (GIBCO/BRL), que consistiu nas seguintes etapas: foi adicionado 100 µL do produto de PCR à 400 µL de H1 e transferido para o tubo filtro e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto; a parte líquida foi removida e foi adicionado 700 µL de H2 (diluído em Etanol) e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto; o líquido foi descartado e foi centrifugado novamente por 1 minuto a 12.000 rpm; o tubo filtro foi mudado para outro microtubo de 2mL e adicionado 50 µL de Tampão TE (pré-aquecido em banho-maria à 68°C). Depois de incubado por 1 minuto, centrifugou-se por 12.000 rpm por 2 minutos; o tubo filtro foi dispensado e o DNA purificado, preservado.

As amostras foram novamente submetidas à eletroforese em gel para checar a presença do produto de PCR, confirmando o conteúdo com DNA. O material foi armazenado à – 20°C.

2.2.4.5. Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada de acordo com a técnica de PCR (seqüenciamento cíclico) usando o Kit *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing.* Cada amostra de DNA foi seqüenciada nos dois sentidos da fita, em duas etapas: uma com o *primer forward* (fita leve) e outra com o *primer reverse* (fita pesada), para obter as fitas complementares.

Cada reação foi feita em um volume total de 20 µL no tubo, composto por 6 µL de tampão (200 mM tris base em pH 9; 5mM de $MgCl_2$ e água Milli-Q autoclavada), 2 µL de solução de sequenciamento *Big Dye Terminator*, 1 µL de cada *primer*, 8 µL de H_2O milli-Q e 30 a 90 ng/ µL de DNA purificado.

Para o sequenciamento as amostras foram levadas ao termociclador, programados para 25 ciclos, com o perfil descrito abaixo:

1. Desnaturação das fitas complementares de DNA: 96°C, por 10 segundos;
2. Anelamento dos primers: 50°C, durante 5 segundos;
3. Extensão da região a ser seqüenciada: 60°C, por 4 minutos.

Terminado o seqüenciamento do DNA, o produto precisou passar por um processo de precipitação. O produto foi transferido para microtubo de 2 mL, contendo 16 µL de água milli-Q e 64 µL de etanol 96%, cada tubo foi agitado brevemente e mantido em temperatura ambiente, por 15 minutos; depois as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O DNA purificado (*pellet*) foi lavado com 250 µL de etanol 70%, os tubos foram agitados um a um e centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm e colocados em estufa a 37°C até secar.

O DNA precipitado foi homogeneizado em 3 µL de tampão (formamida deionizada e EDTA 25 mM pH 8,0 com dextran azul a 50 mg/ml), transferido para o termociclador durante três minutos a 90°C, a fim de desnaturar as fitas complementares.

As amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida em seqüenciador automático ABI 377-*Applied Biosystems*, conforme as instruções do fabricante.

2.2.4.6. Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas

As seqüências das fitas do gene mitocondrial COI foram compiladas a partir das fitas complementares (*forward* e *reverse*), conferidas visualmente e editadas manualmente utilizando os programas computacionais CHROMAS *2.31* (www.technelysium.com.au/chromas.html) e BIOEDIT *7.0.5* (Hall, 1999).

Para obter uma matriz de dados consistentes para análises das seqüências, foram adotados os seguintes procedimentos:

- As seqüências de fita leve e pesada foram conferidas individualmente com o cromatograma correspondente, as seqüências de baixa qualidade foram descartadas e seqüenciadas novamente;
- As fitas consensos foram obtidas comparando as fitas complementares, das quais foram descartados os nucleotídeos não confiáveis das regiões iniciais da fita leve e os nucleotídeos finais da seqüência *reverse complementar* da fita pesada. Cada fita consenso foi salva com seu código de identificação;
- O alinhamento foi realizado usando o programa BIOEDIT *7.0.5* (Hall, 1999). As seqüências consenso foram colocadas uma abaixo da outra, de forma que cada nucleotídeo funcione como caractere a ser comparado;
- Foram decididas as regiões iniciais e finais (próximo das regiões mais conservadas) com o intuito de garantir homologia entre os sítios, comparando cada caractere par a par, a fim de obter um "bloco" de seqüências de tamanhos semelhantes (matriz retangular) e de tamanhos adequados, e novamente conferidos visualmente.

2.2.4.7 Validação das seqüências obtidas

As seqüências nucleotídicas foram conferidas, com o auxílio do programa MEGA *3.0* (Kumar *et al.*, 2004), a fim de verificar se não ocorrem mutações gênicas por substituições (do tipo "sentido trocado" que altera o aminoácido; e "sem sentido" que apresenta códon de parada, cessando a tradução). Todas as seqüências de cada amostra foram traduzidas em aminoácidos, testando as três possíveis posições do códon.

As seqüências nucleotídicas também foram conferidas no BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para verificar se correspondem à região de interesse, que codifica a proteína Citocromo Oxidase, subunidade I, do DNA mitocondrial (COI) e compará-las com outras seqüências desse gene anteriormente armazenadas em banco de dados virtual.

2.2.4.8. Análise das seqüências nucleotídicas da região do gene mitocondrial COI

As análises estatísticas de 702 pb da região do gene mitocondrial COI das 80 espécimes seqüenciadas de nove populações geográficas de *S.guianense s.l.*, no Brasil foram realizadas com os programas MEGA *3.0* (Kumar et al. 2004) cujas estimativas de distâncias genéticas foram feitas usando o modelo 2 Parâmentros de Kimura, devido as taxas de substituição por transição serem maiores que de tranversões.

Índice de diversidade molecular foi obtido com o auxílio do DNASP *3.0* (Rozas & Rozas, 1999) e ARLEQUIN *3.01* (Schneider *et al*., 2006) e com esse programa também foi realizada a Análises de Variância Molecular (AMOVA).

As freqüências dos haplótipos nas populações foram estimadas usando o programa MEGA *3.0* (Kumar *et al.*, 2004) e pelo programa TCS *1.06* (Clement *et al.*, 2000), pelo qual também obtivemos a representação em cladograma dos haplótipos encontrados.

Usando o programa MEGA *3.0* (Kumar *et al.*, 2004) uma árvore filogenética foi estimada baseada nos valores de distância 2 Parâmetros de Kimura, pelo método de *neighbor-joining* (NJ).

2.2.4.8.1. Análise das seqüências nucleotídicas e polimorfismos de DNA

Foram estimados, para cada uma das nove populações geográficas de *S. guianense s.l.* analisadas: a composição de bases nucleotídicas; o padrão de seqüências de aminoácidos, o tipo de substituição de bases nucleotídicas mais freqüentes (taxas de transições e transversões); padrão de substituições de aminoácidos (sinônimas e não-sinônimas), número de sítios polimórficos (*S*) e a posição relativa do códon; número de sítios informativos para parcimônia; número médio de diferenças nucleotídicas par a par (*K*), diversidade nucleotídica (π), diversidade nucleotídica com a correção de Jukes & Cantor (π_2), diversidade haplotípica (*Hd*) e número de haplótipos (h).

As análises de polimorfismo também foram feitas para todo o conjunto de seqüências nucleotídicas de *S. guianense s.l.* sendo calculado o número total de mutações (ETA); o número de sítios polimórficos (*S*); diversidade nucleotídica por sítio (π); número médio de diferenças nucleotídicas (*K*).

2.2.4.8.2. Comparação entre populações

2.2.4.8.2.1. Distância genética entre populações

As distâncias genéticas foram estimadas utilizando diferentes modelos de substituição: Distância *p*, Jukes & Cantor e 2 Parâmetros de Kimura (K2p). O modelo de Distância *p* é baseado na proporção dos sítios variáveis pelo número total de nucleotídeos comparados. Em seqüências que exibem poucas divergências, o valor de *p* é uma ótima estimativa do número acumulado de substituições nucleotídicas por sítio sem ser necessário fazer correções.

O modelo de Jukes & Cantor emprega uma correção para substituições múltiplas, pressupondo que as substituições nucleotídicas ocorrem em probabilidades iguais. Enquanto que o modelo K2p faz uma correção que leva em consideração que transições são mais freqüentes que transversões, sendo considerado este último modelo para os dados obtidos.

2.2.4.8.3. Estudo de genética populacional

Os valores de diferenciação genética e número de migrantes entre as populações foram inferidos por meio do calculo de *F statistic* (F_{ST}), a fim de caracterizar a estrutura populacional de *S. guianense s.l.* em nível molecular, usando os programas DNASP *3.0* (Rozas & Rozas, 1999) e ARLEQUIN *3.01* (Schneider *et al*., 2006). Também foi calculada, por esse mesmo programa, a composição genética de cada grupo de população pelos índices de fixação entre os grupos norte e sul (F_{CT}), dentro das populações (F_{SC}) e entre as populações (F_{ST}).

Os testes de Tajima (1989) e Fu & Li (1993) foram usados para testar a hipótese de que todas as mutações são seletivamente neutras (Kimura, 1983), usando o programa DNASP *3.0* (Rozas & Rozas, 1999). Ambos baseados no modelo infinito de ilhas sem recombinação.

O teste de Tajima (1989) compara dois estimadores de mutações, θ ($\theta = 2Mu$, M=N em populações haplóides de tamanho efetivo N). O D_T de Tajima e os testes D^* e F^* levam em consideração os dados de polimorfismo de DNA, e as estatísticas (F_S) de Fu (1997) e (*S*) de Strobeck (1997) avaliam a estrutura dos haplótipos baseada na distribuição da freqüência dos mesmos e foram usados como teste adicional.

2.2.4.8.4. Filogeografia de *S. guianense s.l.,* no Brasil

Foi gerada uma árvore filogenética, não enraizada baseadas em valores de distâncias genéticas 2 Parâmetros de Kimura, a partir de dados de seqüências, usando o método de agrupamentos vizinhos para estimar a similaridade entre as populações de *S. guianense s.l.* forma típica, forma atípica (GO-Rio Ponte de Pedra) e *S. duodenicornium*, usando programa MEGA *3.0* (Kumar *et al.*, 2004).

2.3. RESULTADOS

As seqüências nucleotídicas consenso de maior comprimento, da matriz de dados obtida, correspondem no banco de seqüências genéticas (GenBank) às seqüências nucleotídicas depositadas de 101 espécies de *Simulium,* que codificam a proteína Citocromo Oxidase-subunidade I, com 86 a 89% de similaridade. Comparada a seqüência em estudo às da espécie que apresenta maior identidade, *Simulium neonartipes* Dumbleton do Pacifico, observamos que compreendem as regiões 107 a 851 do gene mitocondrial COI.

As regiões iniciais e finais, pouco confiáveis, foram excluídas a fim de garantir homologia entre os sítios comparados. Após o alinhamento foram usadas para matriz de dados 702 pares de bases (pb) nucleotídicas da região do gene mitocondrial COI. A matriz retangular contém seqüências de quatro espécimes de RR-Caroebe, nove do Amapá, RR-Surumu, RR-Homoxi (área do foco), GO-Rio Ponte de Pedras, e 10 do Amazonas, Maranhão, GO-Rio Verdão e São Paulo, totalizando 80 seqüências comparadas.

2.3.1 Análise da composição nucleotídica e polimorfismo de DNA

Na análise da composição de bases nucleotídicas do conjunto de seqüências consideradas neste estudo, para as nove populações geográficas do Brasil, foram observados aproximadamente os mesmos valores de componentes, com altas taxas de Timina e Adenina nas seqüências de todas as populações (Tabela 9).

Tabela 9. Freqüência da composição nucleotídica e valores de substituições por transição e transversão do conjunto de seqüências de *Simulium guianense s.l.* de diferentes populações geográficas, do Brasil. Onde: C= Citosina; T= Timina; A= Adenina e G= Guanina.

Coleções	Composição nucleotídica (%)			
	C	T	A	G
Amapá	16.71	36.31	30.69	16.29
RR-Surumu	16.67	36.39	30.55	16.40
RR-Homoxi	16.62	36.37	30.80	16.21
RR-Caroebe	16.67	36.32	30.70	16.31
Amazonas	16.68	36.31	30.74	16.27
Maranhão	16.50	36.62	30.78	16.10
GO-Rio Ponte das Pedras	16.79	36.34	30.53	16.33
GO-Rio Verdão	16.71	36.48	30.83	15.98
São Paulo	16.74	36.42	30.73	16.11

A matriz de dados obtida não apresentou nenhum *indels* (deleção e/ou adição), substituições dos tipos “sentido trocado” ou “sem sentido”. Foram detectados 93 sítios variáveis na matriz de dados das populações estudadas, destes, 56 são informativos para

parcimônia. Os polimorfismos encontrados foram do tipo substituição por transição e transversão (Fig. 26). Ocorrendo transições com mais freqüência de que as transversões.

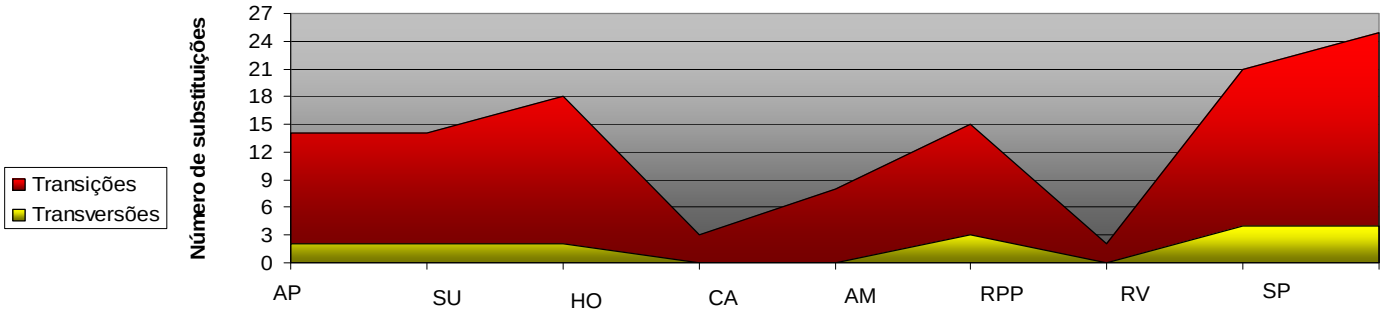

Figura 26. Número de polimorfismos do tipo substituição, por transição e transversão, encontrados na composição nucleotídica do conjunto de seqüências de *Simulium guianense* de diferentes populações geográficas, do Brasil. Onde: AP=Amapá; SU= RR, Surumu; HO= RR, Homoxi (área do foco Amazônico); CA= RR, Caroebe; AM=Amazonas; MA=Maranhão; RV= GO, Rio Verdão; RPP= GO, Rio Ponte de Pedras e SP=São Paulo.

Os resultados das análises de polimorfismos das seqüências nucleotídicas de DNA da matriz de dados das nove populações em nível intrapopulacional estão descritos na Tabela 10. Foram observados altos números de sítios polimórficos (*S*) em São Paulo, Goiás, Rio Verdão e Roraima, Homoxi-área do foco, com 29, 25 e 20 respectivamente. Nas outras populações estudadas, o número de sítios polimórficos foi diminuindo para 18 no Maranhão, 16 em Roraima, Surumu, 15 no Amapá, oito no Amazonas e três em Roraima, Caroebe e na população de Goiás, Rio Ponte de Pedras esse valor foi mais reduzido, dois (Tabela 10).

O número médio de diferenças nucleotídicas par a par (*K*) mostrou ser mais elevado na população de São Paulo (8,06667), de Roraima, Homoxi (6,88889), de Goiás, rio Verdão (6,73333) e Roraima, Surumu (6,22222), o que reflete maior variabilidade genética nessas populações. Contrário ao observado nas populações do Amazonas (2,6), Roraima, Caroebe (2) e do Maranhão (3,6), em que este número foi reduzido, sendo bem menor na população de Goiás, Rio Ponte de Pedras (0,7).

Altos valores de diversidade nucleotídica (π) foram também observados nos grupos das populações São Paulo, com 0,01149; de Roraima, Homoxi, com 0,00981; e de Goiás, rio Verdão, com 0,00959. O número de diversidade haplotípica (*Hd*) também se mostrou alto (1), para essas mesmas populações (Tabela 10), sendo menor em Goiás, Rio Ponte de Pedras (0,55556) e Roraima, Caroebe (considerando o baixo número de amostras) (0,66667).

Nas populações de Goiás, Rio Verdão, São Paulo e Roraima, Homoxi a quantidade de haplótipos foi equivalente ao número de amostras (10, 10 e nove). No Maranhão, em 10 amostras, oito haplótipos foram observados. O número de haplótipos foi menor em Roraima

(Caroebe), Amazonas, Amapá e Roraima (Surumu). Em Roraima (Caroebe), em quatro amostras foram observados dois haplótipos, no Amazonas de 10 amostras, sete haplótipos foram encontrados, da mesma forma, no Amapá, de nove amostras, seis haplótipos foram encontrados. O menor número de haplótipos foi observado nas populações de Roraima (Surumu), cinco de nove indivíduos, e Goiás (Rio Verdão), três de dez amostras.

Tabela 10. Valores das estimativas de diversidade genética para *Simulium guianense s.l.* de diferentes populações geográficas, no Brasil. Onde N= número de amostras; *S* = Número de sítios polimórficos; *K*= número médio de diferenças nucleotídicas; π= diversidade nucleotídica; π_2 = diversidade nucleotídica com a correção de Jukes & Cantor; *Hd*= número de diversidade haplotípica e h= número de haplótipos.

Coleções	N	S	K	π	π2	Hd	h
Amapá	9	15	4,13889	0,00590	0,00593	0,83333	6
RR-Surumu	9	16	6,22222	0,00886	0,00894	0,86111	5
RR-Homoxi	9	20	6,88889	0,00981	0,00989	1,00000	9
RR-Caroebe	4	3	2,00000	0,00285	0,00286	0,66667	2
Amazonas	10	8	2,55556	0,00364	0,00365	0,91111	7
Maranhão	10	18	3,60000	0,00513	0,00515	0,93333	8
GO-Rio Ponte das Pedras	9	2	0,72222	0,00103	0,00103	0,55556	3
GO-Rio Verdão	10	25	6,73333	0,00959	0,00966	1,00000	10
São Paulo	10	29	8,06667	0,01149	0,01159	1,00000	10

As análises de polimorfismos intrapopulacional das seqüências de *S. guianense s.l.* das nove populações geográficas representadas no histograma (Fig. 27) mostram que as populações do Amapá, RR-Surumu, Caroebe e Amazonas apresentaram indícios de polimorfismos menores, quando comparadas às populações de RR-Homoxi (área do foco), Maranhão, GO-Rio Verdão e São Paulo. A população de GO-Rio Ponte de Pedras parece ser menos polimórfica que as demais populações de *S. guianense s.l.* estudadas.

O conjunto de seqüências representado por todas as populações de *S. guianense s.l.* estudadas apresentou 98 mutações (ETA), com 93 sítios polimórficos (*S*), destes, 56 foram informativos para parcimônia; a diversidade nucleotídica (π) de 0,01689 ± 0,00110 e número médio de diferenças nucleotídicas (*K*) de 11,855.

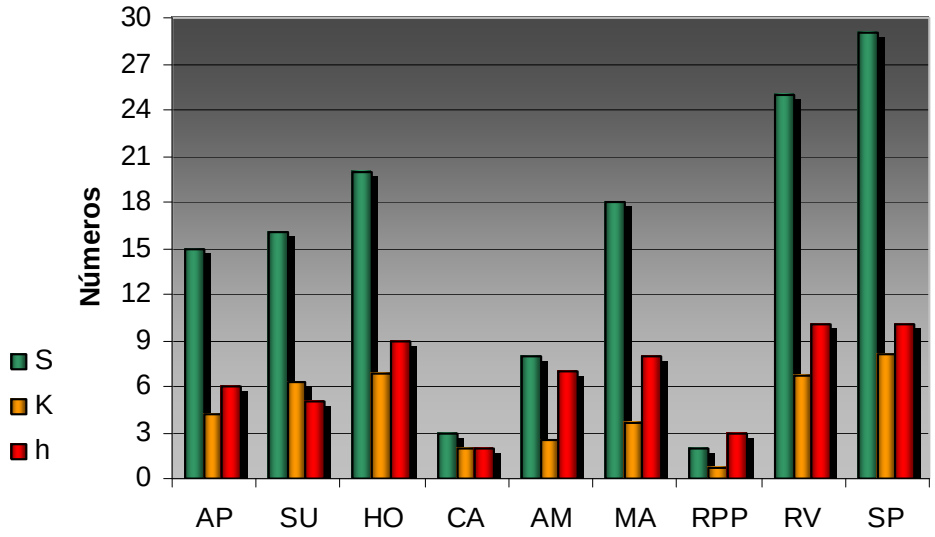

Figura 27. Histograma com os valores do número de sítios polimórficos (*S*); = número médio de diferenças nucleotídicas (*K*) e número de haplótipos (h) de *Simulium guianense s.l.* de diferentes populações geográficas, no Brasil. Onde: AP=Amapá; SU= RR, Surumu; HO= RR, Homoxi (área do foco Amazônico); CA= RR, Caroebe; AM=Amazonas; MA=Maranhão; RV= GO, Rio Verdão; RPP= GO, Rio Ponte de Pedras e SP=São Paulo.

2.3.2 Comparação entre populações

2.3.2.1 Distância genética entre as populações

Foi construída uma matriz diagonal de distância genética baseada no modelo de substituição nucleotídica 2 Parâmetros de Kimura (Tabela 11), visto que os dados obtidos apresentam valores de substituição por transição superior ao de transversão (Fig. 26). O método de distância é uma estatística quantitativa de quanto às seqüências comparadas par a par divergem geneticamente.

A distância genética intrapopulacional variou de 0,003 a 0,012, em RR-Caroebe e São Paulo, respectivamente, mostrando que a maioria dos indivíduos das populações ao norte da calha do rio Amazonas são mais similares, diferente das populações ao sul da calha do rio Amazonas, que mostram maior divergencia. As populações do norte: Amapá, RR-Caroebe e Amazonas em análise interpopulacional mostram alta similaridade genética e apresentam valores moderados e altos em relação às outras populações analisadas. A população do foco de oncocercose (RR-Homoxi) apresenta moderada distância genética em relação às populações do norte Amapá e Amazonas, aumentando quando comparadas às outras populações do resto do Brasil, Maranhão, Goiás (Rio Ponte das Pedras e Rio Verdão) e São Paulo, que se aproximou de 0,02.

As populações do Maranhão, GO-Rio Verdão e São Paulo em análise interpopulacional apresentam moderada distância genética, com exceção de GO-Rio Ponte de Pedras, que apresentou alto valor de distância genética. Esta mesma população, GO-Rio Ponte de Pedra, apresentou alta similaridade genética entre os indivíduos da mesma população e baixa similaridade quando comparada a todas outras populações geográficas examinadas.

Tabela 11. Matriz de distância baseado no modelo de substituição nucleotídica 2 Parâmetros de Kimura (10000 bootstrap). Valor de distância genética intrapopulacional na célula em evidência; abaixo desta, valores de distância genética entre as populações; acima, valor do desvio padrão. Onde: AP=Amapá; SU= RR, Surumu; HO= RR, Homoxi (área do foco Amazônico); CA= RR, Caroebe; AM=Amazonas; MA=Maranhão; RV= GO, Rio Verdão; RPP= GO, Rio Ponte de Pedras e SP=São Paulo.

COLEÇÕES	AP	SU	HO	CA	AM	MA	RV	RPP	SP
AP	0,006	0,003	0,003	0,001	0,001	0,004	0,003	0,008	0,004
SU	0,014	0,009	0,002	0,003	0,003	0,005	0,004	0,008	0,004
HO	0,013	0,011	0,01	0,003	0,003	0,004	0,004	0,008	0,004
CA	0,005	0,012	0,01	0,003	0,001	0,004	0,003	0,007	0,004
AM	0,005	0,013	0,012	0,003	0,004	0,004	0,003	0,007	0,003
MA	0,017	0,02	0,019	0,015	0,015	0,005	0,003	0,007	0,003
RV	0,015	0,018	0,018	0,013	0,013	0,013	0,01	0,006	0,002
RPP	0,034	0,037	0,038	0,033	0,032	0,034	0,028	0,001	0,007
SP	0,016	0,02	0,019	0,015	0,015	0,013	0,011	0,031	0,012

2.3.2.2. Freqüência e relações entre haplótipos

Análises inter e intrapopulacionais de distribuições e freqüências haplotípicas dos 80 indivíduos das nove populações geográficas de S. *guianense s.l.* foram obtidas usando a matriz de dados com 702 pb de seqüências nucleotídicas, com alta diversidade haplotípica de 0,982. Dentre as cópias gênicas foram detectados 56 haplótipos, usando o programa ARLEQUIN *3.01* (Schneider *et al*., 2006) (Tabela 12) e suas freqüências nas populações amostradas podem ser observadas em histograma (Fig. 28) e representadas as relações genealógicas das seqüências num cladograma obtido pelo programa TCS *1.06* (Clement *et al.*, 2000) (Fig. 29).

Os haplótipos quatro, cinco e 24 foram os mais compartilhados por indivíduos de populações diferentes, situados ao norte do Brasil. Também foram observados indivíduos da mesma população que compartilham o mesmo haplótipo, como nos haplótipos dois, 13, 14, 27, 31 e 35, sendo a maioria representante do norte do país, e três desses (27, 31 e 37) do nordeste e centro-oeste. Os restantes dos haplótipos foram representados por um único indivíduo das diferentes populações geográficas do Brasil, onde a maior número de haplótipos foi observado na população de GO-Rio Verdão e São Paulo, onde cada espécime corresponde a um haplótipo (Tabela 12).

No cladograma representativo das relações genealógicas dos haplótipos, pelo menos dois grupos foram separados do conjunto de populações de *S. guianense s.l.*, as populações que compartilham haplótipos ao norte da calha do rio Amazonas, referidas como norte, onde observamos o haplótipo mais ancestral (haplótipo cinco), e as populações ao sul da calha do rio Amazonas, nomeadas sul, apresenta maior variedade de números de haplótipos.

As populações do norte Amazonas, Amapá, RR-Caroebe, RR-Surumu e RR-Homoxi, compõem o grupo norte e compartilham haplótipos em comum: (Amapá + Amazonas + RR- Caroebe), (Amazonas + RR-Caroebe) e (RR-Surumu + RR-Homoxi).

As populações ao sul não compartilham os mesmos haplótipos, porém os haplótipos de São Paulo, Goiás-Rio Verdão e Maranhão estão separados no *cluster* sul, compartilhando haplótipos hipotéticos (separados por mutações) entre si.

As seqüências da população de GO-Rio Ponte de Pedra (espécie descrita como atípica) mostraram estar separada das outras populações geográficas de *S guianense*, na análise de TCS *v. 1.06* (Clement *et al.*, 2000) e foram retiradas ao ser montado o cladograma de estimativa das relações de haplótipos.

2.3.3. Estudo de genética populacional

Os valores de diferenciação genética intra e interpopulacional foram calculados pelo índice de estrutura populacional (Fst) para as nove populações geográficas de *S. guianense s.l.*, como também as estimativas do número de migrantes (Nm) entre elas (Tabela 13).

Os valores de Fst e Nm mostram que a população do foco Amazônico, RR-Homoxi apresenta moderada diferenciação genética quando comparado com a população de RR-Surumu (0,10606) e alto fluxo de genes (4,21429). Em relação às outras populações, inclusive do Amapá, RR-Caroebe e Amazonas, que são populações geográficas próximas, a população do foco Amazônico apresenta alto nível de diferenciação genética: 0,37006, 0,30716 e 0,41742, respectivamente, com baixo número de migrantes: 0,85112, 1,12782 e 0,69784 respectivamente.

As outras populações da região norte do Brasil, Amapá, RR-Caroebe e Amazonas, mostram baixo nível de diferenciação genética (entre -0,10161 e 0,2170) tal como as populações do centro-oeste e sudeste do Brasil, GO-Rio Verdão e São Paulo (0,01333), que apresentam altos valores no número de migrantes entre elas, mostrando que trocam alelos livremente. As populações geográficas de RR-Caroebe e Amazonas parecem compor uma mesma população, visto os valores de Fst e Nm.

Tabela 12. Número de haplótipos encontrados nas diferentes populações geográficas de *Simulium guianense s.l.*, do Brasil. Onde: AP=Amapá; SU=RR-Surumu; HO=RR-Homoxi (área do foco Amazônico); AM=Amazonas; MA=Maranhão; RV=GO-Rio Verdão; RPP=GO-Rio Ponte de Pedras e SP=São Paulo.

Amostras/Localidades	Haplótipos	AP	SU	HO	CA	AM	MA	RV	RPP	SP	Total
A1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A2, A6	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
A3	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A4, A7, A9, CA3, CA4	4	0	0	0	2	3	0	0	0	0	5
A5, AP3, AP4, AP5, AP9, CA1, CA2	5	4	0	0	2	1	0	0	0	0	7
A8	6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A10	7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
AP1	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AP2	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AP7	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AP8	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AP10	12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SU1, SU7, SU10	13	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
SU2, SU4	14	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
SU3	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
SU6	16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
HO1	17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HO2	18	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HO3	19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HO4	20	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HO5	21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HO6	22	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HO7	23	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HO8, SU5, SU9	24	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3
HO9	25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
MA1	26	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MA2, MA5, MA9	27	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
MA3	28	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MA4	29	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MA6	30	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MA7	31	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MA8	32	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MA10	33	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
RPP1, RPP2, RPP4, RPP5, RPP7, RPP8	34	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6
RPP3, RPP6	35	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
RPP9	36	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
RV1	37	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV2	38	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV3	39	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV4	40	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV5	41	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV6	42	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV7	43	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV8	44	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV9	45	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RV10	46	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
SP1	47	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP2	48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP3	49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP4	50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP5	51	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP6	52	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP7	53	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP8	54	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP9	55	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SP10	56	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Total	9	9	9	4	10	10	10	9	10	80

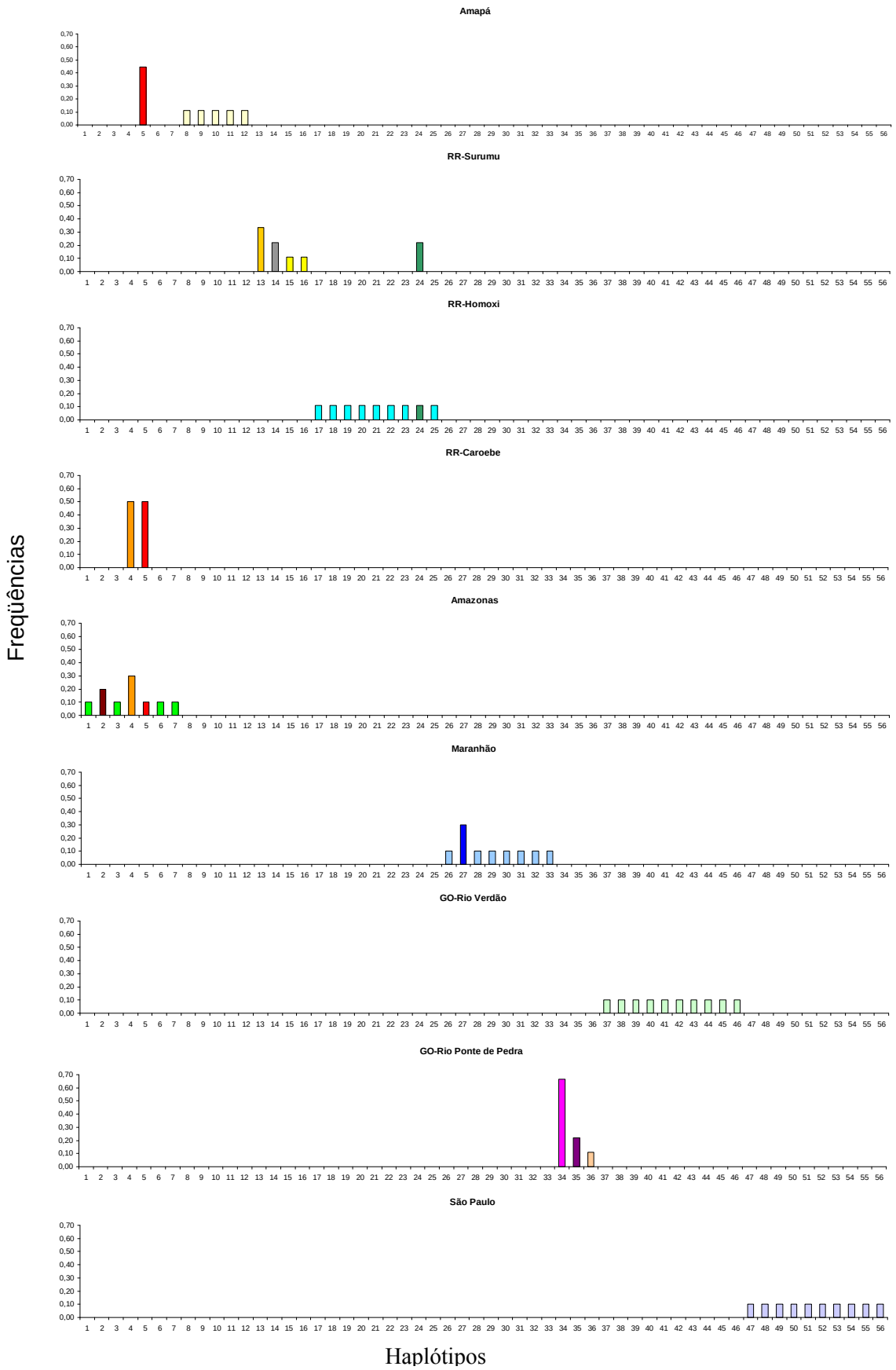

Figura 28. Histograma das freqüências dos haplótipos encontrados nas populações de *Simulium guianense s.l.*, no Brasil.

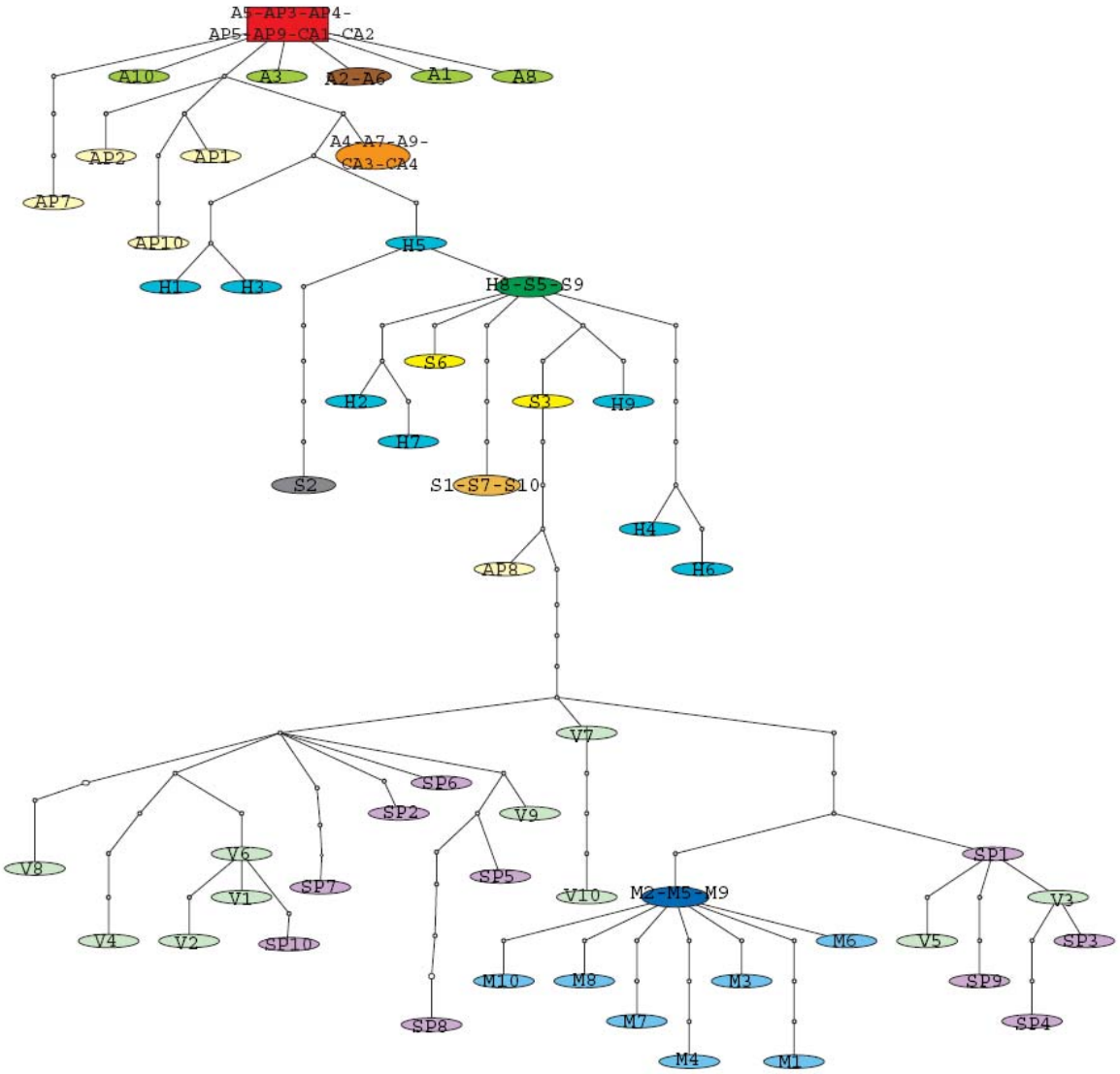

Figura 29. Cladograma representativo das estimativas de relações entre os haplótipos de *Simulium guianense s.l.,* no Brasil. Os tamanhos dos haplótipos correspondem às freqüências em que foram encontrados, e o haplótipo representado em retângulo é tido como mais ancestral. Onde: AP=Amapá; S= RR, Surumu; H= RR, Homoxi (área do foco Amazônico); CA= RR, Caroebe; A=Amazonas; M=Maranhão; V= GO, Rio Verdão e SP=São Paulo.

A população do nordeste do Brasil, Maranhão apresenta baixo nível de diferenciação genética, em relação às outras populações do Brasil (de 0,35897 a 0,70688), com uma certa estrutura populacional em relação às outras populações analisadas, sendo mais diferenciada em relação à população do Amazonas e menos em relação à população de São Paulo.

Tabela 13. Estudos populacionais de *Simulium guianense s.l.* pelo método de distância par a par, estimando os valores de F_{ST} (Estrutura populacional) interpopulacional, abaixo das cédulas em evidência; F_{ST} intrapopulacional, nas cédulas em evidência; e valores de Nm (Número de Migrantes), acima das cédulas em evidência. Onde: AP=Amapá; SU=RR-Surumu; HO=RR-Homoxi (área do foco Amazônico); AM=Amazonas; MA=Maranhão; RV=GO-Rio Verdão; RPP=GO-Rio Ponte de Pedras e SP=São Paulo.

COLEÇÕES	AP	SU	HO	CA	AM	MA	RV	RPP	SP
AP	0.62974	0,60749	0,85112	38,4	22,54464	0,25426	0,58315	0,05845	0,61816
SU	0.45147	0.61113	4,21429	0,69949	0,48169	0,27349	0,51646	0,07924	0,54625
HO	0.37006	0.10606	0.60518	1,12782	0,69784	0,32638	0,62498	0,08808	0,66892
CA	0.01285	0.41684	0,30716	0.65163	inf	0,22315	0,62377	0,02548	0,71604
AM	0.02170	0.50933	0,41742	-0,10161	0.64359	0,20734	0,50976	0,04143	0,5592
MA	0.66290	0.64642	0,60505	0,69142	0,70688	0.63415	0,65346	0,05378	0,89286
RV	0.46162	0.49190	0,44445	0,44493	0,49517	0,43348	0.60582	0,12748	37
RPP	0.89533	0.86321	0,85022	0,95152	0,92347	0,90288	0,79684	0.66025	0,13956
SP	0.44716	0,4779	0,42774	0,41117	0,47206	0,35897	0,01333	0,78179	0.59376

As populações foram divididas em três grupos: Norte - as que se localizam ao norte da calha do rio Amazonas (Amapá, RR-Surumu, RR-Homoxi, RR-Caroebe e Amazonas); Sul - as que estão ao sul da calha do rio Amazonas (Maranhão, Go-Rio Verdão e São Paulo) e a população atípica de GO-Rio Ponte de Pedras. Esta última população foi separada, pois apresenta característica de polimorfismo singular no conjunto de dados de seqüências, sendo pouco divergente entre os indivíduos que a compõe e muito variável quando comparada com as outras populações de *S. guianense s.l.*, e anteriormente foi descrita por Shelley *et al.* (2002) como forma atípica desta espécie, baseado na morfologia das larvas.

A variação molecular entre os grupos é maior (4,13329), correspondendo a 53%, do que entre os indivíduos de uma mesma população (1,22837), somente 16%. Dentro das populações, a variância molecular foi de 2,38294, ou seja, 31%. O índice de diferenciação genética (F_{ST}) entre os três grupos (Norte, Sul e atípica) foi de 0,53370 revelando alta estrutura populacional entre eles. Da mesma forma, entre as populações dentro dos grupos, com alto valor de diferenciação genética (0,69231) e entre as populações o índice de fixação foi de 0,34014 (Tabela 14).

Tabela 14. Matriz com resultados de AMOVA (Análise de Variância Molecular) e índices de diferenciação entre diferentes populações e grupos geográficos de *Simulium guianense s.l.* pelo método de distância das diferenças par a par, com Gama = 0.

Origem de variância	Grau de liberdade	Soma do quadrado	Componentes de variância	%	Índices de fixação
Entre os grupos (N, S e atípica)	2	220,626	4,13329 (Va)	53,37	F_{CT}=0,53370
Interpopulacional	6	78,472	1,22837 (Vb)	15,86	F_{SC}=0,34014
Intrapopulacional	71	169,189	2,38294 (Vc)	30,77	F_{ST}=0,69231
Total	79	468,288	7,74460		

O D_T de Tajima foi de -1,34874, não significativo (P>0,10), considerando o número total de mutações encontradas do conjunto de dados de seqüências das populações de *S guianense s.l.*. E valores de *D** = -2.30464 e *F** =-3.29783 (0.10>P>0.05) de Fu & Li (1993); e F_S de Fu (1997), - 32.790, e *S* de Strobeck (1987), 1, (P=0), com número de haplótipos <=56. A espécie *S. guianense s.l.*, no Brasil está dentro dos padrões de Neutralidade sem pressão de seleção, com possível população em expansão, de acordo com os resultados obtidos ns testes de D_T de Tajima (XX) e Fu & Li (1993).

2.3.4 Filogeografia de *S. guianense s.l.*, no Brasil

Usando o programa Mega *v. 3.0* (Kumar *et al.*, 2004) foi gerada uma árvore filogenética não enraizada pelo método de *Neighbor Joining* (NJ) baseada nos valores matriz de distância, de 2 Parâmetros de Kimura (K2P) calculado pelo programa DNA SP *3.0* (Rozas & Rozas, 1999), a partir do conjunto de 80 seqüências de *S. guianense s.l.* de diferentes populações geográficas, do Brasil, que representam as populações do Amazonas, Amapá, RR-Surumu, RR-Homoxi, RR-Caroebe, Maranhão, GO-Rio Verdão, GO-Rio Ponte de Pedra e São Paulo) e *S.duodenicornium*.

As seqüências *S.duodenicornium* foram incluídas a fim de relacionar a similaridade das seqüências das populações de *S. guianense s.l.* forma típica e forma atípica (GO-Rio Ponte de Pedra).

Foi possível distinguir dois grupos distintos, um ao norte da calha do rio Amazonas e outro ao sul (Fig. 30). No grupo do norte, Amapá, RR-Caroebe e Amazonas estão mais estreitamente relacionados, tal como os grupos de RR-Surumu e RR-Homoxi (representa o foco Amazônico de oncocercose). A população de GO-Rio Ponte de Pedra (tributário do rio Verdão), descrita anteriormente como *S. guianense s.l.* atípica aparece mais próxima das populações ao norte, Amazonas e Amapá.

No grupo do sul, GO-Rio Verdão e São Paulo estão estreitamente relacionados, enquanto que a população do Maranhão está mais relacionada à população de São Paulo e GO-Rio Verdão.

A população de GO-Rio Ponte de Pedra (tributário do rio Verdão) está bem distante dos grupos relacionados, assim como *S. duodenicornium,* por se tratar de uma provável espécie nova.

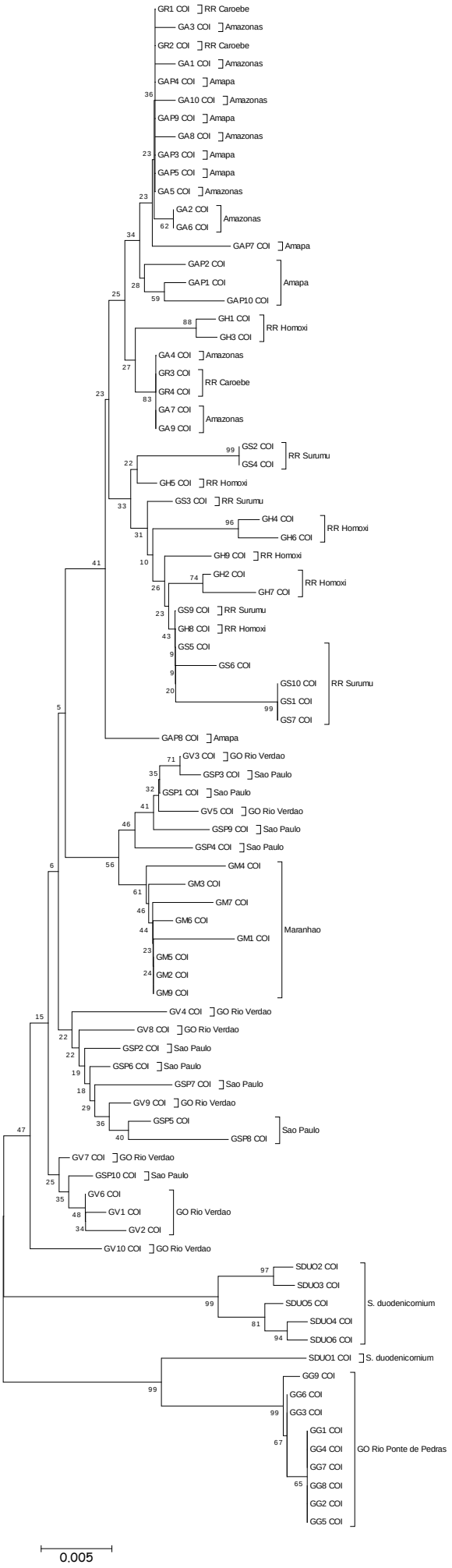

Figura 30. Árvore filogenética não-enraizada de distância K2P de diferentes populações geográficas de *Simulium guianense s.l.*, da forma atípica de GO-Rio Ponte de Pedra e *S. duodenicornium*, com 10.000 bootstrap.

DISCUSSÃO

A análise de seqüências do gene da subunidade I da Citocromo Oxidase do DNA mitocondrial mostrou ser uma ferramenta apropriada para realizar inferências sobre as relações intra e interespecíficas de *S. guianense s.l.*

A qualidade das seqüências obtidas e a ausência de eventos de inserção-deleção permitiram estabelecer de forma precisa relações de homologia entre sítios. Estas características coincidem com o esperado para uma região do DNA mitocondrial (um genoma haplóide que se replica essencialmente sem recombinação) codificador de uma proteína fundamental na respiração celular (o que impõe fortes restrições estruturais e funcionais ao acúmulo de mutações de "sentido trocado" e "sem sentido").

A combinação de uma amostragem geográfica abrangente, um número razoável de pares de bases por seqüência (>700) e uma diversidade haplotípica elevada permitiu estudar com detalhe as relações filogenéticas e a estrutura populacional de *S. guianense s.l.*

Outros investigadores utilizaram o mesmo fragmento genômico para realizar inferências sobre a radiação insular do subgênero *Inseliellum* no Pacífico (Joy & Conn, 2001) e sobre a filogeografia intraespecífica de *S. tani* na Tailândia (Pramual *et al.*, 2005).

Os genes mitocondriais que codificam as subunidades menores de RNAr (12 S e 16 S) e Citocromo Oxidase (subunidade II) podem ser úteis para resolver relações mais basais em simulídeos. Porém, esses genes se mostram muito conservados para estudos intrapopulacionais ou entre espécies muito próximas (Xiong & Kocher, 1993; Tang *et al.*, 1995; 1996; 1998; Pruess *et al*., 2000; Joy & Conn, 2001; Krueger & Hennings, 2005). Estes trabalhos sugerem, que seqüências de COI podem ser altamente informativas com respeito a relações intraespecíficas e de espécies próximas, pois nas mesmas populações estudadas, o número de sítios polimórficos foi bem elevado, como também a diversidade haplotípica.

Altos valores de mutações gênicas do tipo substituição por transição foram notáveis na matriz de dados. Também foram observadas altas taxas de AT isso parece ser comum em regiões do genoma mitocondrial de dípteros, incluindo simulídeos (Tautz et al. 1988; Baldridge & Fallon, 1991; Xiong & Kocher, 1991; Liu & Beckenbach, 1992; Pruess *et al.*, 1992; Miller et al., 1997; Pruess et al., 2000).

Nas diferentes populações estudadas, a diversidade haplotípica é bem elevada tanto em nível inter como intrapopulacionais. Pelo cladograma, que representa a relação dos 56 haplótipos encontrados, de 71 seqüências totais amostradas de *S. guianense s.l.* e pelos valores de diferenciação populacional e números de migrantes reforçam a distribuição dos haplótipos

separados em dois *clusters* com estrutura populacional bem definida. Inicialmente um cluster formado por populações do Norte, unindo as populações do Amazonas, Amapá e RR-Caroebe; e RR-Surumu e RR-Homoxi. O segundo cluster, composto pelos Estados de São Paulo, GO-Rio Verdão e Maranhão que aqui chamamos de Sul.

A separação geográfica desses dois clusters corresponde à calha do rio Amazonas. Segundo Mayr (1963), rios podem servir de barreira geográfica. Em espécies do complexo *S. damnosum*, da África também podemos ver através de estudos de seqüências mitocondrial 16S e nuclear ITS2 de DNAr, a separação em dois *clusters* do leste e oeste da África (Kruger *et al.*, 2000; Krueger & Hennings, 2005).

É possível que a faixa de área que compreende a calha do rio Amazonas funcione como uma barreira que dificulta a dispersão da espécie, sendo uma área extensa de planície que não favorece a presença dos criadouros naturais de *S. guianense s.l.* Habitats registrados para essa espécie tem sido rios largos e principalmente caudalosos com corredeiras rápidas, tendo como substrato, plantas da família Podostomaceae encontradas no leito desses rios (Shelley *et al.*, 1997; Py Daniel *et al.*, 1999).

Entretanto, a distribuição geográfica de *S. guianense s.l.* assinalada na literatura indica sua ocorrência no rio Tapajós na localidade do Parque Nacional da Amazônia/ Itaituba, rio Uruá/Itaituba, no rio Iriri Altamira/Laranjal, rio Xingu/Altamira e no rio Anapu Marabá/Altamira (Shelley *et al.* 1997). Todas essas localidades estão mais próximas da calha do rio Amazonas e não foram amostradas. Considerando que em simulídeos ocorrem migrações a longa distância com a ajuda de ventos (Crosskey, 1990), é necessário um esforço amostral maior nesta faixa de área antes que possamos afirmar que essa região realmente atue como barreira para a dispersão da espécie. Tal como em estudo realizado na Tailândia com *S. tani* (Pramual *et al*. 2005).

No grupo Sul, a população amostrada de *S. guianense s.l.* do Maranhão (Nordeste) aparece ser procedente das populações de São Paulo e GO-Rio Verdão (Sudeste e Centro-Oeste). Porém, enquanto as populações de São Paulo e de GO-Rio Verdão se conectam por haplótipos intermediários (não-amostrados), os haplótipos que correspondem à população do Maranhão, estão bem separados e relacionados entre si. Essa população também mostra estruturação genética em relação às outras, do grupo sul (São Paulo e Rio Verdão). Por mais que adaptação ecológica pareça ser a explanação mais provável das diferenças encontradas é possível existir causas alternativas como a falta de amostragem nessa faixa intermediária. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo populacional de *Aedes aegypti* L. que apresenta uma amostragem de populações similares às utilizadas neste trabalho e, as

populações do nordeste do Brasil, ficaram mais próximas da população de São Paulo, e a do Amazonas mais separada (Ayres *et al.,* 2003).

A amostra do Maranhão analisada é procedente de um tributário do rio Tocantins e, portanto, uma bacia hidrográfica intermediária, entre as outras estudadas, mas seria necessário um esforço maior de coletas nessa região para melhor entender sua relação com os haplótipos no cluster Sul. E também, para compreender a estruturação genética dessa população em relação às outras populações de *S. guianense s.l.*, no Brasil. Evidências que reforçam essa afirmação estão na descrição de diferentes citótipos de *S. guianense s.l.*, encontrados por Charalambous *et al.* (1996) ao estudar o padrão de bandeamento dos cromossomos politênicos. Esses autores identificaram quatro citótipos: rio Xingú (D), rio Oiapoque (B) e dois no rio Tocantins (A, C). Um dos citótipos do rio Tocantins (A) foi encontrado próximo à cidade de Minaçu, no estado de Goiás, situada abaixo do ponto da nossa amostragem. O segundo citótipo descrito (C), também no rio Tocantins, foi encontrado no Estado do Maranhão a 30 Km de distância da cidade de Imperatriz, na área acima da foz do tributário onde foram coletadas as amostras dos haplótipos do Maranhão encontrados neste trabalho.

Pelo valor de distância genética, composição de haplótipos e Análise de Variância Molecular (AMOVA) a população de Goiás, rio Ponte de Pedra (tributário do rio Verdão) parece se tratar de uma espécie nova. Esse fato é corroborado por caracteres morfológicos, no estágio de larva, já relatado por Shelley et *al.* (2002), mas que consideraram apenas como uma forma atípica. Diferenças adicionais nos estágios de pupa e adultos (informações não publicadas do laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos) vêm reforçar os resultados das análises moleculares.

As características das larvas e pupas podem ser observadas na identificação do material referido no Capítulo 1, em larvas de último estádio e pupas, uma característica marcante é a presença de estriações ao longo dos filamentos branquiais da forma típica de *S. guianense s.l.*, característica não observada na forma atípica. Outras características morfológicas que diferenciam essas duas formas é a forma da placa ventral e do escudo do macho adulto. Fêmeas adultas das duas formas são similares, apresentando escudo negro com cerdas prateadas, formando grupos dispostos em fileiras. O macho da forma típica de *S.guianense s.l.* apresenta escudo negro com manchas nacaradas, formando duas áreas negras circulares (uma em cada lateral). Na forma atípica, há apenas duas manchas nacaradas, na região antero-lateral; não há formação dessas manchas negras, circulares (Dados não publicados do Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos – Apêndice B – Figs. 31). Outra diferença pode ser observada na genitália dos machos (Dados não publicados do

Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos – Apêndice B – Fig. 32). Em Calyptratae (Dipera: Brachycera), estudos de seqüências de DNA ribossomal 16 S, serviram de apoio à classificação baseada em dados morfológicos tradicionais, de três superfamílias (Nirmala *et al.,* 2001), esse fato serve de exemplo de como dados morfológicos tradicionais podem vir a corroborar dados moleculares.

Outra evidência que suporta a população de GO-Rio Ponte de Pedras como espécie nova são as características observadas na estrutura dos cromossomos politênicos das larvas, tal como inversões fixas no braço IIS e IIIS, que não foram observadas em outras populações estudadas (Capitulo I desta dissertação). Por meio de inversões fixas podem ser inferidas relações filogenéticas entre espécies, tal como em *Simulium decorum* Walker que foi considerada estar formada por linhagens distintas de *S. venustum* Say e *Simulium verecundum* Stone & Jamnback por um único passo de inversão no IIS sugerindo que *S. decorum* pode ser derivado de um ancestral de espécie críptica de *S. venustum* (Xiong & Kocher, 1993*).* Segundo Duncan *et al.* (2004) e Krueger & Hennings (2005), dados citogenéticos e moleculares podem ser concordantes e fornecer maior consistência aos estudos.

No grupo Norte, foi observado um agrupamento com as populações de RR-Surumu e RR-Homoxi compartilhando haplótipos e outro agrupamento com as populações do Amapá, RR-Caroebe e Amazonas. Com relação aos agrupamentos observados, a explicação mais apropriada para a separação das populações do mesmo Estado de RR-Surumu e RR-Caroebe pode ser a adaptação ecológica dessas populações ao ambiente. O Estado de Roraima apresenta tipos de coberturas vegetais bastante diversificados com aspecto de mosaico que se sobrepõem irregularmente, passando de um tipo ao outro de forma abrupta (Silva, 1997). A área de Surumu é representada predominantemente por savana, enquanto que Caroebe, por floresta. Desse modo, a separação encontrada entre essas populações pode estar associada a essas diferentes condições ambientais. Os compartilhamentos de haplótipos das populações do Amapá, RR-Caroebe e Amazonas podem estar relacionados com perfis paisagísticos semelhantes e uma rede hidrográfica com criadouros que favorecem seu desenvolvimento, apesar da distância geográfica do Amapá.

Os haplótipos da população de RR-Homoxi (área do foco de oncocercose) são compartilhados apenas com a população de RR-Surumu (fora do foco). Analisando as bacias hidrográficas observamos que o Rio Surumu se une ao Rio Tacutu, que por sua vez encontra o rio Uraricoera formando o rio Branco. O rio Uraricoera corresponde à cerca de 25,5% da área da bacia do rio Branco, em uma região bastante acidentada, com muitas corredeiras e cachoeiras e que se formam dentro da área do foco na serra do Parima. Assim, apesar da

distância entre as localidades, distinção entre ecossistemas e relevo é possível sugerir que o fluxo gênico entre essas populações esteja ocorrendo com a migração através do vale do rio Uraricoera. Igualmente, a presença de *S. guianense s.l.* foi assinalada (Shelley *et al*. 1997) na localidade de Palimiú que se localiza praticamente no meio de toda a extensão do rio Uraricoera área considerada mesoendêmica no foco de oncocercose.

Uma implicação referente ao compartilhamento de haplótipos das populações de RR-Homoxi e RR-Surumu ilumina uma questão que sempre foi muito discutida em relação a dinâmica da transmissão da oncocercose, onde *S. guianense s.l.* é o principal vetor, nas áreas hiperêndemicas do foco de oncocercose humana no Brasil. A área do foco de oncocercose humana está situada na parte noroeste do Estado de Roraima e norte do Estado do Amazonas e consiste na área de reserva dos índios Yanomami que é dividida em terrenos altos e baixos com endemia em diferentes níveis. A parte alta, de aproximadamente 600 a 1.500 metros de altitude, é hiperêndemica com mais de 60% de pessoas infectadas. A área de terrenos baixos, comporta de forma hipoendêmica com até 20% de indivíduos infectados e uma terceira área considerada mesoêndemica com percentuais entre 21 - 59% de pessoas infectadas (Shelley *et al*., 1997). Nessas áreas, evidências reforçam a possibilidade de existirem complexos de espécies. Nas áreas consideradas hipoendêmicas, o principal vetor incriminado é *S. oyapockense/roraimense*, apresenta um comportamento altamente antropofílico e o vetor secundário *S. guianense s.l.* nessas áreas não apresenta o mesmo comportamento. Contraditoriamente, nas áreas hiperêndemicas, *S. guianense s.l.* é altamente antropofílico sendo considerado vetor primário e *S. oyapockense/roraimense* vetores secundários (Shelley, 1994). O comportamento hematofágico tem sido o caráter mais variável nas espécies de *S. guianense s.l.*. De fato, diferentes padrões quanto à atividade de picar e a preferência a hospedeiros são os principais indicativos de que as populações de *S. guianense s.l.* não seriam homogêneas na sua extensa distribuição geográfica.

As variações nas populações de *S. guianense s.l.* de uma área não podem ser consideradas como eventos isolados, mas como resultante da interação de diferentes influências, como as características do criadouro, mudanças de clima, quantidade, intensidade e periodicidade de chuvas, tipos de relevo, rochas do embasamento e história geomorfológica.

3. CONCLUSÃO

Mapas citogenéticos de cromossomos politênicos de três populações geográficas de *S. guianense s.l.* foram elaborados e analisados. As seqüências de bandeamento das populações do Amazonas e São Paulo são semelhantes ao padrão de bandeamento do citótipo

A, das populações de Goiás (Serra da Mesa, Rio Tocantins e Estrada Minaçu/ Palmeriópolis, Rio Mucambão) descrito por Charalambous *et al.* (1996). As populações do Amazonas e São Paulo apresentaram inversões polimórficas características, sendo que a do Amazonas compartilha a mesma inversão polimórfica da população de Goiás, Rio Tocantins (citótipo A) descrito por Charalambous et *al*. (1996), ambas as populações se localizam em ambiente a jusante de hidrelétrica.

A população de Goiás, Rio Ponte de Pedra, tributário do Rio Verdão apresentou duas inversões fixas, indicando se tratar de uma espécie distinta de *S. guianense s.l.* Esses dados são corroborados com valores de distância genética, resultantes das análises das seqüências mitocondrial COI, sugerindo que essa população é distante geneticamente das outras populações de *S. guianense s.l.* examinadas. Essa população corresponde à forma atípica de *S. guianense s.l.*, descrita por Shelley *et al.* (2002), caracterizada por esses autores com base na presença de um par de tubérculos na superfície dorso-lateral dos seguimentos abdominais 1-6, cerdas densas presentes na superfície dorso-lateral do integumento abdominal, com coloração do corpo cinza-escuro e marrom escuro.

Os valores de diversidades nucleotídicas e haplotípicas de populações provenientes dos estados do Amapá, Amazonas, Goiás (Rio Verdão), Roraima (Caroebe, Surumu e área do foco Amazônico, Homoxi), Maranhão e São Paulo indicam alta variabilidade genética. Provavelmente esse fato está relacionado com a adaptação a diferentes características ambientais, principalmente as populações de São Paulo, Rio Pardo e Goiás, Rio Verdão, populações do sudeste e centro-oeste, localizadas em áreas com alto impacto antrópico.

Análises de rede de haplótipos e árvore filogenética baseada em distância genética pelo método 2 Parâmetros de Kimura de diferentes populações geográficas de *S. guianense s.l.* permitiram separar dois grupos, um ao norte da calha do rio Amazonas e outro ao sul.

Os resultados obtidos pelas análises citotaxonômicas, pela análise do padrão de bandeamento cromossômico, e molecular usando análises das seqüências do gene mitocondrial COI, das populações de *S. guianense s.l.,* do Amapá, RR-Surumu, RR-Homoxi (área do foco), RR-Caroebe, Amazonas, Maranhão, São Paulo e GO-Rio Verdão indica que a *S. guianense s.l.*, apesar de se tratar de uma espécie bastante polimórfica e com alta adaptação a habitas diferentes, não abriga um complexo de espécies crípitcas no Brasil.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, P.H. 1987. A new North American species in the *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae) and analysis of its polytene chromosomes. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 89: 673-681.

Adler, P.H. 1994. Simuliidae. p. 478-487. *In:* Morse, J.C.; Yang, L.; Tian, L. (eds.). *Aquatic Insect of China useful for monitoring water quality.* University Hohal.

Adler, P.H.; Currie, D.C.; Wood, D.M. 2004. *The Black Flies (Simuliidae) of North America*. Cornel University Press, United States of America. 941p.

Adler, P.H.; Kim, K.C. 1986. The black flies of Pennsylvania (Simuliidae, Diptera): bionomics, taxonomy, and distribution. *Bulletin Pennsylvania State University Agricultural Experiment Station,* 856: 88p.

Alencar, Y.B.; Ludwig, T.A.V.; Soares, C.C.; Hamada, N. 2001. Stomach content analyses of Simulium perflavum Roubaud 1906 (Diptera: Simuliidae) larvae from streams in Central Amazonia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96: 561-576.

Alvan-Aguilar, M.A.; Hamada, N.; Adler, P.H.; Luz, S.L.B. 2005. Cytotaxonomy of *Simulium cauchense* Floch & Abonnenc and *Simulium quadrifidum* Lutz (Diptera:Simuliidae) in Brazilian Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100: 249-257.

Avise, J.C. 1994. Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall. New York, London. 511p.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. 3ª ed., Harvard University, Cambridge-Massachusetts London, England. 447p.

Avise, J.C.; Trexler, J.C.; Travis,J.;Nelson, W.S. 1991. *Poecilia mexicana* is the recent female parent of the unisexual fish *P. formosa*. *Evolution*. 45: 1530-1533.

Arteaga, L.T; Muñoz de Hoyos, P. 1999. New Cytotype in the *Simulium metallicum* Complex (Diptera: Simuliidae) from Cundinamarca, Colombia. *Journal of Medical Entomology.* 32: 133-140.

Ayres, C.F.J.; Melo-Santos,M.A.V.; Solé-Cava, A.M.; Furtado,A.F. 2003. Genetic Differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the Major Dengue Vector in Brazil. *Journal of Medical Entomology.* 40: 430-435.

Baldridge,G.D.; Fallon, A.M. 1991. Nucleotide sequence of a mosquito 18S ribosomal RNA gene. *Biochimica et Biophisica Acta*. 1089: 396-400.

Bayoh, M.N.; Thomas, C.J.; Lindsay,S.W. 2001. Mapping distributions of chromosomal forms of *Anopheles gambiae* in West Africa using climate data. *Medical and Veterinary Entomology*. 15: 267-274.

Bedo, D.G. 1977. Cytogenetics and evolution of *Simulium ortinapes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling Speciaton. *Chromosoma*. 64: 37-65.

Bedo, D.G. 1979. Cytogenetics and Evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). II. Temporal variations in chromosomal polymorphisms and homosequential sibling species*. Evolution*, 33: 296-308.

Bedo, D.G.1984. Sibling species and sex chromosome differentiation in *Simulium neornatipes* (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology.* 26: 318-325.

Behura, S.K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology.* 15: 3087-3113.

Boakye, D.A.; Post, R.J.; Mosha, F.W.; Surtees, D.P.; Baker, R.H.A. 1993. Cytotaxonomic revision of the *Simulium sanctipauli* subcomplex (Diptera: Simuliidae) in Guinea and adjacent countries including descriptions of two new species. *Bulletin of Entomological Research*. 83: 171-186.

Brockhouse, C. 1985. Sibling species and sex chromosomes in *Eusimulium vernum* (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*. 63: 2145-2161.

Brockhouse, C.; Vajime, C.G.; Marin, R.; Tanguay, R.M. 1993. Molecular identification of onchocerciasis vector sibling species in black flies (Diptera: Simuliidae). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 194: 628-634.

Brooke, B.D.; Hunt, R.H.; Chandre, F.; Carnevale, P.; Coetzee, M. 2002. Stable Chromosomal Inversion Polymorphisms and Insecticide Resistence in the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 39: 568-573.

Campos- Gaona, J.; Andrade, C.F.S. 1999. Aspectos da Entomologia Médica e Veterinária dos Borrachudos (Diptera: Simuliidae)-Biologia, Importância e Controle. *Lecta*. Bragança Paulista. 17: 51-65.

Campos- Gaona, J.; Recco- Pimentel, S.M.; Andrade, C.F.S. 1996. Polytene chromosome analysis of a population of *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 19: 47-52.

Campos-Gaona, J.; Andrade, C.F.S.; Recco-Pimentel, S.M. 2001. Chromosomal comparisons among and within populations of *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* (Diptera, Simuliidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 365-369.

Carson, H.L.; Kaneshiro, K.Y. 1976. Drosophila of Hawaii: Systematics and ecological genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 7: 311-345.

Caterino, M.S.; Cho, S.; Sperling, F.A.H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology*. 45: 1-54.

Charalambous, M.; Shelley, A.; Herzog, M.M. & Luna Dias, A P.A .1996. Four new cytotipes of the onchocerciasis vector blackfly *Simulium guianense* in Brasil. *Medical and Veterinary Entomology*. 10: 111-120.

Coelho, G.E.; Vieira, J.B.E.; Garcia-Zapata, M.T.A.; Shuertz, J.C.M. 1998. Identificação de áreas de estratificação epidemiológica no foco de oncocercose na região Yanomami, Roraima, Brasil, *Cadernos de Saúde Pública*. 14:109-118.

Conn, J., Rothfels, K.H., Procunier, W.S., and Hirai, H. 1989. The *Simulium metallicum* species complex (Diptera: Simuliidae) in Latin America: a cytological study. *Canadian Journal of Zoology.* 67: 1217-1245.

Conn, J. 1990. Chromosome key to the larvae of the *Simulium metallicum* complex (Diptera: Simuliidae) from Latin America*. Journal of Medical Entomology*., 27: 459-466.

Coscarón, S. 1991. Fauna de agua dulce de la Republica Argentina. FECIC, Argentina. 304p.

Crosskey, R.W. 1988. Annotated checklist of the world black flies (Diptera: Simuliidae). In: Kim, K.C. and Merrit, R.W. (Eds). *Black Flies: Ecology, Population Management, and Annoted World List*. Ed. The Pennsylvania state University, University Park and London. pp. 425-520.

Crosskey, R.W. 1990. Life in the water.*In:* Wiley, J.& Sons (Eds). *The natural history of blackflies.* The Museum of Natural History Press, London. p. 89-293.

Crosskey, R.W.; Howard, T. 2004*. A revised taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera:Simuliidae).* The Natural History Museum, London. 78 p.

Cunha, M.C.I. 2001. Simulídeos (Borrachudos). *In:* Marcondes, C.B.(Ed). *Entomologia Médica e Veterinária.* Ed. Ateneu, São Paulo. p. 31-47.

Da Cunha, A.B. 1960. Chromosomal variation and adaptation in insect. Annual *Review of Entomology*. 5: 85-110.

Dobzhansky, T. 1973. Genética do Processo Evolutivo. Polígono. São Paulo. 453 p.

Dunbar, R.W. 1959. The salivary gland chromosomes of seven forms of blackflies included in *Eusimulium aureum* Fries. *Canadian Journal of Zoology.* 37: 495-525.

Duque, S.; Muñoz de Hoyos, P.; Rothfels, K. 1988. The polytene chromosomes of *Simulium (Ectemnaspis) ignescens* Roubaud and the related species Simulium "C", both from Colombia. *Canadian Journal of Zoology.* 66: 300-309.

Duncan, G.A.; Adler, P.H.; Pruess,K.P.; Power,T.O. 2004. Molecular differentiation of two sibling species of the black fly *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) Based on random amplified polymorphic DNA. *Genome*. 47: 373-379.

Feraday, R.M., Leonhardt, K.G., and Brockhouse, C.L. 1989. The role of sex chromosomes in black fly evolution. *Genome*. 32: 538-542.

Finn, D.; Theobald, D.M.; Black, W.C.; Poff, L. 2006. Spatial population genetic structure and limited dispersal in a Rocky Mountain alpine stream insect. *Molecular Ecology.* 15: 3553-3566.

Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology.* John Wiley & Sons, Southern Gate, England.388 p.

Grillet, M.E.; Basañez, M.G.; Vivas-Martinez, S.; Villamizar, N.; Frontado, H.; Cortez, J.; Corone, P.; Botto, C. 2001. Human Onchocerciasis in the Amazonian Area of Southern Venezuela: Spatial and Temporal Variations in Biting and Parity Rates of Black Fly (Diptera: Simuliidae) Vectors. *Journal of Medical Entomology.* 38: 520-530.

Guerra, M. 1988. Introdução a Citogenética Geral. Guanabara S. A., Rio de Janeiro. 142 p.

Hadi, U.K.; Takaoka, H.; Aoki, C. 1995. Larval gland chromosomes of the blackfly, *Simulium (Gomphostilbia) yaeyamaense* (Diptera:Simuliidae) from Ryukyu Islands, Japan. *Japanese Journal of Sanitary Zoology.* 46: 235-239.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symposium Series*. 41:95-98.

Hamada, N. 1989. *Aspectos bioecológicos de larvas de Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Melo, 1967*, com referência a larvas de Simulium rorotaense* Floch &Abonnenc*,* 1946 (Diptera: Simuliidae) *na Reserva Florestal Ducke, Amazônia Central. Manaus, Amazonas*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia/Universidade Federal do Amazonas INPA/ UFAM. 106 p.

Hamada, N.; Adler, P.H. 1999. Citotaxonomy of four species in the *Simulium perflavum* Species-Group (Diptera: Simuliidae) from Braziliam Amazonia. *Systematic Entomology*. 24: 273-288.

Hamada, N.; Grillet, M. E. 2001. Black flies (Diptera: Simuliidae) of the Gran Sabana (Venezuela) and Pacaraima Region (Brazil): Distributional data and identification keys for larvae and pupae. *Entomotropica*. 16: 29-49.

Hamada, N.; McCreadie, J.W. 1999. Enviromental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. *Hydrobiologia*, 397: 71-78.

Hardikar, A.; Nath,B. 2001. Chromosomal polymorphism is associated with nematode parasitism in a natural population of a tropical midge. *Chromosoma*. 110: 58-64.

Hillis, D.M; Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*. 66:411-453.

Hirai, H. 1985. The salivary gland chromosomes of *Simulium metallicum* Bellardi from northen Venezuela. In: Tada, I. (Ed). A comparative study on onchocerciasis between South and Central America. Shimoda Printing & Co. Ltd., Kumamota, Japan. p. 67-73.

Hirai, H. 1987. Cytotype of *Simulium metallicum* in Miranda, an endemic area in northern Venezuela for onchocerciasis. In: Tada, I. A comparative Study on Onchocerciasis between South and Central America. Shimoda Print. Matsubase, Kumamoto. p. 56-57.

Hirai, H.; Uemoto, K. 1983. The analysis of salivary gland chromosomes of *Simulium ochraceum* from Guatemala and México. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*. 34: 120.

Hirai, H.; Procunier, W.S.; Ochoa, J.O.; Uemoto, K. 1994. A cytogenetic analysis of the *Simulium ochraceum* species complex (Diptera: Simuliidae) in Central America. *Genomes*. 37: 36-53.

Joy, D.A.; Conn, J.E. 2001. Molecular and Morphological Phylogenetic Analysis of an Insular Radiation in Pacific Black Flies (*Simulium*). *Systematic Biology*. 50: 18-38.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 1998. *Biologia Celular e Molecular*. 7ªed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 339p.

Krueger, A.; Hennings, I. 2005. Molecular phylogenetics of blackflies of the Simulium damnosum complex and cytophylogenetic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39: 83-90.

Krüger, A.; Gelhaus,A.; Garms,R. 2000. Molecular identification and phylogeny of East African *Simulium damnosum s.l.* and their relationship with West African species of the complex (Diptera: Simuliidae). *Insect Molecular Biology*. 9: 101-108.

Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.

Kuvangkadilok, C.; Bkemtong, C.; Phayuhasena, S.; Baimai, V. 2003. Larval polytene chromosomes of black flies (*Simulium*) from Thailand. *Genética.* 118: 69-81.

Leonhardt, K.G. 1985. A Cytological study of species in *Eusimulium aureum* group (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*. 63: 2043-2061.

Le Tourneau; Albert, B. 2005. Sensoriamento remoto num contexto multicisciplinar: atividade garimpeira, agricultura ameríndia e regeneração natural na Terra Indígene

Yanomami (Roraima). *Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto.* INPE. p. 583-591.

Linton, Y.M.; Mordue (Luntz), A.J.; Cruickshank, R.H.; Meiswinkel, R.; Mellor, P.S.; Dallas,J.F. 2002. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Medical and Veterinary Entomology*. 16: 139-146.

Liu, H.; Beckenbach,A.T. 1992. Evolution of the mitochondrial Cytochrome Oxidase II gene among ten orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 1: 41-52.

Loxdale, H.D. & Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*. 88: 577-600.

Lunt, D.H., Zhang, D.X.; Szymura, J.M.; Hewitt, G.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primer for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*. 5: 153–165.

Luz, S.; Shelley, A.J.; Maia-Herzog, M. 1996. The need for an Integrated Approach to the Taxonomy of Neotropical Simuliidae, with Special Reference to Larval Colour. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91: 721-722.

Manguin, S.; Wilkerson, R.C; Conn, J.E.; Rubio-Palis, Y; Danoff-Burg, J.A.; Roberts, D.R. 1999. Populations structure of the primary malaria vector in south America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 60: 364-376.

Mayr, E. 1963. Animal Species and Evolution. Harvard Universit, Cambridge, MA, p. 811.

McCreadie, J.W. and Colbo, M.H. 1991. The influence of temperature on the survival, development, growth, and chromosome preparation quality of the EFG/C, ACD, and AA cytotypes of the *Simulium venustum - verecundum* complex (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*. 69: 1356-1365.

Merida, A.M.; Palmieri, M.; Yurrita, M.M.; Molina, A; Molina, E.; Black, W.C. 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 230-239.

Millest, A. L. 1992. Identification of members of the *Simulium ochraceum* species complex in the three onchocerciasis foci in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*. 6: 23-28.

Miller, J.S.; Brower, A.V.Z.; DeSalle, R. 1997. Phylogeny of the Neotropical morth tribe Josini (Notodontidae: Dioptinae): combining and comparing evidence from DNA sequences and morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 60: 297-316.

Miranda-Esquivel, D. R.; Coscarón, S. 2001. Cladistic analysis of *Simulium* (*Trichodagmia*) and *Simulium (Thyrsopelma*) (Diptera: Simuliidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 132: 429-439.

Monteiro, F.A.; Wesson, D.M.; Dotson, E.,M.; Schofield, C.J.; Beard, C.B. 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derivad from mitochondrial and nuclear DNA sequences *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 62: 460-465.

Morales-Hojas, R.; Post, R.J.; Cheke, R.A.; Wilson, M.D. 2002 a. Assessment of rDNA IGS as a moleclar marker in *Simulium damnosum* complex. *Medical and Veterinary Entomology*. 16: 395-403.

Morales-Hojas, R.; Post, R.J.; Wilson, M.D.; Cheke, R.A. 2002 b. Completion of the sequence of the nuclear ribosomal DNA subunit of *Simulium sanctipauli,* with descriptions of the 18S, 28S genes and the IGS. *Medical and Veterinary Entomology* .16: 386-394.

Moulton, J.K. 2000. Molecular sequence data resolves basal divergentes within Simuliidae (Diptera). *Systematic Entomology*. 25: 95-113.

Moulton, J.K. 2003. Can the current molecular arsenal adequately track rapid divergente events within Simuliidae (Diptera)?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 27: 45-57.

Muñoz de Hoyos. 1990. La importancia de los cromosomas politênicos en la determinación taxonomica de los simulados. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 16: 511-520.

Neves, D.P. 1979. *Parasitologia Humana*. 4ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 368 p.

Nirmala, X.; Hypša,V.; Žurovec,M. 2001. Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution of 18S and 16S ribossomal rDNAs in higher dipterans and their use in phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology*. 10: 475-485.

Orengo, D.J.; Prevosti, A. 2002. Relationship between chromosomal polymorphism and wing size in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Genetica.* 115: 311-318.

Post, R. J. 1982. Sex-linked inversions in blackflies (Diptera: Simuliidae). *Heredity*. 48: 85-93.

Post, R.J. 1986. The citotataxonomy of *Simulium sanctipauli* and *Simulium soubrense* (Diptera: Simuliidae). *Genetica*. 69: 191-207.

Post, R.J.; Flook,P. 1992. DNA probes for the identification of members of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae). *Medical and Veterinary Entomology*. 6: 379-384.

Pramual, P.; Kuvangkadilok,C.; Baimai,V; Walton.C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*. 14: 3989-4001.

Procunier, W.S. 1982. A cytological study of species in *Cnephia* s. str. (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology.* 60: 2866-2878.

Procunier, W. S., Shelley, A. J., and Arzube, M. 1985. Sibling species of *Simulium exiguum* (Diptera: Simuliidae), the primary vector of onchocerciasis in Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Higiene y Medicina Tropical*. 35: 49-59.

Procunier, W.S.; Shelley, A.J.; Azurbe, M. 1987. Cytological identifications of *Simulium oyapockense* manabi form (Diptera: Simuliidae): a potential vector of onchocerciasis in Ecuador. *Tropical Medicine Parasitological,* 38:71.

Pruess, K.P.; Adams,B.J.; Parsons,T.J.; Zhu,X.; Powers,O. 2000. Utility of the Mitochondrial Cytocrome Oxidase II Gene for Resolving Relationship among Black Flies (Diptera: Simuliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 16: 286-295.

Pruess, K.P.; Zhu,X.; Powers,O. 1992. Mitochondrial Transfer RNA Genes in a Black Fly, *Simulium vitattum* (Diptera: Simuliidae), Indicate Long Divergence from Mosquito (Diptera: Culicidae) and Fly (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Medical Entomology.* 29: 644-651.

Puri, I.M. 1925. On the life history and structure of the early stages of Simuliidae (Diptera: Nematocera). *Parasitology.* 17: 295-334.

Py-Daniel, V.; Andreazzi, R.; Medeiros, J.F. 2000. Projeto Piloto Xitei/Xidea (Roraima). I-Indices Epidemiológicos da Transmissão de *Onchocerca volvulus* (Leuckart,1893) para os anos de 1995-1996. *Entomology y Vetores*, Rio de janeiro. 7: 339-444.

Py-Daniel, V.; Passos, M.C.V.; Medeiros, J.F.; Andreazze,R. 1999. Dinâmica da atividade hematofágica (preferêcias horárias-tópicas) e estado reprodutivo das fêmeas de *Thyrsopelma guianense* (Wise, 1911) (Diptera, Culiomorpha, Simuliidae), principal vetor da filária *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) no Brasil. *Entomologia e vectores*. 6: 339-360.

Rios-Velasquez, C.; Hamada, N.; Adler, P.H. 2002. Cytotaxonomy of *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello and *Simulium ulyssesi* in Central Amazonia, Brasil. *Insect Systematic Evolution*. 33: 113-120.

Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene Flow, Philogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology* .41: 325-352.

Rothfels, K.H. 1956. Black Flies: Siblings, sex, and species grouping. Journal of Heredity. 47. 113-122.

Rothfels, K.H. 1979a. Cytotaxonomy of blackflies (Simuliidae). *Annual Review of Entomology.* 24: 507-539.

Rothfels, K.H. 1979b. Chromosomal variability and speciation in blackflies. Symposia of the Royal Entomological Society of London. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford. 10: 207-224.

Rothfels, K.H. 1987. Cytological approaches to Black fly taxonomy. p.39-52. *In*: Kim, K. C.; Merritt, R.W. (eds.). *Black flies- Ecology, Population, management and Annotated wold list*. Pennsylvania Stade University, University Park and London, USA. 528 p.

Rothfels, K.H. 1988. Cytological approaches to Black fly taxonomy. *In*: Kim, K. C.; Merritt, R.W. (Eds.). *Black flies- Ecology, Population, management and Annotated wold list*. Pennsylvania Stade University, University Park and London, p. 39-52.

Rothfels, K.H. 1989. Speciation in black flies. *Genome*. 32: 500-509.

Rothfels, K.; Dunbar, R.W. 1953. The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* Zett. *Canadian Jounal Zoology*. 31: 226-241.

Rozas, J.; Rozas, R. 1999. DnaSP version 3.0: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics.* 15: 174-175.

Sallum, M.A.M.; Schultz, T.R.; Foster,P.G.; Aronstein,K.;Wirtz, R.A.; Wilkerson, R.C. 2002. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) basead on nuclear ribosomal and mitocondrial DNA sequences. *Systematic Entomology*. 27: 361-382.

Sbordoni, V. 1993. Molecular Systematics and the Multidimensional Concept of Species. *Biochemical Systematics an Ecology*. 21: 39-42.

Scarpassa, V.M.; Geurgas, S.; Azeredo-Espin, A.M.L.;Tadei, W.P.; 2000. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. *Genetics and Molecular Biology.* 23: 71-78.

Schneider, S.; Roessli, S; Excoffier, L. 2000. Arlequin: a software for population genetic data analysis, version 2.000. *Genetics and Biometry Laboratory*, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.

Sharley, D.J.; Pettigrove, V.; Parsons, Y.M. 2004. Molecular of *Chironomus spp* (Diptera) for biomonitoring of aquatic ecosystems. *Australian Journal of Entomology*. 43: 359-365.

Shelley, A.J. 1994. Factors affecting filarial transmission by simuliids. *Advances in Disease Vector Research.* 10:183-214.

Shelley, A.J. 2002. Human onchocerciasis in Brazil: an overview. *Cadernos de Saúde Pública*. 18: 1167-1177.

Shelley, A.J.; Hernández, L.M.; Maia-Herzog, M.; Luna Dias, A.P.A. 2002. Morphological variation in the larva of *Simulium guianense s.l.* Wise (Dipt., Simuliidae), a primary vector of human onchocerciasis in Brazil. *Entomologist's Monthly Magazine* 138: 95-102.

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 of London (Entomol).*66: 1-18.

Shelley, A. J., Luna Dias, A. P. A., Maia-Herzog, M., Procunier, W. S., and Moraes, M. A. P. 1987. Identification of vector species (Diptera: Simuliidae) of human onchocerciasis in the Amazonia focus of Brazil and Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 82: 461-465.

Shelley, A.J.; Maia-Herzog, M.; Lowry, C.A.; Luna–Dias, A.P.A.; Garritano, P.R.; Shelley, A.; Camargo, M.; Carter,H.G. 2000. The Simuliidae (Diptera) of the secundary onchocerciasis focus at Minaçu in central Brazil. *Bulletin of the British Museum (Natural History)-Entomology Series)*. 69: 171-221.

Shelley, A.J.; Maia-Herzog, M.; Luna Dias, A.P.A.; Camargo, M.; Costa, E.G.; Garritano,P.; Lowry, C. A. 2001. Biting behavior and potencial vector status of anthropophilic blackflies in a new focus of human onchocerciasis at Minaçu, central Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*. 15: 28-39.

Shelley, A.J.; Pinger, R.R.;Morais,M.A.J. 1982. The taxonomy, biology and medical importance of *Simulium amazonicum* Goeldii (Diptera: Simuliidae) with a rewiev of related species. *Entomology Series,* 44:1-29.

Silva, E.L.S. 1997. A vegetação de Roraima. In: Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima. Barbosa, R.I.; Ferreira, E.J.G.; Castellón,E.G. (Eds). INPA, Brasil, Amazonas. 401-415 p.

Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Hand, L.; Flook,P. 1994. Evolution, wighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America.* 87: 651-701.

Tang, J.; Moulton, J.K.; Pruess, K; K.; Cupp; Unnasch, T.R. 1998. Genetic variation in North American black flies in the subgenus *Psilopelmia* (*Simulium*: Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*. 76: 205-211.

Tang, J.; Toè, L.; Back, C.; Zimmerman, P.A.; Pruess, K.; Unnasch, T.R. 1995. The *Simulium damnosum* species complex: phylogenetic analysis and molecular identification based upon mitochondrially encoded gene sequences. *Insect Molecular Biology*. 4: 79-88.

Tang, J.; Toè, L.; Pruess, K.; Cupp, E.W.; Unnasch, T.R. 1996. Molecular phylogeny and typing of blackfllies (Diptera: Simuliidae) that serve as vectors of human or bovine onchocerciasis. *Medical and Veterinary Entomology*. 10: 228-234.

Tautz, D.; Hancock, J.M.; Webb,D.; Tautz,C.; Dover, G.A. 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster. Molecular Biology and Evolution.* 5: 366-376.

Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F. 2005. *Borror and Delong's introduction to the Study of insects.* Thomson/ Brooks-Cole. United States of America. 864 p.

Vajime, C.G.; Dunbar, R.W. 1975. Chromosomal identification of eight species of the subgenus *Edwardsellum* near and including *Simulium* (*Edwardsellum*) *damnosum* Theobald. *Tropenmedizin und Parasitologie*. 26: 111-138.

White, G.B.; Killick-Kendrick, R. 1975. Polytene chromosomes of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* and the cytogenetics of Psychodidae in relation to other Diptera. *Journal of the Entomology.* 50: 187-196.

WHO (World Health Organization). 1995. Onchocerciasis and its control. WHO Technical Report Series 852. *World Health Organization*, Geneva, 103 p.

Xiong, B.; Kocher,T. 1991. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome*. 34: 306-311.

Xiong, B.; Kocher,T. 1993. Phylogeny of sibling species of *Simulium venustum* and *S. verecundum* (Diptera: Simuliidae) based on sequences of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2: 293-303.

Zhimulev, I.F. 2001. Polytene Chromosomes. *Encyclopedia of Life Science*: 1-10.

Páginas eletrônicas acessadas:

www. fluxusengineering.com, acessado em 22 de dez de 2006

www. googleearth.com, acessado em 03 de jan de 2007

www. ncbi.nlm.nih.gov/BLASTA, acessado em 02 de dez de 2006

www.technelysium.com.au/chromas.html, acessado em 23 de nov de 2006

Apêndice - Figuras das características morfológicas de exemplares adultos de *Simulium guianense s.l.* forma típica e atípica

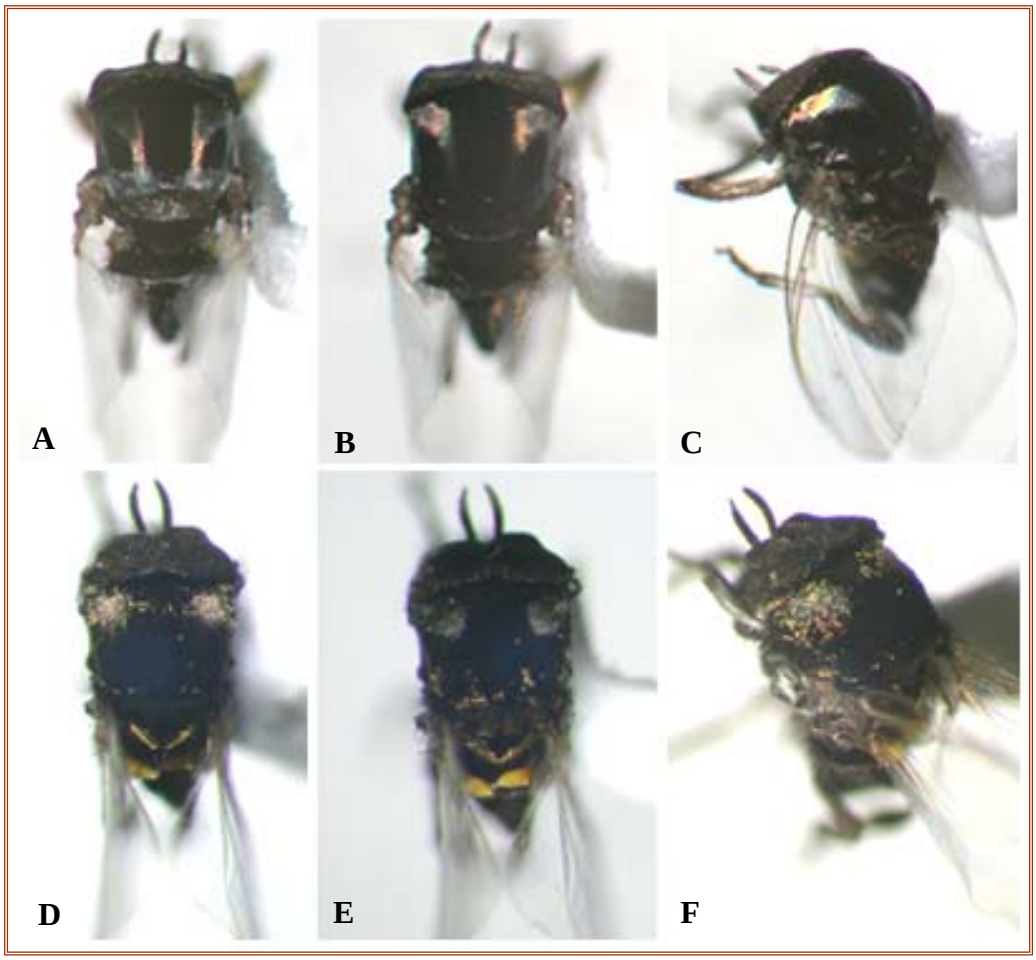

Figura 31. Machos adulto de *Simulium guianense s.l.*: A) Forma típica, foto com luz frontal; B) Forma típica, foto com luz dorsal; C) Forma típica, foto com luz fronto-lateral; D) Forma atípica, foto com luz frontal; E) Forma atípica, foto com luz dorsal; F) Forma atípica, foto com luz fronto-lateral.

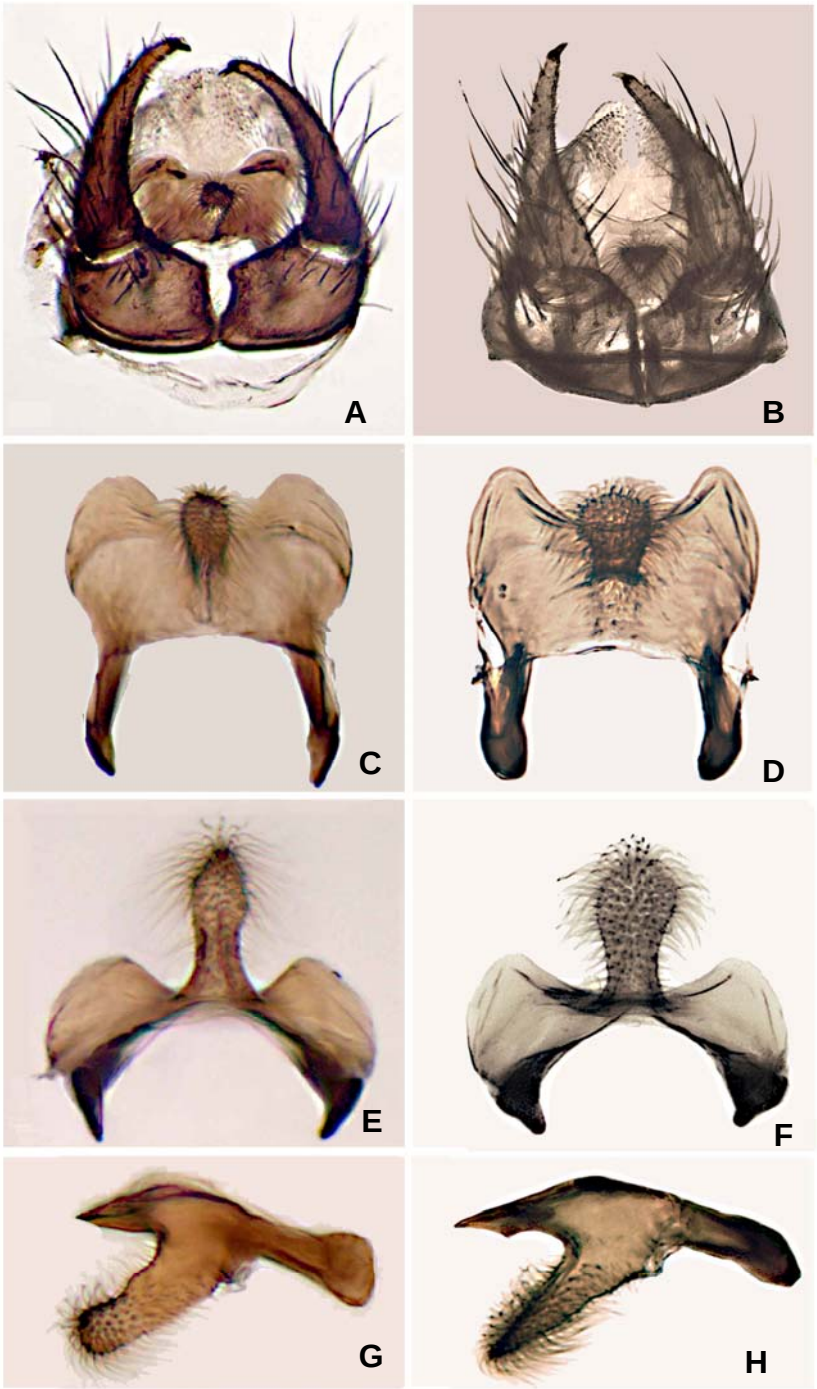

Figura 32. A-F: Genitália do macho *in situ*, vista ventral. A: espécie de Goiás, atípica. B: *Simulium guianense s.l.* típica; C-F: Placa ventral de *Simulium guianense s.l.* atípica e típica. C, E: espécie atípica. D, F: espécie típica; G-F: Placa ventral de *Simulium guianense s.l.* atípica e típica, em vista lateral. G: espécie atípica; H: espécie típica.