

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES NATURAIS DE MOSQUITOS CULICÍDEOS (DÍPTERA: CULICIDAE) EM AMBIENTE PERIDOMICILIAR.

Eliane Batista¹, Douglas Mascara²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; email: elianebatistasp@gmail.com¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes/NCA, email: dmascara@umc.br²

Área do Conhecimento: Zoologia Aplicada

Palavras-chaves: Culicídeos; Vetores; Populações genéticas

INTRODUÇÃO

Os mosquitos culicídeos (Diptera: Culicidae) são alvos de estudos de grande interesse em Saúde Pública, pois além de causarem desconforto para os seres humanos, devido sua atividade hematofágica, são vetores de agentes causadores de doenças com caráter epidêmico, como a dengue, malária, febre amarela, filarioses e encefalites (CARDOSO, *et al.*, 2005). Alguns culicídeos têm comportamento silvestre, contudo eles podem adaptar-se ao ambiente urbano (TAUIL, 2001). As ocupações desordenadas e sem saneamento das periferias urbanas, e as consideráveis alterações no ambiente natural favorecem mudanças no padrão de distribuição, biologia e comportamento desses mosquitos (SILVA, *et al.*, 2006), contribuindo para o processo de domicialização desses insetos em suas relações com a população humana (TAIPE-LAGOS & NATAL, 2003). Estudar a fauna de culicídeos é de grande relevância pelo papel que desempenham na transmissão de doenças ao homem e a outros vertebrados. Através do registro da distribuição, riqueza e abundância das espécies é possível discutir a importância epidemiológica das espécies mais comuns, além de identificar grupos domicializados ou exóticos em nossa comunidade.

O município de Mogi das Cruzes com população de cerca de 370 mil habitantes, expande sua área urbana, frequentemente com ocupações clandestinas em áreas de mata, o que resulta no aumento da frequência de mosquitos silvestres em contato com domicílios humanos.

Casos descritos de leishmaniose visceral e tegumentar, hantavirose e encefalite eqüina têm sido relatados no município (Serviço de Vigilância Epidemiológica do Município de Mogi das Cruzes – Comunicação pessoal). Além disso, ressaltamos a presença de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* no município. Assim sendo, o levantamento da fauna possibilita um diagnóstico preventivo da atual situação em que se encontra o nosso município, no que se refere à exposição da população a esses vetores e ao perigo eminente de epidemias.

OBJETIVOS

No presente estudo, objetivamos efetuar o levantamento da fauna de culicídeos hematófagos em localidades de recente ocupação humana no município de Mogi das Cruzes. Além disso, propomos a apresentação de um padrão molecular para a identificação das espécies.

METODOLOGIA

Áreas de Estudo: 1) Bairro Volta Fria, Distrito de Jundiapéba, no município de Mogi das Cruzes, localizado à margem do rio Tietê – área de recente urbanização onde predominam ocupações clandestinas, além de uma vegetação que sofreu intensas modificações. 2) Parque Municipal Leon Feffer - localizado no distrito de Braz Cubas, em Mogi das Cruzes, SP. É uma área de recomposição florestal com vegetação nativa. Situa-se junto à margem esquerda do Rio Tietê, próximo à área urbana e ao setor industrial do município.

Coletas: Foram efetuadas doze coletas nessas localidades no período de um ano. As coletas contaram com a cooperação do Serviço de Controle de Zoonoses do Departamento de Vigilância Sanitária, ligado à Secretaria de Saúde de Mogi das Cruzes, cujo termo de colaboração foi assinado entre a UMC e a S. de Saúde. As armadilhas utilizadas foram do tipo CDC (“Center for Disease Control”), suplementada com atrativo de gelo seco, colocada no local no período pré-crepuscular e retirada no dia seguinte (TISSOT & NAVARO-SILVA, 2004) e o aspirador entomológico a bateria 12V (KAKITANI, *et. al.*, 2003), utilizado na captura dos mosquitos no intra e peridomicílio, no ambiente aberto e interior de mata, sugando todos espécimes que se aproximaram em um período pré-estabelecido entre 15 a 30 minutos.

Identificação: Os insetos coletados vivos no campo foram mortos no freezer -20°C e armazenados em tubos de centrífuga de 15mL. Os espécimes foram identificados morfológicamente em nosso laboratório utilizando o estereomicroscópio e a chave de identificação apresentada por BELKIN *et al.* (1970) *in* CONSOLI & LOURENCO-DE-OLIVEIRA (1994) e aqueles cuja identificação não foi possível foram enviados ao Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública/USP. Após a identificação, os animais foram armazenados no freezer -20°C até a análise molecular.

Análise Molecular: A extração do DNA foi efetuada conforme o protocolo de extração de fenol e clorofórmio adaptado de Taggart, 1992. O DNA é ressuspendido em 30µL de água para PCR e armazenado à -20°C. As amostras foram amplificadas através de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para o endossimbionte *Wolbachia*, através do peptídeo wsp de 590 a 632 pb, o wsp 81F (5'TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC) e wsp 691R (5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA) o qual constitui um antígeno marcador do microorganismo (ZHOU *et al.*, 1998). O primer 16s rDNA que constitui o gene específico para *Wolbachia* também foi utilizado como controle o WOLB1 (5'-TTG TAG CCT GCT ATG GTA TAA CT-3') e WOLB2 (5'-GAA TAG GTA TGA TTT TCA TGT 3'). O controle para todas as análises foram realizadas a partir da utilização do *primer 28S rDNA*. (F 5' -CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC- 3'; R 5'-AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC- 3'), cuja seqüência é marcadora para organismos artrópodes. O programa do termociclador configurado foi desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma elongação final a 72°C por 7 minutos. A amplificação foi executada em reações de 50µL de volume final, contendo 5µL de DNA molde, tampão PCR com 50mM de MgCl₂, 10mM dNTP, 20µM de cada iniciador e 5µL de TAQ DNA polimerase (Promega).

Foi utilizado o complexo ribossomal ITS1 para a identificação de espécies através do tamanho dos segmentos. Para isso foram utilizados os primers CAS18sF1 F: (TACACACCGCCCGTCTACTA) e CAS5p8sB1d R: (ATGTGCGTTCAAAATGTCGATGTTCA). O programa do termociclador foi desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95° por 20 segundos, 67° por 40s (anelamento), 72° por 20s, seguidos de uma extensão final de 72° por 2 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na localidade Parque Leon Feffer (PLF) foram identificados 272 culicídeos e no Bairro Volta Fria (BVF) 215 exemplares. Foram encontradas nesses locais a tribo *Aedini*, representada pelos gêneros *Aedes*, *Ochlerotatus* e *Psorophora*, a tribo *Culicini* com o gênero *Culex*, tribo *Mansoniini* com o gênero *Mansonia* e ainda podemos destacar a subfamília *Anophelinae* encontrada no BFV.

Nas duas localidades foi observado um predomínio do gênero *Culex* que incluem espécies associadas à competência como vetores de arboviroses. O gênero *Psorophora* também se mostra consideravelmente abundante em ambas as localidades e constitui um dos maiores mosquitos hematófagos do Brasil. As fêmeas desse gênero são extremamente vorazes e apresentam uma tendência por mamíferos, além de atacarem aves e roedores (ALENCAR et. al., 2005). Constitui espécie oportunista, podem atacar o homem trazendo desconforto para a população. Algumas espécies desse táxon também são relatadas como vetores de arboviroses. Destaque deve ser dado ao gênero *Anopheles*, responsável pela transmissão da malária no Brasil. Assim sendo, o relato da presença de anofelíneos na região constitui importante referência para registro de vigilância epidemiológica na região. As condições ambientais favoráveis à proliferação de mosquitos hematófagos e a constante exposição de populações humanas, constituem condições suficientes para a manutenção permanente de monitoramento desses vetores na área.

A presença de culicídeos tipicamente silvestres nos locais indica que ainda se mantém condições bióticas e abióticas adequadas para o desenvolvimento de espécies silvestres de Culicidae, aumentando assim o contato dessas com o homem. A presença de espécies como *Oc. scapularis*, nas duas localidades evidencia condições silvestres alteradas, uma vez que essa se adapta a ambientes modificados.

A utilização do ITS1, gene espaçador dos genes 18s rRNA e 5,8s rRNA, demonstrou ser uma maneira de se diferenciar as espécies através do tamanho das seqüências amplificadas. A figura 1 apresenta o gene ITS1 de algumas espécies identificadas nas localidades estudadas.

Através do presente estudo pudemos obter padrões de amplificação de seqüências ITS1, as quais permitiram a identificação de espécies *Oc. jacobinae*, *Oc. albifaciatus*, *Oc. stigmaticus* e *Oc. fulvitorax* (Figura 1, C a F). Do mesmo modo, as espécies *Oc. scapularis* e *Oc. aenigmaticus* (Figura 1; H a I) também puderam ser identificadas segundo o padrão da mesma seqüência.

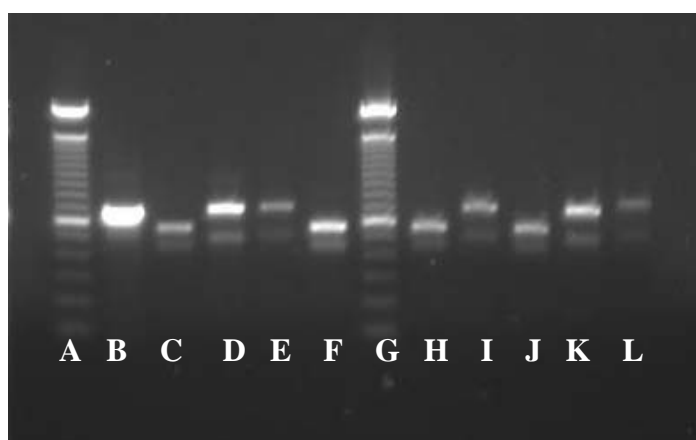


Figura 1: Eletroforese em Gel de Agarose 1% do gene ITS 1. A) Marcador Molecular 100pb. B) Gene marcador do hospedeiro 28s de *Oc. jacobinae*. C) *Oc. jacobinae* D) *Oc. albifasciatus* E) *Oc. stigmaticus* F) *Oc. fulvitorax* G) Marcador Molecular 100pb. H) *Oc. scapularis* I) *Oc. serratus e aenigmaticus* J) *Oc. fluviatilis* K) *Cx chidesteri*. L) *Ps. ferox*.

CONCLUSÕES

- ✓ A modificação de ambientes naturais devido às ocupações humana pode fornecer condições adequadas para o desenvolvimento de espécies urbanas e espécies que se adaptam facilmente a essas alterações.
- ✓ Foi verificada a co-habitação de espécies urbanas e silvestres nos locais de estudo.
- ✓ As duas localidades estudadas apresentam um predomínio da fauna silvestre de culicídeos, entretanto há uma forte presença de espécies urbanizadas (ou adaptadas ao ambiente antropizado).
- ✓ A utilização do marcador molecular ITS1 possibilitou a identificação molecular de espécies de culicídeos, cuja identificação morfológica é difícil e sujeita a presença de peças morfológicas preservadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDOSO, J. C.; CORSEUIL E.; BARATA, J. M. S. Culicinae (Diptera, Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.3, nº 49, junho 2005.

TAIPE-LAGOS, C. B.; NATAL, D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública**, v.37 nº3:275-9, 2003

TISSOT, A. C.; NAVARO-SILVA, M. A. Preferência por hospedeiro e estratificação de Culicidae (Díptera) em área de remanescente florestal do Parque Regional do Iguaçu, Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** v. 21 nº 4: 877-886, Dezembro de 2004.

CONSOLI, R. A. G. B; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

ZHOU W., ROUSSET F., O'NEILL S.L 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proc. R. Soc. Lond B**, n.265, p.509-515, 1998.