

# Variabilidade genética de espécies de culicidae e simuliidae usando marcador mitocondrial\*

## *Genetic variability of culicidae and simuliidae species using mitochondrial marker*

Luis Miguel Ramirez Rivera<sup>1</sup>  
 Érica Soares Martins<sup>2</sup>  
 Rose Gomes Monnerat<sup>3</sup>  
 Paulo Roberto Martins Queiroz<sup>4</sup>

### Resumo

As famílias *Culicidae* e *Simuliidae* são de grande relevância por apresentarem insetos transmissores de doenças, com grande variabilidade genética e adaptabilidade biológica. Podem-se destacar o *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue, *Culex quinquefasciatus* e *C. pipiens*, vetores da filiariose e do vírus do Oeste do Nilo, respectivamente, e *Simulium quinquestriatum*, *S. damnosum* e *S. amazonicum*, responsáveis pela síndrome hemorrágica de Altamira e pela transmissão da oncocercose e mansonelose. O objetivo deste estudo foi identificar três espécies de Diptera a partir de um marcador baseado em DNA mitocondrial. O estudo do DNA mitocondrial é uma das técnicas que permite detectar polimorfismos e, utilizando-se um conjunto único de oligonucleotídeos, será uma estratégia útil para a identificação dessas espécies para fins entomológicos e epidemiológicos.

**Palavras-chave:** *Aedes*. *Culex*. *Simulium*. DNA mitocondrial. Diagnóstico.

### Abstract

The *Culicidae* and *Simuliidae* families are of great relevance for presenting disease-carrying insects and a wide genetic variation and biological adaptability. Some important species are *Aedes aegypti*, the main vector of dengue, *Culex quinquefasciatus* and *C. pipiens*, vectors of filariasis and the West Nile Virus, respectively, and *Simulium quinquestriatum*, *S. damnosum* and *S. amazonicum* for the transmission of onchocerciasis and mansonelliasis, as well as the main source of the hemorrhagic syndrome of Altamira. The objective of this study was to identify three species from Diptera using a mitochondrial DNA molecular marker. The study of mitochondrial DNA is one of the techniques designed to detect DNA polymorphisms. The use of a single set of PCR primers to identify culicids and simuliids species will be of great importance to the identification of these species of entomological and epidemiological interest.

**Keywords:** *Aedes*. *Culex*. *Simulium*. Mitochondrial DNA. Diagnosis.

\* Artigo recebido em 09/2011  
 Aprovado em 02/2012

<sup>1</sup> Graduado do curso e Biomedicina, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, Brasília/DF

<sup>2</sup> EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia – Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas. E-mail: erica@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup> EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia – Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas. E-mail: rose@cenargen.embrapa.br

<sup>4</sup> Doutor em Biologia Animal pela Universidade de Brasília – Professor do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, Brasília/DF. E-mail: pqsilva@uol.com.br

## 1 Introdução

A Ordem Diptera é de grande importância em estudos entomológicos e epidemiológicos devido ao seu relevante interesse médico, uma vez que inclui análise especial de insetos hematófagos transmissores de doenças (NEVES, 2007). Em geral, apresentam grande variabilidade genética e adaptabilidade biológica, levando a uma grande dispersão no globo e à dificuldade de controle por meios químicos (EIRAS, 2007).

Dentre os gêneros da Família Culicidae destacam-se *Aedes* e *Culex* por possuírem espécies transmissoras de dengue e febre amarela silvestre (EIRAS, 2007). Os simulídeos (Família Simuliidae) são conhecidos no Brasil como borrachudos ou piuns. São importantes não somente pela sua insistente voracidade em humanos e animais, mas também por transmitirem algumas doenças, como a Síndrome Hemorrágica de Altamira (SHA) (MACKAY, 1974; PINHEIRO et al., 1974), oncocercose (REIDPATH et al., 2011) e mansonelose (ADLER et al., 2010; MARTINS et al., 2010). Dentre os simulídeos, as espécies *Simulium quinquestriatum*, *S. damnosum* e *S. amazonicum* destacam-se pela transmissão das doenças anteriormente descritas.

As espécies do gênero *Culex* são responsáveis pela disseminação de várias doenças, como a filariose (elefantíase) e a Febre do Nilo. O *Culex quinquefasciatus* é altamente antropofílico e é o típico mosquito caseiro com hábitos hematofágicos noturnos. Ele é o principal responsável pela transmissão da filariose bancroftiana (EIRAS, 2007). A filariose é causada por helmintos Nematoda das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *B. timori*, sendo que, no continente americano, é causada apenas pela *W. bancrofti* (FONTES; ROCHA, 2007b). Por outro lado, *C. pipiens* é transmissor do vírus do Oeste do Nilo (WNV), um arbovírus do gênero *Flavivirus*, Família *Flaviviridae* (HAYES, 2005; GONÇALVES et al., 2008).

O *Aedes aegypti*, principal vetor do dengue, foi considerado sob controle em 1955. Relatos da ocorrência de dengue ficaram restritos em algumas regiões do norte de América do Sul. Nos anos de 1967, 1976, 1977, 1979 e 1981, ocorreu a reintrodução do mosquito no Brasil em várias regiões do país. As escassas medidas de controle levaram, em 1985 e 1997, à disseminação do mosquito *Ae. aegypti* em todos os estados principalmente pelos meios de transporte de longa distância (ônibus, caminhões,

trens e aviões, por exemplo) e pelos ovos depositados em pneus usados, os quais geralmente são estocados de maneira errada, permitindo o acúmulo de água e posterior eclosão dos ovos. Os ovos conseguem permanecer mais de um ano viáveis, necessitando apenas de um contato com a água para eclodirem nos primeiros 15 minutos. Essa capacidade e resistência à dessecação permite um aumento significativo da população de *Ae. aegypti* durante o período de chuvas, aumentando juntamente a ocorrência de casos de dengue e febre amarela (EIRAS, 2007). A transmissão do vírus da dengue por *Ae. aegypti* foi descrita pela primeira vez em 1906 por Bancroft (RO-MANOS, 2008).

Em virtude dos impactos causados à saúde pública por esses insetos, é necessário o conhecimento dos padrões de dispersão e da diversidade genética desses organismos para a elaboração de programas de controle, uma vez que, a habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética (YAN et al., 1998; HIRAGI et al., 2009). Para compreender a evolução histórica das populações de mosquitos e da epidemiologia da doença, é necessário analisar a variação genética dentro e entre as populações (YAN et al., 1998). O estudo da população é essencial para a identificação de possíveis fatores responsáveis pela resistência e adaptação ecológica (HIRAGI et al., 2009). Existem várias técnicas que detectam polimorfismos de DNA, como o DNA mitocondrial (DNAMt), polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD), isoenzimas, Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), genes de RNA ribossomal (RNAr), sequenciamento e microssatélites (MITCHELL-OLDS, 1995).

Métodos complementares de identificação usam a análise taxonômica baseada na molécula de DNA permitindo explorar a diversidade genômica para a identificação do organismo (KURTZMAN, 1994; WILSON, 1995). O uso do genoma mitocondrial é tido como o melhor alvo para a análise molecular pela ausência de íntrons, sua limitação à exposição de recombinação, pela sua herança haplóide e pelo fato de possuir, basicamente, apenas genes associados às suas funções (SACCONI et al., 1999; TORRES et al., 2010).

Antigamente, alguns estudos tinham se focado em genes mitocondriais para ribossomos, entretanto, há uma grande prevalência de inserções e deleções, o que dificulta o alinhamento dessas sequências (DOYLE; GAUT,

2000). Hebert et al. (2003) sugeriram o uso das subunidades I e II da citocromo oxidase c (COI e COII) ao contrário de outros genes, como o do citocromo b, uma vez que permite a possibilidade de prover resultados mais aprofundados na filogenia (SIMMONS; WELLER, 2001). Todavia, o uso da COI foi sugerido por possuir um banco de dados extenso e ser facilmente amplificável com o uso de oligonucleotídios universais (TORRES et al., 2010). Esses oligonucleotídios universais foram sugeridos por Hebert et al. (2003), os quais foram definidos por Folmer et al. (1994). Os marcadores baseados em DNA têm como vantagem a possibilidade de identificação das espécies de Diptera diretamente de coletas de campo ou em precário estado de conservação. Essa metodologia fornece um procedimento complementar às análises morfológicas, contribuindo com procedimentos acessórios ao entomólogo quando há dúvidas a respeito de alguns critérios taxonômicos. Portanto, esses marcadores moleculares, aliados aos estudos de biologia do desenvolvimento, fornecem informações fundamentais para a definição das estratégias de controle de insetos vetores (HIRAGI et al., 2009), uma vez que permitem a identificação da espécie a ser estudada e controlada (HEBERT et al., 2003).

A partir dessas informações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de espécies de *Culicidae* e *Simuliidae* por meio de marcador molecular baseado em DNA mitocondrial.

## 2 Metodologia

### 2.1 Larvas de culicídeos e simulídeos.

Larvas de *Ae. aegypti*, *C. quinquefasciatus* e *S. pertinax* mantidas na criação de insetos entomopatogênicos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Recursos Genéticos e Biotecnologia -, foram cedidas para uso nos experimentos de identificação molecular neste estudo. Aproximadamente 20 exemplares de cada espécie foram coletados e mantidos em etanol 70% a -20 °C até o momento do seu uso.

### 2.2 Extração de DNA.

Foram utilizados 5 indivíduos de cada espécie, cujos ácidos nucléicos foram extraídos isoladamente segundo a metodologia descrita por Ayres et al. (2002).

As larvas de cada espécie foram maceradas e homogeneizadas em 500 µL de tampão de lise (0,4 M NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 µg.mL<sup>-1</sup> proteínase K e 1,5% SDS) seguindo-se de incubação a 60°C por 16h.

Após a incubação, adicionou-se 420 µL de NaCl 5 M. A mistura foi homogeneizada por inversão dos tubos por 30 segundos e submetida à centrifugação durante 20 minutos a 14.000xg.

Em seguida, adicionou-se um volume de isopropanol a -10 °C. O tubo foi invertido várias vezes e mantido a -20°C por 24h para precipitação do DNA. Ao final do período de precipitação, submeteu-se o tubo à centrifugação a 14.000xg durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500 mL de etanol 70% a 4°C, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 300 µL de tampão TE 0,1X (Tris-HCl 1 mM e EDTA 0,1 mM).

### 2.3 Reprodução do experimento.

Para a validação do experimento, foram analisados 15 indivíduos de cada amostra em três repetições sendo que, a cada repetição, foram retirados 5 indivíduos coletados aleatoriamente das amostras de *Aedes*, *Culex* e *Simulium*.

### 2.4 Amplificação do gene citocromo oxidase I (COI).

Para a reação de polimerase em cadeia (PCR), foram utilizados os oligonucleotídios LCO1490 e HCO2198 descritos como padrão para estudos de Diptera por Hebert et al. (2003).

A reação para amplificação foi feita a partir de uma mistura com volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA extraído (20 ng), 1 µL de cada oligonucleotídio (10 µM), 2,5 µL de tampão 10X (GE Healthcare), 0,8 µL de desoxirribonucleotídeos trifosfatos na concentração de 1 mM, 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U.µL<sup>-1</sup>) e água milliQ em quantidade suficiente para 25 µL de reação.

Para a amplificação, as reações foram incubadas em termociclador configurado com 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C seguido de 36 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 45 °C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). Uma extensão final foi aplicada durante 5 minutos a 72°C.

## 2.5 Visualização dos fragmentos de DNA por eletroforese.

Os produtos de amplificação de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 2 h a 80 V. Ao final, os géis foram corados por imersão em brometo de etídio 10 µg.mL<sup>-1</sup> por 20 minutos e descorados em água destilada por 20 minutos. Em seguida, a documentação fotográfica foi feita usando o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene).

Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp - Invitrogen) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

## 2.6 Pesquisa no GenBank e análise de alinhamento.

Foram coletadas do GenBank todas as sequências referentes ao gene COI para as espécies de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *S. quinquestriatum*, *S. damnosum*, *S. amazonicum* e *S. pertinax*.

Utilizaram-se como critério de exclusão as sequências semelhantes de uma mesma espécie que fo-

ram encontradas no banco de dados. Das sequências remanescentes de cada espécie, foram selecionadas, por amostragem aleatória, 5 sequências para análises, usando os vários algoritmos contidos nos programas BioEdit, Mega3 e GenBank.

## 3 Resultados

Foram obtidas 271 sequências do GenBank, segundo as exigências anteriormente citadas. Após a análise, 179 sequências semelhantes foram excluídas (Tabela 1). Dentre os simulídios pesquisados, foram encontradas apenas sequências relativas à *S. quinquestriatum*.

Para as espécies pesquisadas do gênero *Aedes*, foram encontradas 134 sequências das quais 90 eram relativas à *Ae. aegypti* e 44, à *Ae. albopictus*. Para *Culex* foram retornadas 66 sequências, sendo 15 para *C. pipiens* e 51 para *C. quinquefasciatus*. Em seguida, *S. quinquestriatum*, com 71 sequências retornadas.

O tamanho médio das sequências de *Aedes* e de *Culex* variou em torno de 700 pb, enquanto as dos simu-

**Tabela 1** – Informações relacionadas ao tamanho (pb), composição de nucleotídeos (%) e número de acesso ao GenBank que foram selecionadas para os estudos de alinhamento de sequências.

Gênero	Espécie	Acesso (GenBank)	Origem	Composição (%)				Tamanho (pb)
				A	T	C	G	
<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	DQ397892.1	A20	31,26	40,25	14,76	13,73	867
		DQ424949.1	Ennore	29,12	38,41	16,92	15,55	656
		AY056597	Formosus	29,67	39,30	16,53	14,51	1537
		AY056596.1	Liverpool	29,34	39,23	16,59	14,83	1537
		GQ143718.1	Cytocrome	31,19	39,84	15,33	13,63	763
	<i>albopictus</i>	AY100667.1	Mawei	30,60	39,76	15,42	14,22	415
		AY100670.1	Beijing	30,36	40,00	15,18	14,46	415
		AY100669.1	Dafang	30,36	40,00	15,18	14,46	415
		AY100671.1	Kaili	30,36	40,00	15,18	14,46	415
		AY834241.1	Karnataka	26,55	40,04	17,77	15,63	467
<i>Culex</i>	<i>pipiens</i>	GU908081.1	mosqPP5	28,64	38,50	14,71	15,65	639
		GU908082.1	mosqPP6	29,11	39,12	14,87	16,28	639
		GU908083.1	mosqPP7	29,11	38,97	14,87	16,28	639
		GU908084.1	mosqPP9	29,26	38,81	14,87	15,96	639
	GU908077.1	mosqPP10	29,11	38,97	14,87	16,28	639	
	<i>quinquefasciatus</i>	DQ267689.1	Tamil Nadu	29,25	39,46	15,14	16,16	588
		FJ536168.1	A42	29,98	40,85	13,08	16,10	497
FN395205		Hydarabad23	30,67	39,62	14,79	14,92	1542	
<i>Simulium quinquestriatum</i>	GQ165791.1	V215	29,25	38,84	15,09	16,82	636	
	DQ534948.1	SQ164A	29,32	36,91	17,35	16,42	1620	
		AY251520.1	S048	28,61	36,65	18,16	16,58	1206

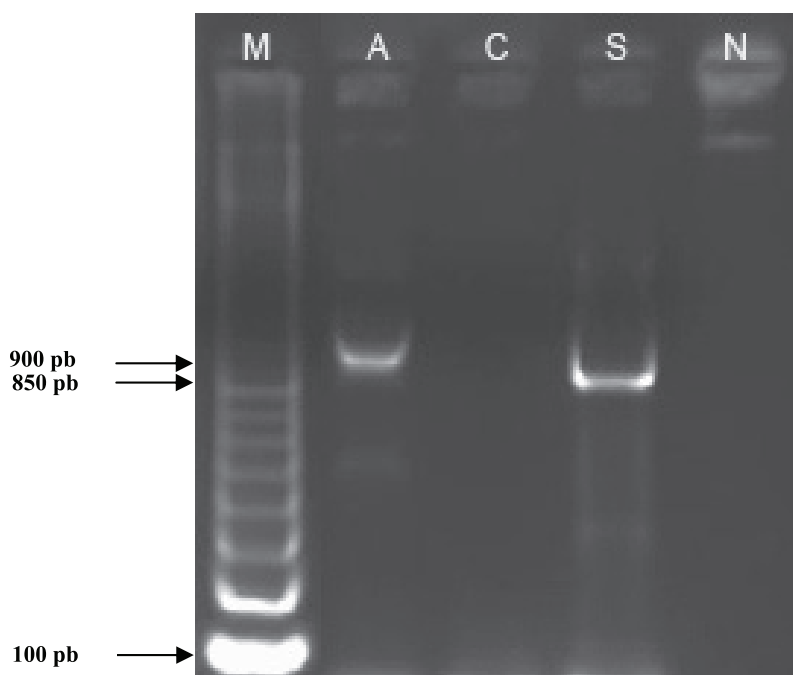
Tabela 2 – Análise estatística das seqüências selecionadas.

Gênero	N	Tamanho (pb)		Composição média (%)			
		Média	Desvio padrão	A	T	C	G
<i>Aedes</i>	10	748,70	446,02	29,88	39,68	15,89	14,55
<i>Culex</i>	9	717,56	312,78	29,38	39,24	14,70	12,50
<i>Simulium</i>	2	1413,00	292,74	28,97	36,78	17,76	16,50

Figura 1 - Alinhamento parcial e consenso das seqüências pesquisadas no GenBank para *Aedes*, *Culex* e *Simullium*.



Figura 2 – Fragmento de DNA obtido utilizando-se os oligonucleotídios desenhados para a amplificação do gene COI de Simullium. Os códigos são: M, Marcador de massa molecular 100 pb Ladder (GE Healthcare); A, *Ae. aegypti*; C, *C. quinquefasciatus*; S, *S. pertinax*; N, Controle negativo substituindo-se o DNA por água milliQ.



lídios foram maiores do que 1000 pb. O perfil de bases, por sua vez, foi compartilhado entre todas as sequências, ou seja, a base mais presente foi a base pirimídica timina, seguida da base púrica adenina (Tabela 2).

Após a escolha das sequências, foi feito o alinhamento das mesmas, utilizando-se o programa Bioedit. Parte do alinhamento das sequências encontra-se na Figura 1.

Na amplificação por PCR, utilizando-se os oligonucleotídios desenhados para o gene COI de *Simulliu*, foi possível observar diferenças na amplificação entre as espécies de *Aedes*, *Culex* e *Simullim* (Figura 2). Fazendo-se essa adaptação metodológica, foi possível observar a diferença entre os produtos de amplificação que foram gerados na PCR, ou seja, pelos dois fragmentos de DNA de tamanhos diferentes nas amostras de *Ae. aegypti* e *S. pertinax*.

Para *Ae. aegypti* observou-se um fragmento de aproximadamente 900 pb e para *S. pertinax* de 850 pb. Empregando-se essa estratégia, observou-se também a ausência de amplificação para a amostra de *C. quinquefasciatus*.

#### 4 Discussão

Apesar do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) possuir um amplo banco de dados de referência de taxonomia e de sequenciamento, entre outros, não foi possível encontrar nenhuma sequência relacionada ao gene COI em 3 dos 4 simulídios pesquisados. Para *S. quinquefasciatus*, único simulídio com sequências de COI encontradas, houve uma grande quantidade de sequências semelhantes excluídas, permanecendo apenas duas.

A composição das sequências ricas em adenina e timina está de acordo com outros estudos de sequenciamento feito em simulídios (XIONG; KOCHER, 1991; DUARTE et al., 2008). Todavia, pela análise da composição de bases, observa-se que está de acordo com sequências de DNA mitocondrial, uma vez que elas são normalmente ricas em bases adenina e timina, normal em artrópodes (CREASE, 1999; LESSINGER; AZEREDO-ESPIN, 2000).

Os oligonucleotídios utilizados para a amplificação foram desenhados por Folmer et al. (1994) na

tentativa de definir oligonucleotídios universais para a amplificação de um segmento de 710 pb do gene da subunidade 1 da enzima mitocondrial citocromo oxidase c. Estes oligonucleotídios desenhados para o reino Metazoa foram testados em 11 diferentes filos, inclusive o Arthropoda. Entretanto, apenas nas classes Malacostraca e Pycnogonida (FOLMER et al., 1994) não houve resultados de amplificação por PCR. Hebert et al. (2003) utilizaram os mesmos oligonucleotídios em outros filos, além do Arthropoda, e obtiveram amplificação em espécies de *Anopheles gambiae*, que é pertencente à Ordem Diptera. Todavia, Rivera et al. (2009) utilizaram os mesmos oligonucleotídios para a identificação de várias espécies de simulídios.

Nesse estudo, procedeu-se à amplificação de parte do gene COI de *S. pertinax*, obtendo-se um fragmento de aproximadamente 850 pb. Em comparação aos estudos anteriores, esse fragmento encontra-se acima do esperado (700 pb). Entretanto, segundo os dados levantados no GenBank, o tamanho do fragmento encontra-se abaixo da média das sequências analisadas ( $1413,00 \pm 292,74$  pb). Nas espécies de *Ae. aegypti*, realizou-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 900 pb. Da mesma forma que o tamanho do segmento amplificado a partir de *S. pertinax* se encontra superior ao esperado, o segmento amplificado de *Ae. aegypti* encontra-se maior também. Por outro lado, ao contrário da amplificação em *S. pertinax*, o fragmento de *Ae. aegypti* se manteve superior à média (748 pb). Finalmente, não ocorreu nenhuma amplificação para *C. quinquefasciatus*.

Em análise conjunta com o alinhamento das sequências analisadas e com a bibliografia consultada, pode-se inferir que a amplificação de tamanhos diferentes deve-se ao tamanho diferente entre as sequências do gene COI nas espécies de *Aedes* e *Simullium*. Scarpassa et al. (2008) obtiveram na análise de sequências de COI de *Ae. aegypti* um alto índice de variabilidade. O aumento do tamanho do segmento de amplificação pode ser devido a essa variabilidade, uma vez que o gene COI de *Ae. aegypti* sofre uma variação genética relativamente maior que a do gene da subunidade ND5 (nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 5) e do citocromo b (BE-EBE et al., 2005; MOUSSON et al., 2005). Por outro lado, a ausência de amplificação em *C. quinquefasciatus* sugere a ausência de sítios de anelamento para os oligonucleotídios utilizados ou a variação em termos de composição

de nucleotídeos no sítio de anelamento, necessitando de uma temperatura que seja diferente em relação às amostras dos demais gêneros.

A obtenção de perfis eletroforéticos diferentes para as três espécies possibilita a diferenciação e identificação delas, quando a análise morfológica é insuficiente. É importante ressaltar, entretanto, que essa não pode ser descartada; o diagnóstico por PCR é apenas uma ferramenta auxiliar. A identificação é importante para a obtenção de um combate eficiente ao vetor por meio da escolha do meio de controle direcionado à espécie identificada.

O uso de um único protocolo de extração de DNA simplifica o processo de identificação. Apesar de ter sido testado por Hiragi et al. (2009) em diferentes estágios de desenvolvimento do *Ae. aegypti*, com resultados positivos, aqui se demonstra que a técnica pode ser utilizada nas várias fases do ciclo de vida de outros dípteros, como os de *Culex* e *Simulium*. Da mesma forma, quanto ao protocolo de extração de DNA, a utilização de um único par de oligonucleotídeos e programa de amplificação por PCR simplificam o processo e diminuem os custos e o tempo necessários para a elaboração de um perfil molecular que possa ajudar na identificação da espécie.

Na tentativa da identificação de espécies por meios moleculares, assim como de se entender melhor a taxonomia e a variabilidade genética, Folmer et al. (1994) tentaram padronizar e universalizar oligonucleotídeos para a PCR do agente COI.

Apesar de vários estudos terem demonstrado a eficácia desses oligonucleotídeos para vários filos do reino Metazoa, não houve, no presente estudo, amplificação para o espécime de *C. quinquefasciatus*, o que demonstra que existem limitações nessa técnica de identificação com essa subunidade do gene COI (HOGG; HEBERT, 2004; BALL et al., 2005; BARRETT; HEBERT, 2005; JANZEN et al., 2005; MONAGHAN et al., 2005; SCHINDEL; MILLER, 2005; WARD et al., 2005; CYWINSKA et al., 2006; HAJIBABAEI et al., 2006; PEGG et al., 2006; HINOMOTO et al., 2007; KELLY et al., 2007; KERR et al., 2007).

Dessa forma, as técnicas moleculares baseadas em DNA são de extrema importância para a identificação das espécies, fornecendo estratégias poderosas para a rápida detecção de espécies.

## 5 Considerações finais

O diagnóstico molecular visando à identificação de espécies tem recebido várias modificações e aperfeiçoamentos com o tempo. Apesar de esta ferramenta possuir uma grande especificidade e sensibilidade, resultante do desenho de oligonucleotídeos específicos para a sequência do gene citocromo oxidase, como no caso deste estudo, ela ainda não descarta os estudos morfológicos.

Observa-se ainda que, mesmo com a variabilidade genética presente nas sequências de DNA relacionadas ao gene COI, foi possível estabelecer um procedimento para a rápida detecção das três espécies de Diptera.

Observou-se ainda que a variabilidade genética resultou em diferenças na amplificação do gene como, por exemplo, a ausência de amplificação nos indivíduos de *C. quinquefasciatus*. Além disso, houve diferenças nos tamanhos dos produtos de amplificação para *Ae. aegypti* e *S. pertinax*.

Dessa forma, esses resultados ajudam na diferenciação de espécies pela comparação dos tamanhos dos amplicons e sem a necessidade de sequenciamentos. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam que são necessários mais estudos que visem o entendimento da variabilidade genética para o DNA mitocondrial intra e interpopulacional, assim como o seu relacionamento entre Famílias taxonômicas.

Entretanto, independentemente das questões genéticas envolvidas, foi possível desenvolver um método de diagnóstico molecular para a rápida identificação das três espécies de Diptera analisadas neste estudo.

## Referências

- ADLER, P. H.; CHEKE, R. A.; POST, R. J. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). **Infection, Genetics and Evolution**, Irvine, USA, v. 10, n. 7, p. 846-65, October, 2010. doi: 10.1016/j.meegid.2010.07.003
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 871-875, set. 2002. doi: 10.1590/S0074-02762002000600022

BALL, S. L. et al. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society**, Pennsylvania, v. 24, n. 3, p. 508-524, set. 2005. doi: 10.1899/04-142.1

BARRETT, R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, Toronto, v. 83, n. 3, p. 481-491, mar. 2005. doi: 10.1139/z05-024

BEEBE, N. W. et al. Genetic diversity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Australia and implications for future surveillance and mainland incursion monitoring. **Communicable Diseases Intelligence**, Canberra, v. 29, n. 3, p. 299-304, set. 2005.

CREASE, T. J. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). **Gene**, Worcester, USA, v. 233, n. 1-2, p. 89-99, jun. 1999. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00151-1.

CYWINSKA, A.; HUNTER, F. F.; HEBERT, P. D. N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. **Medical and Veterinary Entomology**, Liverpool, v. 20, n. 4, p. 413-424, dez. 2006. doi: 10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x

DOYLE, J. J.; GAUT, B. S. Evolution of genes and taxa: a primer. **Plant Molecular Biology**, Switzerland, v. 42, n. 1, p. 1-6, jan. 2000. doi: 10.1023/A:1006349518932

DUARTE, G. T.; DE AZEREDO-ESPIN, A. M.; JUNQUEIRA, A. C. The mitochondrial control region of blowflies (Diptera: Calliphoridae): a hot spot for mitochondrial genome rearrangements. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, USA, v. 45, n. 4, p. 667-676, jul. 2008.

EIRAS, A. E. Culicidae. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, New York, v. 3, n. 5, p. 294-299, oct. 1994.

FONTES, G.; ROCHA, E. M. M. *Onchocerca volvulus* e Outros Filarídeos Humanos. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2007a. p.355-368.

GONÇALVES, J. L. S. et al. Viroses do Sistema Nervoso Central. In: OLIVEIRA, Norma Suely de (Ed.). **Introdução à virologia humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 12, p.357-398.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 4, p. 968-71, dec. 2006. doi: 10.1073/pnas.0510466103

HAYES, E. B. et al. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 8, p. 1167-1173, aug. 2005.

HEBERT, P. D. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences**, London, v. 270, n. 15, p. 313-321, feb. 2003. doi:10.1098/rspb.2002.2218

HINOMOTO, N. et al. Identification of spider mites (Acari: Tetranychidae) by DNA sequences: a case study in Northern Vietnam. **International Journal of Acarology**, Alberta, v. 33, n. 60, p. 53-60, jan./mar. 2007. doi: 10.1080/01647950708684501

HIRAGI, C. et al. Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 542-547, jul./ago. 2009. doi: 10.1590/S1519-566X2009000400018

HOGG, I. D.; HEBERT, P. D. N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 82, n. 5, p. 749-754, mai. 2004. doi: 10.1139/z04-041

JANZEN, D. H. et al. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 360, n. 1462, p. 1835-45, set. 2005. doi: 10.1098/rstb.2005.1715

KELLY, R. P. et al. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 7, n. 2, p. 177-183, mar. 2007. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01641.x

KERR, K. C. et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 7, n. 4, p. 535-543, jul. 2007. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01670.x

KURTZMAN, C. P. Molecular taxonomy of the yeasts. **Yeast**, Oxford, v. 10, n. 13, p. 1727-1740, dec. 1994. doi: 10.1002/yea.320101306



- LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. Evolution and structural organisation of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. **Medical and Veterinary Entomology**, Liverpool, v. 14, n. 1, p. 71-80, mar. 2000. doi: 10.1046/j.1365-2915.2000.00209.x
- MACKAY, D. M. Haemorrhagic syndrome of Altamira. **Lancet**, London, v. 303, n. 7862, p. 876-877, abr. 1974. doi: 10.1016/S0140-6736(74)90537-6
- MARTINS, M. et al. *Mansonella ozzardi* in Amazonas, Brazil: prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimoes River. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 246-253, mai. 2010. doi: 10.1590/S0074-02762010000300002
- MITCHELL-OLDS, T. The molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 10, n. 8, p. 324-328, aug. 1995. doi:10.1016/S0169-5347(00)89119-3
- MONAGHAN, M. T. et al DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 360, p. 1925-1933, oct. 2005. doi:10.1098/rstb.2005.1724
- MOUSSON, L. et al. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. **Genetics Research**, North Carolina – USA, v. 86, n. 1, p. 1-11, aug. 2005. doi: 10.1017/S0016672305007627
- NEVES, D. P. Filo Arthropoda. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.319-322.
- PEGG, G. G. et al. mtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 70, S2, p. 7-12, out. 2006.
- PINHEIRO, F. P. et al. Haemorrhagic syndrome of Altamira. **Lancet**, London, v. 303, n. 7859, p. 639-642, abr. 1974. doi: 10.1016/S0140-6736(74)93196-1
- REIDPATH, D. D.; ALLOTEY, P.; POKHREL, S. Social sciences research in neglected tropical diseases 2: A bibliographic analysis. **Health Research Policy and Systems**, London, v. 9, n. 1, p. 1, jan. 2011. doi:10.1186/1478-4505-9-1
- RIVERA, J.; CURRIE, D. C. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, v. 9, p. 224-236, mai. 2009. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02648.x
- ROMANOS, M. T. V. Febre Amarela e Dengue. In: OLIVEIRA, N. S. (Ed.). **Introdução à Virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 399-409.
- SACCONI, C. et al. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, Worcester, v. 238, n. 1, p. 195-210, set. 1999. Doi:10.1016/S0378-1119(99)00270-X
- SCARPASSA, V. M.; CARDOZA, T. B.; CARDOSO Jr. R. P. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield – USA, v. 78, n. 6, p. 895-903, jun. 2008.
- SCHINDEL, D. E.; MILLER, S. E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. **Nature**, London, v. 435, n. 7038, p. 17, mai. 2005. doi:10.1038/435017b
- SIMMONS, R. B.; WELLER, S. J. Utility and evolution of cytochrome b in insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 20, p. 196-210, aug. 2001. doi: 10.1006/mpev.2001.0958
- TORRES, I. C.; KOSMANN, C.; ARANTES, L. C. O futuro da entomologia forense: aliança entre taxonomia e biologia molecular. **V Mostra de Produção Científica da Pós-graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, 2010.
- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, oct. 2005. doi:10.1098/rstb.2005.1716
- WILSON, K. H. Molecular biology as a tool for taxonomy. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 20, Suppl. 2, p. S117-S121, jun. 1995. doi:10.1093/clinids/20.Supplement\_2.S117
- XIONG, B.; KOCHER, T. D. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). **Genome**, Ontario, v. 34, n. 2, p. 306-311, apr. 1991. doi: 10.1139/g91-050
- YAN, G.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Genetics**, Pittsburgh, v. 148, n. 2, p. 793-800, feb. 1998.

**Para publicar na revista Universitas:  
Ciências da Saúde, acesse o endereço eletrônico  
[www.publicacoesacademicas.uniceub.br](http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br).**

**Observe as normas de publicação, para facilitar e agilizar o trabalho de edição.**