

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Moisés Thiago de Souza Freitas**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE TRÊS POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS  
DE *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis***

**Recife**

**2014**

**Moisés Thiago de Souza Freitas**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE TRÊS POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS  
DE *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino**

**Recife  
2014**

**Freitas, Moisés Thiago de Souza**

**Estrutura genética de três populações alopátricas de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) umbratilis/ Recife: O Autor, 2014.**

**44 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Valdir de Queiroz Balbino**

**Mestrado (dissertação) – Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.**

**Inclui bibliografia e anexos**

1. *Lutzomyia* 2. DNA I. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador) II.  
Título

**595.77**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014-182**

**Moisés Thiago de Souza Freitas**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE TRÊS POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS  
DE *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis***

**Aprovado em 28/02/2014**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Valdir de Queiroz Balbino  
UFPE**

---

**Dr. Felipe Arley Costa Pessoa  
Fiocruz - Amazonas**

---

**Dr. Filipe Dantas-Torres  
Fiocruz - Pernambuco**

---

**Dra. Rita de Cassia Moura  
UPE**

**Recife  
2014**

Dedico este estudo a todos meus familiares e amigos, que de forma direta e indireta participaram na realização deste trabalho.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Conselho Nacional de Apoio à Pesquisa por ter me concedido a bolsa de mestrado durante o período de dois anos.

Gostaria de agradecer às instituições e aos laboratórios que forneceram a ajuda financeira e infraestrutura necessárias para a realização deste trabalho (UFPE, LABBE, Fiocruz-AM, LGMH, e Programa de Pós Graduação em Genética).

Agradeço inicialmente aos meus pais por todo esforço, dedicação e empenho para que pudesse estar vivendo este momento de conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Gostaria de deixar meus agradecimentos a todos meus amigos que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste estudo, principalmente a Carlos, César, Lidiane e Marcus Batista, por toda ajuda, amizade e aprendizado passado durante estes dois anos de mestrado, os quais foram de grande valia para minha formação acadêmica e pessoal.

Quero agradecer ao meu orientador Valdir Balbino por seu comprometimento, amizade e serenidade no decorrer deste período de mestrado, além de ter propiciado todo o suporte e ajuda necessária para realização deste estudo.

Agradeço a minha amiga e namorada Elaine Cristina por toda calma, amor, dedicação e principalmente companheirismo durante esta época turbulenta de nossas vidas, mas que com certeza valeu a pena, pois nos trouxe maturidade e conhecimento suficiente para sabermos que poderemos transpor as adversidades.

Deixo meus agradecimentos aos pesquisadores e amigos Felipe Pessoa e  
Claudia Rios por toda ajuda prestada durante o tempo que passei no estado do  
Amazonas para coleta de todo material biológico.

"Nada em biologia faz sentido a não ser à luz da  
evolução"      Theodosius Dobzhansky

## Resumo

*Lutzomyia umbratilis* é o principal transmissor do parasito *Leishmania guyanensis* na América do Sul, uma das espécies envolvidas na Leishmaniose Tegumentar Americana. No Brasil há registros desse vetor na região amazônica e uma população isolada no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Neste estudo amostras de *Lutzomyia umbratilis* de três localidades no Brasil foram estudados para avaliar a estrutura filogeográfica. Posteriormente, as amostras foram processadas de modo a obter sequências correspondentes ao gene *Citocromo Oxidase I*. As análises filogenéticas mostraram a presença de dois clados monofiléticos distintos, um constituído por Recife (PE) e Rio Preto da Eva (AM), e outro formado com amostras de Manacapuru (AM). Os testes de neutralidade foram negativos e não significativos para todas as populações, indicando um desvio do modelo neutro favorecendo a hipótese de que estas populações estão passando por uma expansão recente. Os índices de divergência interpopulacional foram altos quando comparada a população de Manacapuru com Recife e Rio Preto da Eva. As análises de estruturação genética indicaram que as populações estudadas são divididas em dois grupos, uma delas com Manacapuru e a outra com Recife e Rio Preto da Eva.

**Palavras-chaves:** *Lutzomyia umbratilis*; complexo de espécies; análises filogenéticas; DNA *barcode*.

## Abstract

*Lutzomyia umbratilis* is the main vector of the parasite *Leishmania guyanensis* in South America, one of the species involved in American Cutaneous Leishmaniasis. In Brazil, there are records of this vector in the Amazon region and an isolated population in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. In this study, samples of *Lutzomyia umbratilis* from three locations in Brazil were studied to assess their phylogeographic structure. Subsequently, the samples were processed in order to obtain sequences corresponding to *COI* gene. The phylogenetic analysis showed the presence of two distinct monophyletic clades, one consisting of Recife and Rio Preto da Eva, and another formed with Manacapuru samples. The neutrality tests were negative and non-significant for all populations indicating a deviation from the neutral model favoring the hypothesis that these populations are undergoing a recent expansion. The indices of inter-population divergence were high in the comparison between Manacapuru population with Recife and Rio Preto da Eva populations. Genetic structure analyses indicated that the studied populations are divided into two groups, one with Manacapuru isolates and the other with Recife and Rio Preto da Eva isolates.

**Key-words:** *Lutzomyia umbratilis*; species complex; Phylogenetic analysis; DNA Barcoding.

## Lista de Ilustrações

- Figura 1** - Leishmaniose tegumentar americana – duas lesões de 30 dias de evolução em paciente da região de Manaus – AM, observar a presença de lesões satélites “leishmanides”. 6
- Figura 2** - Fêmea do gênero *Lutzomyia* sp. com a presença de sangue no sistema digestivo. 7
- Figura 3** - Número médio das diferenças pareadas intra e interpopulacional e Distância de Nei. 22
- Figura 4** - Rede de haplótipos de *Lutzomyia umbratilis* mostrando os 51 haplótipos interligados. 24
- Figura 5** - Estrutura das populações de *Lutzomyia umbratilis* das localidades de Manacapuru, Rio Preto da Eva e Recife. 25
- Figura 6** - Árvore filogenética de Máxima verossimilhança mostrando a presença dos dois clados para *Lutzomyia umbratilis*. 27
- Figura 7** - Representação esquemática dos sítios polimorfismo de um fragmento de 597 pb do gene *COI* usando Weblog. São mostradas as sequências obtidas de *Lutzomyia umbratilis* coletados em Manacapuru, Rio Preto da Eva e Recife, estados do Amazonas e Pernambuco, Brasil. Tamanho da fonte é um indicativo da frequência da base em um determinado sítio. 28

## Lista de tabela

<b>Tabela 1</b> -	Coordenadas geográficas das localidades dos estados do Amazonas e Pernambuco.	17
<b>Tabela 2</b> -	Medidas de diversidade genética para cada amostra.	23
<b>Tabela 3</b> -	Teste de Neutralidade e parâmetros de expansão populacional estimado para cada amostra.	26
<b>Tabela 4</b> -	Diferenciação genética entre as amostras de <i>Lutzomyia umbratilis</i> .	28

## Lista de Abreviaturas

Item	Definição
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde.
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana.
<i>COI</i>	Citocromo Oxidase I.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local básica.
HKY	Modelo Evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano.
GTR	Modelo Evolutivo General Time Reversible.
<i>R</i>	Índice de irregularidade.
SSD	Soma do desvios dos quadrados.
<i>F<sub>ST</sub></i>	Índice de Fixação Haplotípica.
Mya	Milhões de anos atrás
<i>Cyt B</i>	Citocromo B
K2P	Kimura 2 parâmetro.
<i>Pb</i>	Pares de base.
K	Número de grupos genéticos.
I	Proporção de sítios invariáveis.
G	Distribuição Gama.
Dxy	Diferença média de nucleotídeos par a par entre dois grupos
Da	Número líquido de substituições por sítios entre as populações
Ss	Sítio compartilhados
Sf	Sítios fixados
$\mu\text{L}$	Microlitros

## Sumário

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de ilustrações**

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão da Literatura</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana</b>	<b>4</b>
<b>2.2 <i>Lutzomyia umbratilis</i></b>	<b>8</b>
<b>2.3 Complexo de espécies</b>	<b>12</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>17</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>21</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>30</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>35</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>36</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>41</b>
<b>10. Currículo Lattes atualizado</b>	<b>42</b>

## 1. Introdução

*Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* (Diptera: Psychodidae) é o principal vetor da *Leishmania guyanensis*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Esta espécie encontra-se distribuída na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela..

No Brasil, *L. umbratilis* é amplamente distribuída na bacia amazônica e na Mata Atlântica do estado de Pernambuco. Na região Amazônica, há registros de espécimes de *L. umbratilis* naturalmente infectados com *Le. guyanensis* apenas no lado leste do Rio Negro e norte do Rio Amazonas. No lado sul do Rio Amazonas, as populações de *L. umbratilis* são abundantes, no entanto não foram encontrados infectados com *Leishmania guyanensis*. Esses fatos levaram a sugerirem que este sistema fluvial poderia representar uma barreira geográfica para o ciclo de transmissão da *Le. guyanensis* na região amazônica. Em 1988, foi sugerido por autores que *L. umbratilis* poderia representar um complexo de espécies, uma vez que não foi observada a transmissão da *Le. guyanensis* no lado sul do rio Amazonas.

Estudo realizado recentemente concluiu que populações de *L. umbratilis* de lados opostos do rio Amazonas podem estar inseridas em representar um processo de especiação incipiente, consistindo em duas espécies que ainda não atingiram o status de espécies distintas. Eles provavelmente já iniciaram suas histórias evolutivas independentes após a formação completa dos rios Amazonas e Negro, o que sugere que esses rios podem ter atuado como barreiras geográficas eficazes, impedindo o fluxo gênico entre as populações de *L. umbratilis* de lados opostos.

Devido à importância médica de *L. umbratilis* e sua distribuição descontínua no Brasil. Juntamente com as evidências biológicas e moleculares obtidas a partir das análises etológicas realizadas em populações de *L. umbratilis* da região Amazônica fizeram com que autores sugerissem a existência de um complexo de espécies vivendo em alopatria na Amazônia Central. Sendo sugerido por autores que os rios estejam influenciando nos processos de divergência genética e especiação em alguns grupos de insetos, que contribui para mudanças nos padrões evolutivos e o surgimento de espécies crípticas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a estrutura filogeográfica de populações de *L. umbratilis* de três regiões diferentes do Brasil. Para isto, foi utilizado o gene mitocondrial o *Citocromo Oxidase I* como marcador molecular.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses são um conjunto de enfermidades causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania* Ross (1903), ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, sendo consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças devido a alta taxa de incidência e potencialidade de produzir deformações nos hospedeiros. Essa doença atinge todos os anos aproximadamente 2 milhões de pessoas em 88 países, estando disseminadas em todos os continentes, com exceção da Oceania e Antártida (WHO, 2003).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético, onde há uma alternância de hospedeiros, vivendo uma fase no vertebrado e outra no vetor, sendo este último responsável pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro (Lainson *et al.*, 1978; Grimaldi *et al.*, 1989). Nos hospedeiros mamíferos, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel; nessa fase o agente etiológico necessita obrigatoriamente de células do sistema monocítico fagocitário para sua multiplicação. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos (Rioux, 1991).

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos a *Leishmania* habita o meio extracelular, da luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas,

sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (Killick-Kendrick e Rioux, 1991; Walters, 1993).

Com raras exceções, as leishmanioses constituem enfermidades de animais silvestres (marsupiais, desdentados carnívoros e primatas), e mais raramente domésticos. O homem representa o hospedeiro eventual e parece não ter um papel relevante na manutenção dos parasitas na natureza. A inoculação do parasito pelo inseto determina uma lesão cutânea na porta de entrada, de aspecto pápulo-vesiculoso ou impetigóide, a qual pode regredir espontaneamente. Contudo, a infecção pode permanecer no hospedeiro transformando-se em lesões cutâneas, e posteriormente invadindo a mucosa nasofaríngea, podendo ocasionar diferentes quadros clínicos, dentre eles, as formas visceral e tegumentar (Furtado, 1994; WHO, 2003).

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença antiga, havendo os primeiros relatos na Ásia Central. De acordo com as regiões que ocorriam os casos, recebia uma denominação diferente como: ferida de Balkh, nome de uma cidade do Afeganistão, botão de Aleppo, na Síria e botão de Bagdá, no Iraque. As primeiras descrições clínicas datadas referiam-se a uma doença que destruía o nariz e as cavidades bucais de índios na encosta da Cordilheira dos Andes, nos vales quentes e úmidos. Os relatos iniciais sobre o papel do flebotomíneos na transmissão da Leishmaniose Cutânea ou Uta ocorreram no Peru, no final do século XVIII (Rey, 1992; Genaro, 2004).

No Brasil, Alexandre Cerqueira em 1885, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Em 1908, durante a construção da estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, ocorreram inúmeros casos, principalmente na cidade de Bauru, ficando

conhecida por úlcera-de-Baurú. A doença chegou a ser classificada como associada à ocupação profissional porque atingiu os trabalhadores durante esta obra. Em 1911, Gaspar Vianna, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente específico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Vianna, 1912, apud Gontijo e Carvalho, 2003). Somente em 1922 foi observado, pela primeira vez, o papel dos flebotomíneos na transmissão da LTA (Brasil, 2002). Até o momento, seis espécies de *Leishmania* foram incriminadas como causadoras da LTA no Brasil, entre elas a *Leishmania* (Vianna) *guyanensis*, destaca-se por ser uma das espécies mais proeminentes quanto ao caráter epidemiológico (Gontijo e Carvalho, 2003).

A LTA é uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção no contexto da saúde pública, devido à magnitude da doença assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem (Figura 1), além dos reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35 mil novos casos de LTA no país, estando presente em todos os estados brasileiros (Brasil, 2002).



Figura 1: Leishmaniose tegumentar americana – duas lesões de 30 dias de evolução em paciente da região de Manaus – AM, observar a presença de lesões satélites “leishmanides”. (Fonte: <http://www.sbmt.org.br>).

No ano de 1912, o médico brasileiro Gaspar Vianna foi o primeiro a introduzir o tártaro emético no tratamento da LTA. Contudo, a alta toxicidade e dificuldade de aplicação desta droga tornou necessária a busca de novos fármacos (Ura, 2008). A droga de primeira escolha para o tratamento da LTA, o antimônio pentavalente, apresenta-se em duas formas: antimoniato de N-metilglucamina e estibogluconato de sódio (Gontijo e Carvalho, 2003). Apesar da existência de diferentes formas terapêuticas, o uso da profilaxia é o método mais eficiente para evitar a contração da LTA, pois até o momento não existe um tratamento padrão-ouro para esta doença (Brasil, 2007).

## **2.2 *Lutzomyia umbratilis***

Os vetores responsáveis pela transmissão dos agentes etiológicos da LTA são os flebotomíneos, os quais pertencem ao Filo Arthropoda, da Classe Insecta,

da Ordem Diptera, da Subordem Nematocera, da Família Psychodidae, da subfamília Phlebotominae, do gênero *Lutzomyia* (Figura 3), subdivido em vários subgêneros e espécies. As fêmeas são as responsáveis por transmitir o agente etiológico da LTA ao picar o homem (Iglésias, 1997; Marcondes, 2001). Os flebotomíneos são insetos pequenos cujo tamanho varia de 1,5 a 3mm, olhos grandes, muito pilosos e de cor palha e castanho-claro, facilmente reconhecíveis pela maneira que adotam quando permanecem em repouso, pois as asas ficam entreabertas e ligeiramente erguidas. Por isso, este inseto também é conhecido como cangalha, cangalhinha, asa dura, orelha-de-veado, palha, birigui, tatuíra, bererê, tatuqira, murutinga, escangalhado e asa branca (Brasil, 1997; Rey, 1992; Marzochi *et al.*, 1999).



Figura 2: Fêmea do gênero *Lutzomyia* sp. com a presença de sangue no sistema digestivo (Fonte: <http://leishmaniose.weebly.com/vetor.html>).

No mundo, segundo Aguiar e Medeiros (2003) são conhecidas aproximadamente 800 espécies de flebotomíneos, das quais 60% se encontram na região Neotropical. No Brasil tem-se conhecimento de 229 espécies,

representando 28,6% do total. Dentre as espécies encontradas no Brasil, pelo menos 147 são características de habitats essencialmente silvestres, ficando o contato com o ser humano restrito quando este penetra no ambiente natural.

O ciclo biológico de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Brazil e Brazil, 2003). Após a cópula, as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido, no solo, e com alto teor de matéria orgânica, para garantir a alimentação das larvas. O período de desenvolvimento ocorre entre 30 e 40 dias de acordo com a temperatura passando de ovo ao inseto adulto.

Apenas as fêmeas são hematófagas, sendo sua longevidade estimada em média de 20 dias. Elas apresentam hábitos variados, o que possibilita realizar o repasto sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados, inclusive nos seres humanos. Em áreas urbanas, o cão demonstra ser a principal fonte de alimentação no ambiente doméstico (Marcondes, 2001; Rey, 2001). A transmissão dos parasitos se dá quando as fêmeas dos flebotomíneos ao sugarem o sangue infectado de animais mamíferos silvestres, domésticos ou do homem, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas. Após a infecção das fêmeas pelo parasito, elas podem realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberando as formas promastigotas metacíclicas juntamente a sua saliva. Os flebotomíneos apresentam hábitos crepusculares e noturnos e podem ser encontrados em tocas de animais, currais, chiqueiros, podendo invadir residências e abrigar-se em locais mais escuros. Seus vôos são curtos e baixos caracterizando-se por um aspecto saltitante em um raio de ação normalmente inferior a 200 metros (Rey, 1992; Iglésias, 1997; Marzochi *et al.*, 1999).

Os flebotomíneos responsáveis pela transmissão dos parasitos ao homem e aos animais no Brasil, segundo Young e Duncan (1994), Marcondes (2001) e Aguiar e Medeiros (2003) são: *Lutzomyia anduzei* (Rozeboom, 1942), *Lutzomyia antunesi* (Coutinho, 1939), *Lutzomyia ayrozai* (Barretto e Coutinho, 1940), *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931), *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912), *Lutzomyia migonei* (França, 1920), *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926), *Lutzomyia olmeca bicolor* (Fairchild e Theodor, 1971), *Lutzomyia olmeca nociva* (Young e Arias, 1982), *Lutzomyia paraensis* (Costa Lima, 1941), *Lutzomyia pessoai* (Coutinho e Barretto, 1940), *Lutzomyia quamiventris squamiventris* (Lutz e Neiva, 1912), *Lutzomyia tuberculata* (Mangabeira, 1941), *Lutzomyia ubiquitallis* (Mangabeira 1942a), *Lutzomyia umbratilis* (Ward e Fraiha, 1977), *Lutzomyia wellcomi* (Fraiha, Shaw e Lainson, 1971) e *Lutzomyia whitmani* (Antunes e Coutinho, 1939). Conforme Lainson e Shaw (2005), os agentes patogênicos causadores da LTA no Brasil são: *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (Lainson e Shaw, 1972); *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Floch, 1954) e *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* (Vianna, 1991).

*Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward e Fraiha (Diptera: Psychodidae) é o principal vetor da *Leishmania guyanensis*, agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (Lainson *et al.*, 1976; 1979; 1981). Esta espécie está presente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela, tendo sua distribuição interligada primordialmente a floresta amazônica (Aguiar e Medeiros, 2003). No Brasil, esta espécie apresenta uma ampla distribuição na bacia amazônica, todavia existe uma população isolada na remanescente Mata Atlântica do estado de Pernambuco, região Nordeste (Balbino

et al., 2001). No entanto, na região Nordeste, a sua importância epidemiológica na transmissão da *Le. guyanensis* não é bem conhecida.

Por outro lado, na região Amazônica, há registros de *L. umbratilis* que são naturalmente infectados com *Le. guyanensis* apenas no lado Leste do Rio Negro e do lado Norte do Rio Amazonas (Arias e Freitas 1977; 1978; Arias *et al.*, 1981; Azevedo *et al.*, 2002; 2008). No lado sul do sistema do Rio Amazonas, as populações de *L. umbratilis* são abundantes, mas não foram encontrados infectados com *Le. guyanensis*. Esses fatos levaram Arias e Freitas (1978) a sugerirem que este sistema fluvial poderia ser uma barreira geográfica para ciclo de transmissão da *Le. guyanensis*. Mais tarde, Lainson (1988) sugeriu que *L. umbratilis* pode representar um complexo de espécies, uma vez que não foi observada a transmissão *Le. guyanensis* no lado sul do rio Amazonas, talvez devido ao comportamento diferente observado nos experimentos de fertilização cruzada e comparação do perfil-isoenzimático entre as populações ao norte e do sul do rio Amazonas.

### **2.3 Complexo de espécies**

Dentre os muitos conceitos presentes na literatura, admite-se complexo de espécies crípticas como um conjunto de duas ou mais espécies indistinguíveis por critérios morfológicos (pelo menos superficialmente) e que são ou foram classificadas como um único táxon. Outros autores consideram que tais espécies devam apresentar ainda divergência evolutiva recente, sejam separáveis apenas ao nível molecular, ocorram em simpatria e apresentem isolamento reprodutivo entre elas. Contudo, o fator preponderante desta questão é conseguir reconhecer as espécies que compõem um complexo, e assim poder utilizar estas informações

em implicações práticas para conservação e manejo de espécies importantes do ponto de vista econômico e médico (Bickford *et al.*, 2007).

Dados obtidos a partir do sequenciamento de DNA conseguiram enorme notoriedade em estudos taxonômicos, sendo seus resultados reconhecidos por fornecerem indícios importantes para a delimitação de espécies (Vogler e Monaghan, 2007; Meier, 2008), uma vez que podem ser produzidos em um ritmo muito rápido e sem a necessidade de pesquisadores especializados em taxonomia (Lee, 2000; Scotland *et al.*, 2003; Vogler e Monaghan, 2007). No entanto, a utilização generalizada de dados obtidos a partir deste método tem gerado um grande problema: o desenfreado número de proposições de novas espécies crípticas, mesmo a partir de dados ainda incipientes (Tan *et al.*, 2010).

Em entomologia, a maioria das espécies é reconhecida com base em suas características morfológicas. Entretanto, a utilização exclusiva destes aspectos para algumas espécies pode gerar conflitos devido à notável variabilidade fenotípica observada em algumas famílias. No caso específico da família Sepsidae (Diptera), onde a maior parte desta diversidade está relacionada a fatores ambientais (Meier, 1995), o uso de sequências de DNA se mostra particularmente útil no esclarecimento das fronteiras naturais entre as espécies (Tan *et al.*, 2010). Em outros casos, a variabilidade intraespecífica de membros desta família é, pelo menos parcialmente, geneticamente determinada (Reusch e Blanckenhorn, 1998). Neste caso, sequências de DNA podem ainda ser utilizadas como provas adicionais, mesmo que se leve em consideração que a variabilidade observada em sequências de populações alopátricas pode se tornar de difícil interpretação (Petersen *et al.*, 2007; Ang *et al.*, 2008).

Tan *et al.* (2010) sugerem que a avaliação de espécies crípticas seja realizada de maneira multidisciplinar, em que dados morfológicos, etológicos e genéticos possam ser concatenados para o entendimento do *status* taxonômico de complexo de espécies. Resolver os conflitos taxonômicos de espécies de insetos vetores é importante para a compreensão de seu papel na transmissão de doenças. Assim, a correta identificação destes insetos evita possíveis confusões no reconhecimento das espécies vetoras e não vetoras (Marcondes, 1998).

Um exemplo clássico de complexo de espécies em insetos vetores é representado pelo complexo *Anopheles gambiae*, constituído por sete espécies crípticas. Das espécies que o compõem, apenas *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis* são consideradas importantes vetores de *Plasmodium* no continente africano (White, 1974). Este aspecto correlaciona-se a diferenças na determinação de preferências por hospedeiros específicos e de outras características biológicas que, em conjunto, implicam em diferentes capacidades vetorais (Ayala *et al.*, 2006).

A existência de um complexo de espécies para o gênero *Lutzomyia*, foi sugerida primeiramente por Sherlock & Sherlock (1961) a partir de variações observadas na capacidade de se infectar e transmitir *Leishmania*, experimentalmente em populações de *L. longipalpis* da região Nordeste do Brasil. Mangabeira (1969) observou diferenças morfológicas em machos de *L. longipalpis* de duas populações brasileiras: a população do Ceará apresentou dois pares de manchas claras abdominais (no terceiro e quarto tergitos abdominais), enquanto que a população do Pará apresentou apenas um par de manchas (no quarto tergito). Estas evidências morfológicas, de fato, fizeram com que

Mangabeira levantasse a hipótese de que *L. longipalpis* seria um complexo de espécies.

Recentemente foram avaliadas populações de *L. umbratilis* da Amazônia central, onde a partir de dados gerados através do sequenciamento do gene *COI*, concluiu-se que populações de lados opostos do rio Amazonas podem representar um novo processo de especiação para este gênero, consistindo em duas espécies incipientes que ainda não atingiram o status de espécies distintas. As populações de *L. umbratilis* provavelmente iniciaram suas histórias evolutivas independentemente da formação completa do Amazonas e Rio Negro, o que sugere que esse rio pode ter agido como barreiras geográfica, o que impede o fluxo gênico entre populações *L. L. umbratilis* de lados opostos (Scarpassa e Alencar 2012, 2013).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Geral**

Comparar os padrões de diferenciação genética entre populações alopátricas de *Lutzomyia umbratilis* distribuídas na Amazônia Central e região Nordeste através do gene mitocondrial da Citocromo Oxidase I (COI).

#### **3.2 Específicos**

1. Analisar a estruturação genética e filogeografia de três populações naturais de *Lutzomyia umbratilis*, sendo duas do estado do Amazonas e uma de Pernambuco através do marcador molecular DNA Barcode.
2. Avaliar o papel do Rio Amazonas como barreira geográfica para o fluxo gênico das populações de *Lutzomyia umbratilis* encontradas ao norte e sul da Bacia Amazônica.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Para os estudos moleculares foram utilizados 129 espécimes de *L. umbratilis*, distribuídos entre os municípios de Manacapuru, AM, Rio Preto da Eva, AM e Recife, PE. As coordenadas geográficas, localidades e número de espécimes coletados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Coordenadas geográficas das localidades dos estados do Amazonas e Pernambuco.

Espécie	Localidades, estados	Coordenadas		N
		Longitudes	Latitudes	
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Manacapuru, Amazonas	(3°12'41"S/60°26'20"W)	36	
	Rio Preto da Eva, Amazonas	(2°50'50"S/59°56'28"W)	38	
	Dois Irmãos, Pernambuco	(8°03'14"S/34°52'52"W)	55	

N, Número de indivíduos.

A extração de DNA genômico dos flebotomíneos foi realizada utilizando Chelex®100 (BioRad, Berkeley, California, USA). O método foi utilizado individualmente para cada espécime seguindo o protocolo descrito por Wash (1991), e estocados a -80°C até o momento da reação de PCR. Fragmentos de aproximadamente 540pb do gene *COI* foram produzidos através do primer universal CI-J-1632 (+): 5-TGATCAAATTTATAAT-3 e CI-N-2191 (-): 5-GGTAAAATTTAAAATATAAACTTC-3 descrito originalmente por (Simon *et al.*, 1994). As reações de amplificação em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando o Kit Mix Go Taq Colorless seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% através da luz UV e purificado usando o kit Wizard®SVGel and PCR Clean-UpSystem (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). O sequenciamento foi realizado através do sequenciador automático

ABI3500 (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA). As sequências foram avaliadas quanto ao grau de confiabilidade de cada um dos nucleotídeos utilizando valor de PHRED 30, seguido da montagem dos consensos através do Software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Ao final, alinhamentos locais foram realizados utilizando BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para confirmação do produto sequenciado.

#### **4.2. Análises filogenéticas**

As sequências nucleotídicas correspondentes ao gene *COI* de *L. umbratilis* foram alinhadas e editadas usando o MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Um alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa Muscle (Edgar, 2004). As análises das relações filogenéticas entre os haplótipos foram feitas através do método probabilístico de Máxima Verossimilhança utilizando o software PhyML (Guindon, 2010). O modelo evolutivo HKY + G foi o mais adequado ao conjunto de dados de acordo com o software jModelTest (Posada, 2008). Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o teste estatístico de suporte bootstrap com valor de 1000 réplicas pseudoaleatórias. *L. longipalpis*, *L. migonei* e *Phlebotomus papatasi* foram selecionados como outgroup para a análise filogenética como grupo-irmão.

#### **4.3. Estimativas de tempo de divergência**

O tempo associado à separação dos dois principais clados que envolvem os isolados de Manacapuru e de Rio Negro/Recife foi estimado utilizando o método Bayesiano de relógio molecular relaxado implementado no BEAST v. 1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012). A análise foi realizada por 10.000.000 de

gerações, amostrando as árvores a cada 1000 gerações. O modelo de substituição de nucleotídeos aplicado foi o GTR + I, de acordo com o resultado do jModelTest (Posada, 2008). Uma taxa de relógio *lognormal não-correlacionado* e uma prévia de árvore com o processo *Yulebirth* foram aplicados à análise. A maior árvore de probabilidade dos clados com probabilidades posteriores Bayesianas (BPP) dos clados foram obtidos com o TreeAnnotator v. 1.7.5 (disponível no pacote BEAST), usando a opção *meanheights* e descartando as primeiras 10.000 árvores amostradas para assegurar a estacionaridade.

#### **4.4. Diversidade genética e estruturação populacional**

A diversidade genética intrapopulacional foi mensurada através da análise de diversidade haplotípica e nucleotídica, valor  $K$ , ou seja, número de grupos genéticos, número de sítios polimórficos e número de transições e transversões utilizando os softwares DnaSP v. 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) e o Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Foram avaliadas também as frequências dos sítios polimórficos existentes no conjunto de dados através da ferramenta de visualização on line Web logo com o intuito de encontrar a presença de Single Nucleotide Polimorphisms (SNP's) que pudessem separar estas populações (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

O teste de neutralidade  $D$  de Tajima baseia-se na distribuição das frequências de mutação e na distribuição de haplótipos, distinguindo as diferenças entre as sequências de DNA evoluindo aleatoriamente ("neutra") e daquelas que evoluem no âmbito de um processo não aleatório. Por sua vez a estatística de  $F_s$  de Fu foi utilizada para examinar a estabilidade populacional avaliando a ocorrência de expansão populacional ou "hitchhiking" genético.

A distribuição de Mismatch foi utilizada para estimar a distribuição par-a-par das diferenças nucleotídicas existentes para cada uma das populações com um número de 1000 simulações no software Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O índice de irregularidade ( $r$ ) e Soma dos desvios dos quadrados ( $SSD$ ) foram os testes estatísticos utilizados para ponderar a validade do modelo de expansão recente obtido através da distribuição de Mismatch.

Análises quanto ao nível de diferenciação genética foram feitas com base no índice de fixação  $F_{st}$  de forma pareada entre as populações usando o software Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer 2010). O número médio de substituições por sítios entre as populações ( $D_{xy}$ ), o número total de substituições por sítios entre as populações ( $D_a$ ), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas ( $S_s$ ) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas ( $S_f$ ) foram calculados no software DnaSP v. 4.0 (Rozas *et al.*, 2003).

As análises de estruturação genética foram realizadas através do software Structure v. 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), que se baseia num algoritmo de agrupamento bayesiano para estimar a probabilidade de um indivíduo pertencer a um grupo. As interações foram realizadas com um período de aquecimento de 20.000 interações seguidas por 200.000 interações de Monte Carlo Cadeia de Markov, procedimento para a população “K” ajustado de 1 a 10. Para determinar o número de grupos “K” mais preciso foi utilizada a quantidade ad hoc  $\Delta K$  (Evanno *et al.*, 2005). A rede de haplótipos foi gerada através do software NETWORK v. 4.6 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) utilizando o método Median-joining (Bandelt *et al.*, 1999) para verificar o nível de compartilhamento e a frequência de distribuição dos haplótipos entre as populações.

## 5. Resultados

Foram sequenciados fragmentos com aproximadamente 597 pares de bases através do gene mitocondrial, sendo a partir destes produtos observadas 66 sítios polimórficos representando cerca de 12,2% dos sítios totais, sendo estes distribuídos em 42 (7%) sítios parsimônio informativos e 24 (4%) sítios singleton. Com relação a estes sítios polimórficos houve uma maior representatividade no número de transições (84,9%) que transversões (15,1%), não sendo encontradas deleções ou inserções. As frequências das bases foram estimadas como mostra a seguir: A= 30,2%; T= 39,8%; G= 15,5%; C= 14,5%, sendo o conteúdo A+T (70%) similar ao observado em diferentes análises realizadas utilizando o gene *COI*, isto ocorre devido a características do genoma mitocondrial.

Avaliações foram feitas também quanto ao número médio das diferenças pareadas intra e interpopulacionais, sendo observado que as populações dos municípios de Rio Preto da Eva e Recife apresentaram um elevado nível de diferenciação quando comparadas com as amostras de Manacapuru devido a menor variabilidade genética existente nos espécimes desta localidade. Com relação à análise intrapopulacional, as populações de *L. umbratilis* dos municípios de Rio Preto da Eva e Recife mostraram-se com um maior nível de diferenciação genética.

A distância de Nei, mostrou que o clado I possui uma diferença considerável quando comparadas ao clado II, que foi observado através da utilização do método probabilístico de Máxima Verossimilhança sendo verificada a presença de dois cladogramas monofiléticos distintos, tendo estes cladogramas valores de suporte de 0.93 e 0.99 mostrado nas Figura 3 e 5.

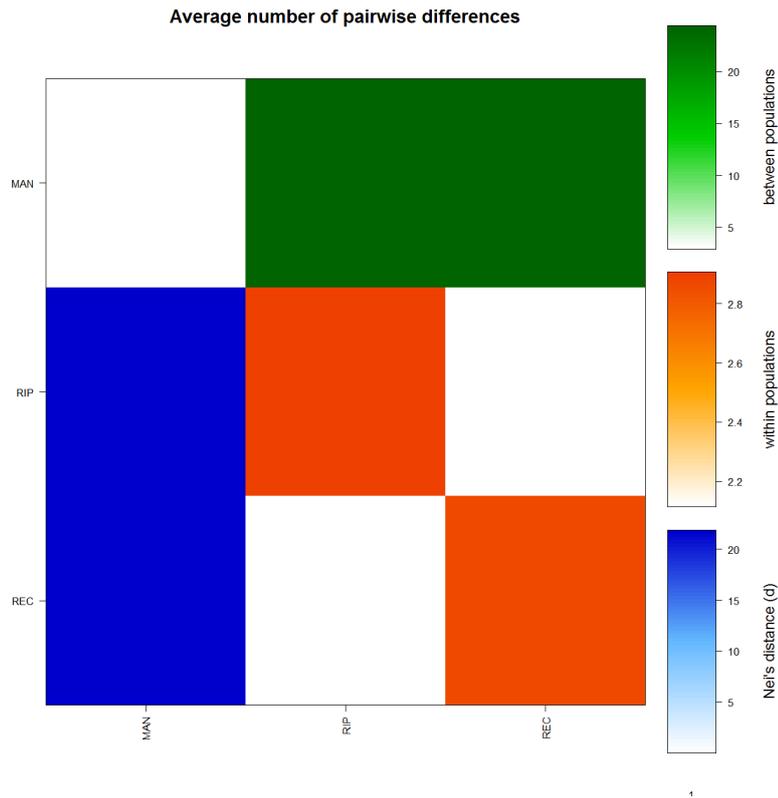


Figura 3: Número médio das diferenças pareadas intra e interpopulacional e Distância de Nei.

Clado I (0.93) foi clusterizado a partir de amostras unicamente Manacapuru, AM, enquanto o Clado II (0.99) apresentou-se com amostras pertencentes aos municípios do Recife, PE e Rio Preto da Eva, AM. A partir dos valores obtidos foi observado que os espécimes pertencentes ao município de Manacapuru (Clado I) apresentaram um valor um pouco inferior de diversidade nucleotídica e haplotípica quando comparados aos indivíduos das populações dos municípios de Recife e Rio Preto da Eva (Tabela 2).

Tabela 2: Medidas de diversidade genética para cada amostra.

Populações	Ts/Tv	NS	Hd	$\pi$
<b>Manacapuru</b>	10/8	18	0,65556	0,003539
<b>Rio Preto da Eva</b>	26/1	26	0,95875	0,004870
<b>Recife</b>	26/2	28	0,94545	0,004807
<b>Total</b>	49/19	66	0,94755	0,019231

TS/TV, Transição/transversão; NS, Número de Sítios polimórficos; K, Número média de nucleotídeos diferentes; Hd, Diversidade haplotípica;  $\pi$ , Diversidade nucleotídica.

A existência de 51 combinações de alelos que se segregam conjuntamente foi constatada, distribuída entre as três populações. Os haplótipos mais frequentes foram H2 e H16, compartilhados por 21 indivíduos da população de Manacapuru e por 15 indivíduos pertencentes às populações de Recife e Rio Preto da Eva (Pernambuco e margem Norte do Rio Negro), respectivamente (Figura 4). A maior parte dos haplótipos (39 haplótipos) foi observada nas populações de Recife e Rio Preto da Eva, demonstrando assim o maior nível de diferenciação genética deste agrupamento. Foi possível constatar também a presença de dois clados distintos (Recife e Rio Preto da Eva) e (Manacapuru), dando-nos indícios que a população do estado de Pernambuco tenha sua ancestralidade ligadas aos indivíduos da margem norte do rio Amazonas, devido ao nível de associação genética observado entre estas populações (Figura 5).

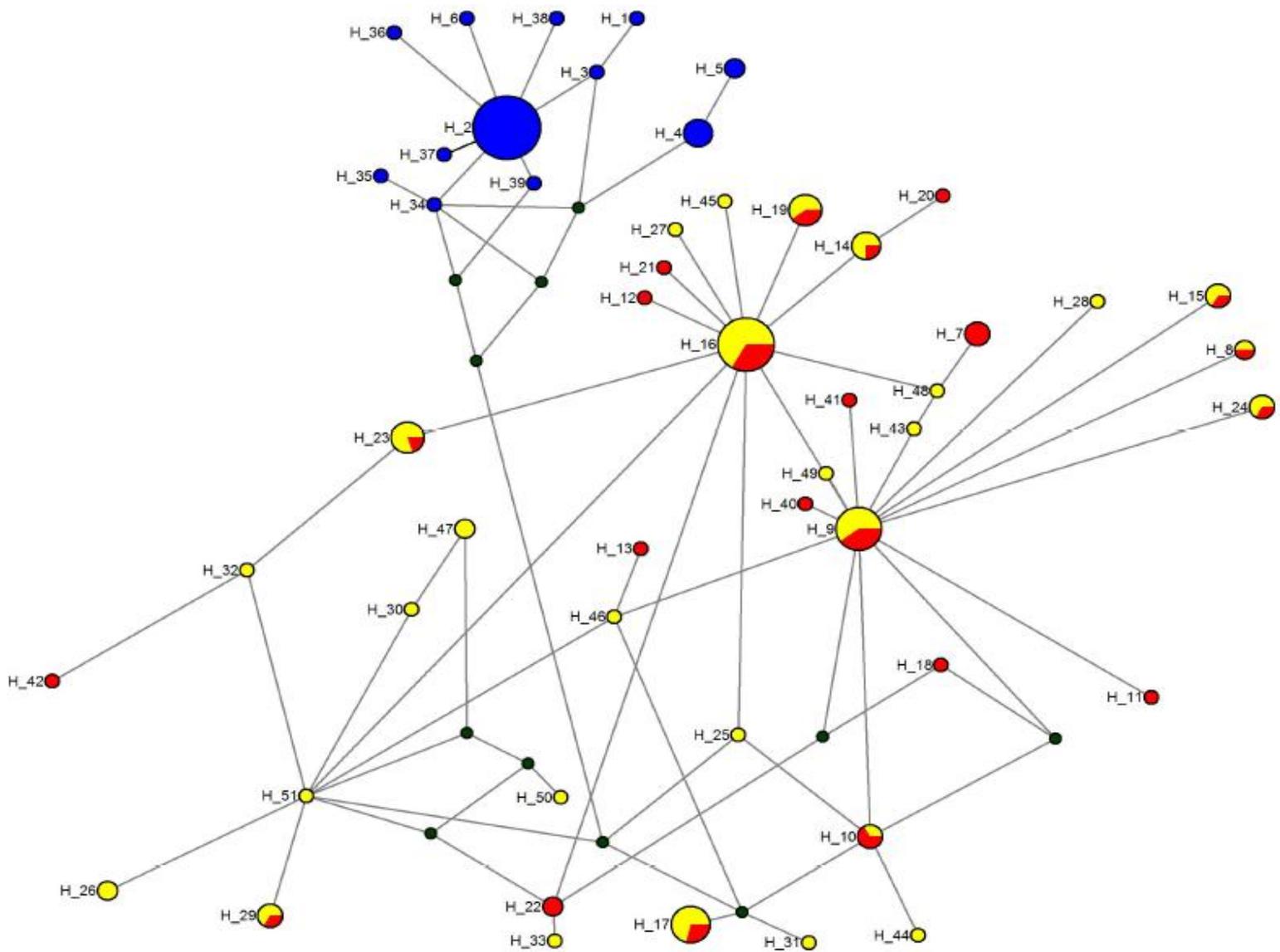


Figura 4: Rede de haplótipos de *Lutzomyia umbratilis* mostrando os 51 haplótipos interligados. O tamanho dos círculos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos observados em cada haplótipos. Os círculos pequenos (Verde) representam eventos mutacionais perdidos no decorrer dos processos evolutivos.

O clado I foi composto na sua totalidade por espécimes pertencentes à população da margem Sul do Rio Negro (12 haplótipos), enquanto o Clado II tem em sua composição indivíduos pertencentes às populações do Estado de Pernambuco e da margem Norte do Rio Negro (39 haplótipos). Através desta análise foi possível verificar a existência de 13 sítios parcimoniosos informativos

nas posições 226, 343, 355, 424, 434, 439, 440, 472, 499, 523, 544, 456 e 574 (Figura 6), que ajudam a compreender um pouco mais a estruturação da rede de haplótipos e árvore filogenética, devido a existência de sítios polimórficos distintos entre as populações (Clado I e Clado II).

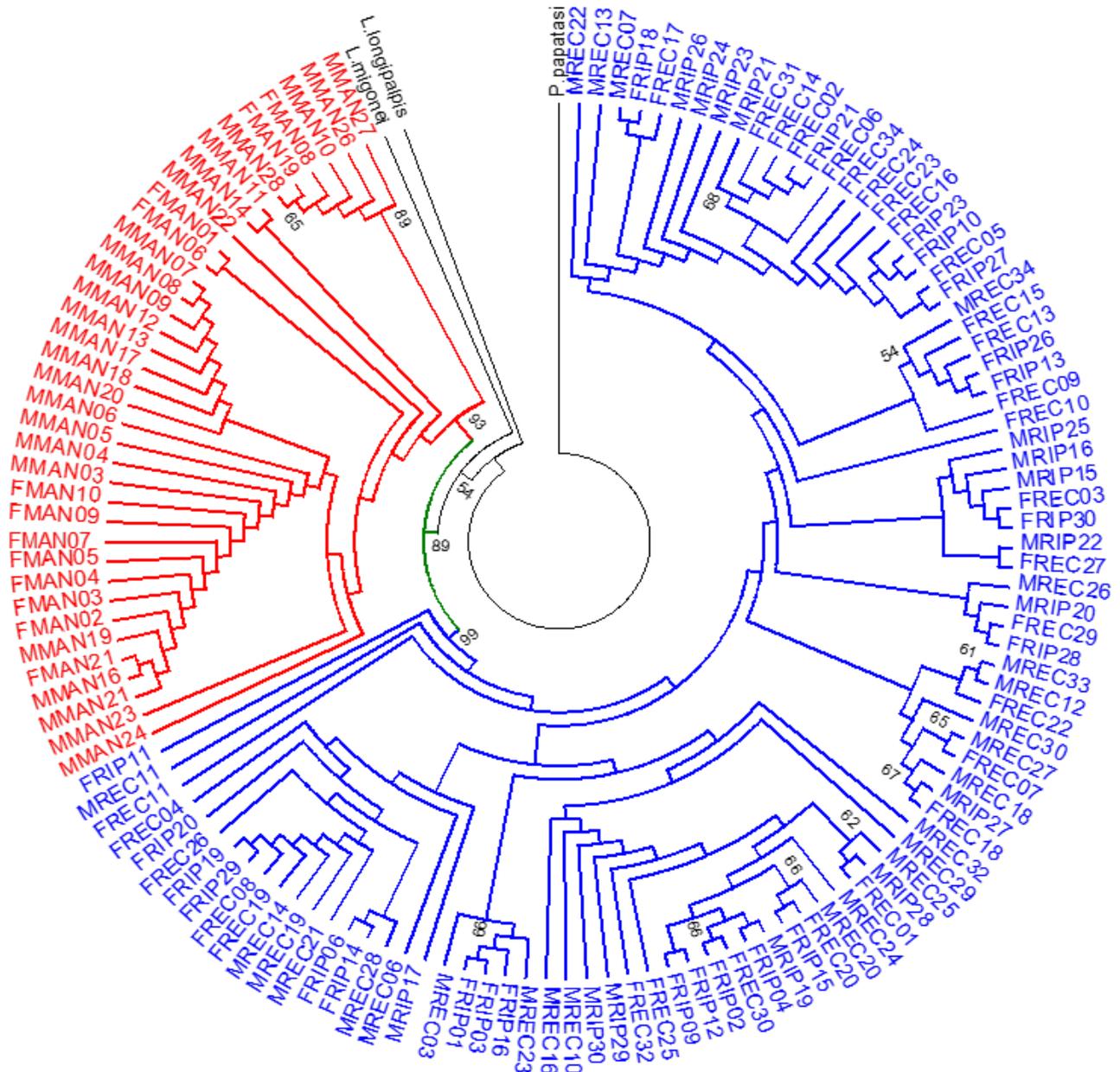


Figura 5: Árvore filogenética de Máxima verossimilhança mostrando a presença dos dois clados para *L. umbratilis*.

O teste *D* de Tajima foi negativo e significativos ( $P < 0.05$ ) para todas as populações estudadas, refletindo um significativo desvio do modelo de

neutralidade, que pode ser explicado pelo elevado número de haplótipos raros existentes dentro destas populações. Este resultado indica que estas populações podem estar passando por um processo de expansão recente ou seleção positiva.  $F_s$  de  $F_u$  foi novamente negativo e significativos ( $P < 0.01$ ) para todas as populações avaliadas, favorecendo a hipótese de que estas populações estejam passando por um processo de expansão recente (Tabela 3).

Tabela 3: Teste de Neutralidade e parâmetros de expansão populacional estimado para cada amostra.

Amostras	D Tajima	$F_s$ $F_u$	$R$	SSD	S	h	K
Manacapuru	-1,70806*	-4,44368**	0,07692*	0,02268*	18	12	2,11270
Rio Preto da Eva	-1,81708*	-16,57669**	0,03686*	0,00190*	26	22	2,90754
Recife	-1,73173*	-23,45417**	0,02872*	0,00054*	28	28	2,87003

$r$ , raggedness index; SSD, soma dos desvios dos quadrados; h, haplotipos; K, Número médio das diferenças; S, Número de sitios segregantes.

\*, $p < 0,05$ ;

\*\*, $p < 0,001$ ;

Para avaliar a hipótese de expansão recente foi feita a distribuição de Mismatch. Os resultados obtidos confirmaram que as populações dos municípios de Rio Preto da Eva, Manacapuru e Recife estão em processo de expansão demográfica recente. O raggedness index ( $r$ ) foi calculado para todas as amostras não rejeitando a hipótese da nulidade para a expansão demográfica recente. O teste da soma dos desvios dos quadrados (SSD) foi também calculado para as populações não sendo significantes.

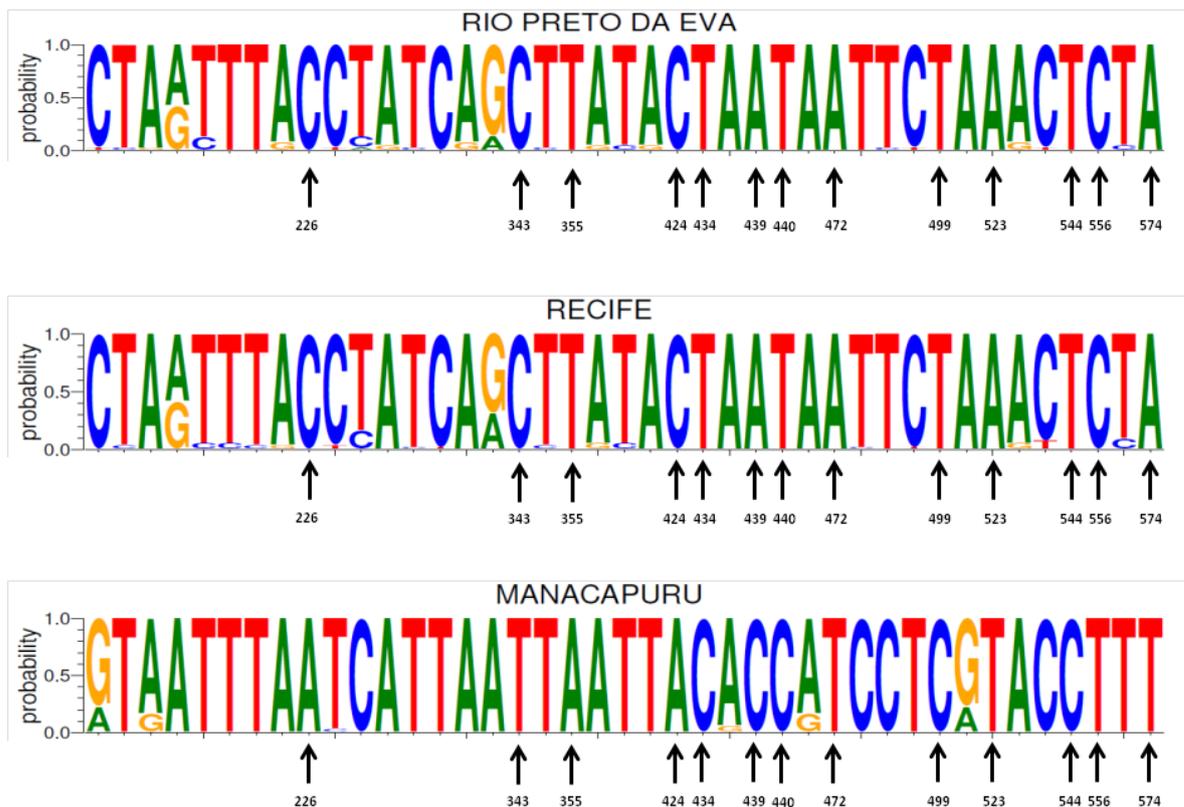


Figura 6: Representação esquemática dos sítios polimorfismo de um fragmento de 597 pb do gene *COI* usando Weblog. São mostradas as sequências obtidas de *Lutzomyia umbratilis* coletados em Manacapuru, Rio Preto da Eva e Recife, estados do Amazonas e Pernambuco, Brasil. Tamanho da fonte é um indicativo da frequência da base em um determinado sítio.

O índice de fixação haplotípica ( $F_{ST}$ ) das amostras foi avaliado, mostrando ser bastante significativo quando comparadas as populações advindas de Rio Preto da Eva e Recife com relação aos espécimes de Manacapuru (Tabela 4). Os valores de  $F_{ST}$  para as amostras do clado II (Rio Preto da Eva e Recife) foram de 0.89 com relação às amostras do Clado I (Manacapuru), refletindo assim num alto grau de divergência genética existentes entre os Clado I e Clado II.

Tabela 4: Diferenciação genética entre as amostras de *Lutzomyia umbratilis*.

Populações	Kxy	Fst	Dxy	Da	Ss	Sf
<b>Manacapuru X Rio Preto da Eva</b>	24,41228	0,89677	0,04089	0,03669	2	17
<b>Manacapuru X Recife</b>	24,09141	0,89357	0,04935	0,03618	2	16
<b>Rio Preto da Eva X Recife</b>	2,89617	0,00261	0,00485	0,00001	15	0

Kxy, Diferença média de nucleotídeos par a par entre dois grupos; Fst, Índice de Fixação Haplotípica; Dxy, Número médios de substituições nucleotídicas por sítios entre os dois grupos; Da, Número líquido de substituições por sítios entre as populações.

As análises de estruturação genética indicaram que este grupo está dividido em dois subgrupos principais, com a quantidade *ad hoc* sustentando o número de  $K = 2$ . O agrupamento foi ratificado pela separação das amostras de acordo com a estruturação observada em todas as análises evolutivas realizadas anteriormente neste estudo mostrando assim a existência de dois clados, onde o número 1 representa a população de Manacapuru (Vermelho) e o número 2 e 3 representam os indivíduos das populações de Rio Preto da Eva e Recife, respectivamente (Azul) mostrado na Figura 7.



Figura 7: Estrutura das populações de *Lutzomyia umbratilis* das localidades de Manacapuru, Rio Preto da Eva e Recife. Distribuição de Q de cada indivíduo para cada grupo. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical dividida em K cores, o tamanho do segmento colorido indica o grau de parentesco de cada indivíduo com um determinado grupo.

Foram realizados os cálculos de tempo de divergência entre as populações através da inferência Bayesiana, mostrando que a separação entre as populações

do clado I e clado II ocorreram entre 0,79-1,68 Mya entre o Pleistoceno e o Plioceno. A Tabela 4 mostra o número médio de diferenças dos nucleotídeos ( $K_{xy}$ ), índice de fixação haplotípica ( $F_{st}$ ), número médio de substituição de nucleotídeos por sítio ( $D_{xy}$ ) e número de substituições por sítios entre as populações ( $D_a$ ). Os valores de  $D_a$ ,  $D_{xy}$  e  $K_{xy}$  foram bastante elevados, similarmente ao que ocorreu com o valor do  $F_{st}$  para os clados I (Manacapuru) e Clado II (Rio Preto da Eva e Recife), refletindo no nível de divergência genética existente entre os dois clados.

## 6. Discussão

As análises filogenéticas verificaram a presença de dois clados distintos em *L. umbratilis* através do valor de  $F_{ST} = 0,89677 - 0,89357$ , sendo dispostos da seguinte forma: Manacapuru (Clado I) e Rio Preto da Eva e Recife (Clado II). Scarpassa e Alencar (2012) avaliaram amostras de *L. umbratilis* de Manacapuru e Rio Preto da Eva, sendo encontrado um valor de  $F_{st} = 0.7100 - 0.8497$ , mostrando assim a existência de dois clados, similarmente ao observado neste estudo. Isto pode ser atribuído ao fato das amostras do estado do Amazonas terem sofrido provavelmente um processo de especiação promovido pelo rio Amazonas como ocorreu em diversas espécies de macacos e pássaros submetidos a este tipo de isolamento na região Amazônica (Gascon *et al.*, 2000).

Segundo Haffer (2001), a divisão e um período longo de isolamento em margens opostas dos rios são fatores preponderantes para a especiação de vários grupos de organismos na região Amazônica. A diferenciação genética detectada neste estudo é reforçada por análises morfológicas e biológicas observadas por Justianiano *et al.*, (2004). A existência de dois clados para *L. umbratilis* apresentam indícios que podem explicar a diferença existente entre a competência vetorial desta espécie na região Amazônica (Arias e Freitas, 1978).

Contudo, existe ainda a necessidade de maiores estudos sobre infecção experimental e dinâmica de transmissão destas populações da região Norte, e principalmente da região Nordeste já que não existem relatos de análises voltados para a evolução, tão pouco para a ecologia desta espécie nesta região. Nossos resultados mostraram também que os indivíduos de Rio Preto da Eva apresentaram um compartilhamento elevado de informação genética com

indivíduos obtidos de Recife, nos dando fortes sinais que esta população possui sua ancestralidade ligada a indivíduos do Norte do rio Amazonas.

Araki *et al.*, 2009, analisando populações do complexo *L. longipalpis* da região Norte e Nordeste utilizando o gene *Period* foram observados valores baixos e não significativos de  $F_{ST}$  para populações de Marajó (PA), Natal (RN) e Sobral (CE), mostrando assim que apesar da distância geográfica estes indivíduos mantiveram um elevado grau de compartilhamento de ancestralidade. Num outro estudo, realizado com o complexo *L. longipalpis* foram utilizadas sequências do gene mtDNA *Cyt B* de nove populações da região Nordeste e uma do estado do Espírito Santo, sendo detectado a presença de dois grupos por meio do valor de  $F_{ST}$  (Coutinho-Abreu *et al.*, 2008).

Em outro estudo que utilizou espécimes de *Anopheles darlingi* das localidades Acre, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima (floresta amazônica), Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Tocantins (savana) e São Paulo e Paraná (Mata Atlântica) foi possível detectar a presença de haplótipos compartilhados entre estas populações indicando assim a presença de um limite potencialmente permeável entre os diferentes tipos de florestas, mostrando assim que apesar da distância geográfica os indivíduos podem apresentar retenção de polimorfismo ancestral (Motoki, 2012).

Ao ser utilizado o método probabilístico de Máxima Verossimilhança foi possível observar a presença de dois clados usando um fragmento de aproximadamente 597 pares de bases para o gene *COI*, ratificado com todas as análises interpopulacionais que apontaram para uma diferença genética entre as populações. Resultado semelhante foi obtido por Scarpassa e Alencar (2012), no qual foi possível detectar dois clados para amostras dos municípios de Rio Preto

da Eva e Manacapuru utilizando um fragmento de aproximadamente 1181 pares de bases para este mesmo gene mitocondrial. Ao ser analisadas estas mesmas populações por Scarpassa e Alencar (2013) utilizando o fragmento referente ao DNA Barcode de 663 pares de bases (Hebert *et al.*, 2003) não foi possível observar a presença dos dois clados para estas populações, quando usadas a distância genética intra e interespecífica baseada no Kimura 2 Parâmetros (K2P) e a árvore filogenética de Neighbor Joining baseada no modelo de K2P. Relatos mostram que existe uma forte limitação do DNA Barcode quando utilizado em conjunto com métodos de distância genética, principalmente quando se trata de definir fronteiras entre espécies com grande sobreposição (Witt *et al.*, 2006). Uma razão para que isto ocorra é a existência de taxas de evolução que variam intra e interespecificamente em diferentes espécies (Kipling e Rubbinoff, 2004; Rubinoff *et al.* 2006, Rubbinoff *et al.*, 2006).

As análises intrapopulacionais mostraram que as populações de Rio Preto da Eva e Recife possuem um alto índice de diversidade genética ao ser mensurado através da diversidade haplotípica e nucleotídica, resultado que diferiu das amostras advindas de Manacapuru, no qual foi observado apenas um valor médio quando levado em relação a outras espécies de dípteros (Scarpassa e Conn 2011; Pramual *et al.*, 2005; Mirabello e Conn 2006). Estes altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica mostram que as populações de Rio Preto da Eva e Recife estão passando por um processo de expansão recente (Avise, 2000). Em contraste, as amostras de Manacapuru que apresentaram um menor valor de diversidade haplotípica e nucleotídica quando levado em consideração as populações de Rio Preto da Eva e Recife, que pode ser reflexo de uma expansão

populacional após um período de um baixo tamanho efetivo populacional (Fu, 1997).

Os testes  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu mostram-se negativos em todas as populações indicando a existência de excesso de mutações raras, que pode implicar também na expansão recente demonstrada também através dos índices de diversidade genética (Ruiz-Pesini *et al.*, 2004). A rede de haplotipos em forma de estrela para *L. umbratilis* é também consistente com a expansão da população, onde a maioria dos haplótipos está distribuída nas pontas, e em tais casos, há uma maior retenção de novas mutações (Fu, 1997). Estes resultados correspondem aos padrões amplamente observados após o último período glacial, que terminou a cerca de 12.500 anos atrás, no qual condições de frio e calor durante a glaciação levaram a mudanças em todo o mundo, e assim a contração das áreas florestais em pequenos refúgios, reduzindo a área de habitat disponível para muitas espécies, ocasionando em muitos grupos este processo de expansão (Pretince e Jolly, 2000).

A estimativa do tempo de divergência realizada através da inferência bayesiana sugere que a separação entre as populações ocorreu entre 0,79 - 1,68 milhões de anos durante o Pleistoceno e o Plioceno. Valores divergentes foram obtidos por Scarpassa e Alencar (2012) para a separação entre estas populações, ocorrendo a cerca de 0,22 milhões de anos durante o plioceno médio. Contudo, este tempo de separação observado por Scarpassa e Alencar (2012) pode ter sido insuficiente para que ocorresse o surgimento de duas linhagens em *L. umbratilis*, com base na especiação alopátrica em estudos realizados com *Drosophila* (Coyne e Orr 2004). No entanto, a hipótese de que estas linhagens podem representar duas espécies pode ser refutada ou confirmada após

realização de outros estudos utilizando diferentes marcadores moleculares e com amostragens adicionais ao longo das margens do rio Amazonas, inclusive com amostras de outros estados da região Amazônica. As análises moleculares mostraram a existência de dois clados monofiléticos distintos, contudo em processo de expansão recente.

## 7. Conclusões

1. As análises moleculares mostraram a existência de dois clados monofiléticos distintos através das análises filogeográficas e de estruturação genética, sendo observado também que a população do estado de Pernambuco possuem sua ancestralidade ligada a populações advindas da margem norte do rio Amazonas.

2. Foi observado também que o rio Amazonas teve forte influência na especiação da espécie *L. umbratilis* da Amazônia Central, conseguindo observar dois grupos distintos para esta espécie.

## 8. Referências Bibliográficas

- Aguiar GM and Medeiros WM (2003). Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Flebotomíneos do Brasil. EF Rangel, R Lainson (eds.), Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255.
- Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W, Lipman D J (1990). "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Ang Y, Puniamoorthy N, Meier R (2008). Secondarily reduced foreleg armature in *Perochaeta dikowi* sp. n. (Diptera: Cyclorrhapha: Sepsidae) due to a novel mounting technique. Systematic Entomology, 33: 552-559.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araújo IB, Hamilton JG, Brazil RP, Peixoto AA (2009). Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). PLoS Negl Trop Dis 3: e365.
- Arias JR, Freitas RA (1977). Flebotomíneos da Amazônia central do Brasil. 1. Resultados obtidos das capturas feitas em isca humana e equina. (Diptera: Psychodidae). Acta Amaz 7: 507–527.
- Arias JR, Freitas RA (1978). Sobre os vectores da leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebotomíneos selváticos. Acta Amaz 8: 387–396.
- Arias JR, Naiff RD (1981). The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban area of Manaus, Central Amazon of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 76: 279–286.
- Avice JC (2000). Phylogeography. The History and Formation of Species. University Press: Massachusetts.
- Ayala D, Le Goff G, Robert V, Jong PD, Takken W (2006). Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in Madagascar and Comoros. Acta Tropica 97: 292-300.
- Azevedo ACR, Costa SM, Pinto MCG, Souza JL, Cruz HC, et al. (2008) Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 103: 760–767.

- Azevedo ACR, Lainson R, Souza AA, Fé NF, Feliciangeli DM, *et al.* (2002) Comparative studies of populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) in Brazil and Venezuela. *J Med Entomol* 39: 587–600.
- Balbino VQ, Marcondes CB, Alexander B, Luna LKS, Lucena MMM, *et al.* (2001). First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward & Frahia, 1977 outside of Amazonian region, in Recife, State of Pernambuco, Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 315-317.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS *et al.* (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 148–155.
- Brasil (2002). Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, v. II.
- Brasil (2007). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: FUNASA, 13p.
- Brasil (1997). Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. Leishmaniose tegumentar americana no Brasil (Ferida Brava). Brasília, 39 p.
- Brazil R P e Brazil B G (2003). Bionomia. In: Rangel, E. F.; Lainson, R. (org.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FioCruz, 368 p. 257-274.
- Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MM, Balbino VQ, *et al.* (2008). *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *Parasites & Vectors* 1: 16.
- Coyne JA e Orr HA (2004). *Speciation*. Sinauer Associates Inc.: Sunderland, MS.
- Drummond A, Suchard J, Xie MA, Rambaut D (2012). A Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7.5 *Mol. Biol. Evol* 29: 1969–1973 .
- Edgar RC (2004). Local homology recognition and distance measures in linear time using compressed amino acid alphabets. *Nucleic Acids Res* 32:380–385.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611–2620.

- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010). Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.
- Fu YX (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915–925.
- Furtado T (1994). Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328.
- Gascon C, Laurence WF, Lovejoy TE (2001). Fragmentação florestal e biodiversidade na Amazônia Central. In. Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. Petrópolis: Vozes. p.112-127.
- Genaro O (2004). Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. et al. Parasitologia humana.10. ed. Rio de Janeiro: Atheneu,. p. 56-72.
- Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D (1989). A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 41:687-725.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010). "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." Systematic Biology 59(3):307-21, 2010.
- Haffer J (2001). Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia, p. 45-118. In: I.C.G. Vieira; J.M.C. DA Silva; D.C. Oren & M.A. D’Incao (Eds). Diversidade cultural e biológica da Amazônia. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 421p.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. London B 270, 313 –321.
- Iglésias JDF (1997). Aspectos médicos das parasitoses humanas. Rio de Janeiro: Medsi, 483p.
- Justiniano SCB, Chagas AC, Pessoa FAC, Queiroz RG (2004). Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. Braz J Biol 64: 227–235.

- Killick-Kendrick R (1979). The biology of Leishmania in phlebotomine sandflies. In: Biology of Kinetoplastida, vol.II (eds W.H.R. Lumsden & D. A. Evans) Academic Press, London/New York, 395-460.
- Killick-Kendrick R, Rioux JA (1991). Intravectorial cycle of Leishmania in the sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 66 (suppl. 1): 71-74.
- Kipling WW e Rubinoff D (2004). "Myth of the Molecule: DNA Barcodes for Species Cannot Replace Morphology for Identification and Classification". *Cladistics* 20:47–55.
- Lainson, R., R.D. Ward and Shaw J.J. (1978). Leishmania in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the Leishmania maxicana and L braziliensis complexes. *Proc. Roy. Soc. London* (8) 199:309- 320.
- Lainson R (1988). Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Phil Trans R Soc B* 321: 389-404.
- Lainson R e Shaw JJ (2005). New World leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; Kreier J. P.; Wakelin, D. *Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. 17:313-349.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Miles M, et al. (1981). Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of Leishmania species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. brasiliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 530–536.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD (1979). Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of Leishmania from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 239–242.
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ (1976). Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70: 171-172.
- Lee SD, Kang SO, Hah YC (2000). a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50,191–199.

- Mangabeira Filho O (1969). Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. Rev Bras Mal Doenc Trop 21: 3-26.
- Marcondes C D (2001). Entomologia médica e veterinária. São Paulo: Atheneu, 432. p.13-30.
- Marcondes MC (1998). Seria a taxonomia insignificante para a ecologia de vetores? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31(5):492-493.
- Marzochi M C A, Schubach A O, Marzochi K B F (1999). Leishmaniose tegumentar americana. In: Cimerman, B., Cimerman, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu, 375p. p. 39-64.
- Meier R (1995). Cladistic analysis of the Sepsidae (Cyclorrhapha: Diptera) based on a comparative scanning electron microscopic study of larvae. Systematic Entomology 20:99–128.
- Mirabello L e Conn JE (2006) Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity 96: 311–321.
- Motoki MT (2012). Caracterização de populações de *Anopheles darlingi* (Diptero: Culicidae) do Brasil por estruturas da morfometria externa dos ovos, das asas e por sequências gênicas. tese de doutorado (Programa de pós-graduação em Saúde Pública) Universidade de São Paulo.
- Petersen FT, Damgaard J, R. Meier (2007). DNA Taxonomy: How many DNA sequences are needed for solving a taxonomic problem? The case of two parapatric species of louse Flies (Diptera: Hippoboscidae: Ornithomya (Latreille, 1802). Arthropod Systematics & Phylogeny 65: 111-117.
- Posada D (2008). jmodeltest: phylogenetic model averaging. molecular biology and evolution 25: 1253-1256.
- 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. Mol Ecol 14: 3989–4001.
- Prentice IC e Jolly D (2000). Mid-Holocene and glacial-maximum vegetation geography of the northern continents and Africa. *Journal of Biogeography* 27:507–19.

- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959.
- Reusch T e Blanckenhorn W U (1998). Quantitative genetics of the dung y *Sepsis cynipsea*: Cheverud's conjecture revisited. *Heredity* 81: 111-119.
- Rey L (1992). *Bases da parasitologia medica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 349 p.
- Rey L (2001). Dípteros nematóceros em geral: psicodídeos, simulídeos e ceratopogonídeos. In: *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 56:697-703.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
- Rubinoff D (2006). “Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation”. *Conserv. Biol* 20:1026–1033.
- Rubinoff D, Cameron S, Will K (2006). “A Genomic Perspective on the Shortcoming Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification”, *J. Hered* 97:581–594.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC (2004). Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303(5655): 223-226. doi:10.1126/science.1088434.
- Scarpassa VM, Alencar RB (2012). *Lutzomyia umbratilis*, the Main Vector of *Leishmania guyane sis*, Represents a Novel Species Complex? *PLoS ONE* 7(5): e37341. doi:10.1371/journal.pone.0037341.
- Scarpassa VM, Alencar RB (2013). Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Parasites & Vectors*, v. 6, p. 258.
- Scarpassa VM, Conn JE (2011). Mitochondrial DNA detects a complex evolutionary history with Pleistocene Epoch divergence for the Neotropical Malaria Vector *Anopheles nuneztovari sensu lato*. *Am J Trop Med Hyg* 85: 857–867.
- Scotland RW, Hughes C, Bailey D, Wortley A (2003). The Big Machine and the Much-Maligned Taxonomist. *Systematics and Biodiversity* 2: 139 -143.

- Sherlock IA e Sherlock V C (1961). Sobre a infecção experimental de "*Phlebotomus longipalpis*" pela "*Leishmania donovani*". Rev Bras Bio 2: 409-418.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook PC (1994). Evolution weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87:651–700.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.
- Tan DSH, Ang Y, Lim GS, Bin IMR, Meier R (2010). "cryptic species" to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). Zoologica Scripta 39: 51–61.
- Ura S (2008). Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). In: Farhat, Calil Kairalla; Carvalho, Luiza Helena Falleiros Rodrigues; SUCCI, Regina Celia de Menezes. Infectologia Pediatrica. Sao Paulo: Atheneu 67: 871-888.
- Viannia G (1912). Sobre uma espécie de *Leishmania*. Brasil Médico 25:411.
- Vogler AP and Monaghan MT (2007). Recent advances in DNA taxonomy. J. Zool. Systematic. Evolution. Res. 45:1-10.
- Walters LL (1993). *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly host. Journal of Eukaryotic Microbiology 40:196-206.
- Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R (1991). Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10:506–513.
- White GB (1974). *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 68: 278-301.
- WHO - World Health Organization 2003. Leishmaniasis [acession 2014 Jan 30]. Available from: <http://www.who.int>.

- Witt JDS, Threlloff DL, Hebert PDN (2006). DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology*, 15, 3073 – 3082.
- Young DC and Duncan NA (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem An Entomol Institut* 54: 1-881.

## 9. Curriculum vitae (Lattes)

Moisés Thiago de Souza Freitas

Curriculum Vitae

---

### Dados pessoais

**Nome** Moisés Thiago de Souza Freitas  
**Filiação** Moises Pereira de Freitas e Maria das Graças de Souza Freitas  
**Nascimento** 18/05/1986 - recife/PE - Brasil  
**Carteira de Identidade** 7004337 SDS - PE - 27/02/2002  
**CPF** 059.257.644-20

---

### Formação acadêmica/titulação

- 2012** Mestrado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Variação genotípica de três populações alopátricas pertencentes a espécie *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis*, principal vetor da *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*  
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 - 2012** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Diferenciação Genética entre Duas Populações Simpátricas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) do Município de Sobral - CE, Brasil.  
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino
- 

### Formação complementar

- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Basic Course for Travel Medicine.  
SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE MEDICINA DEL VIAJERO, SLAMVI, Argentina
- 

### Produção

### Produção bibliográfica

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

### 1. GOMES JUNIOR, P. P., FREITAS, M. T. S.

An efficient method of DNA extraction of single egg of *Aedes aegypti*. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro.

**Vector.** XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian, 2012. v.II. p.220 - 189

### 2. FREITAS, M. T. S.

Identification of bacterial diversity from digestive tract of *Triatoma brasiliensis* using 16S rRNA gene. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro.

**DISEASES BY BACTERIA.** XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian, 2012. v.II. p.189 -

## Apresentação de trabalho e palestra

### 1. GOMES JUNIOR, P. P., FREITAS, M. T. S.

**An efficient method of DNA extraction of single egg of *Aedes aegypti*.**, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Inglês; Local: Rio de Janeiro; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine*

### 2. FREITAS, M. T. S.

**Identification of bacterial diversity from digestive tract of *Triatoma brasiliensis* using 16S rRNA gene.**, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Inglês; Local: Rio de Janeiro; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine*

## Eventos

### Eventos

#### Participação em eventos

1. **XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine** aa, 2012. (Congresso)

An efficient method of DNA extraction of single egg of *Aedes aegypti*.

2. **II Jornada de Pós-graduação em Genética**, 2012. (Outra)

Identificação da diversidade populacional bacteriana do trato digestivo de *Triatoma brasiliensis* através do gene 16S rRNA.

3. **XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII**

**Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine** aa, 2012.  
(Congresso)

Identification of bacterial diversity from digestive tract of *Triatoma brasiliensis* using 16S rRNA gene.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine** aa, 2012. (Congresso)

Population genetics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) from Caririaçu, Ceará.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **58° Congresso Brasileiro de Genética**, 2012. (Congresso)

Sequencing Mitochondrial Genome of *Lutzomyia umbratilis*, Vector of Cutaneous Leishmaniasis.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies**, 2012. (Simpósio)

Using Molecular Marker for the Determination of Taxonomic Status of *Lutzomyia umbratilis*.

7. **XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria AND XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine** aa, 2012.  
(Congresso)

.