

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

Pierre Teodósio Félix

**Abordagem multi-metodológica utilizando o gene *period*
(*per*) em estudos de genética de populações e
filogeografia de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum chagasi* na
Região Tropical.**

Recife

2013

Pierre Teodósio Félix

**Abordagem multi-metodológica utilizando o gene *period*
(per) em estudos de genética de populações e
filogeografia de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum chagasi* na
Região Tropical.**

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

Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Recife

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Félix, Pierre Teodósio

Abordagem multi-metodológica utilizando o gene period (per) em estudos de genética de populações e filogeografia de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum chagasi* na Região Tropical/ Pierre Teodósio Félix– Recife: O Autor, 2013.

85 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Genética de populações 2. Diptera 3. *Leishmania* I. Balbino, Valdir Queiroz (orientador) II. Título**

576.58 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2013-171

Pierre Teodósio Félix

Abordagem multi-metodológica utilizando o gene *period* (**per**) em estudos de genética de populações e filogeografia de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum chagasi* na Região Tropical.

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Vladimir da Mota Silveira Filho
Universidade de Pernambuco

Dr. Lívio Carvalho de Figueiredo
Universidade Federal da Paraíba

Dr. Tiago Alessandro Espínola Ferreira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife

2013

Agradecimentos

À minha Mãe, Dona Nice, e ao meu irmão, Reginaldo Júnior, pelo incansável apoio e dedicação.

Aos meus filhos Pierre Filho e Júlio Lucas, minhas fontes de inspiração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pelas dicas e em especial pela paciência em momentos críticos.

Aos Professores do Departamento de Genética pelo apoio recebido, em especial ao vice-coordenador do PPGG, Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior por algumas intervenções em meu favor geralmente precisas e pontuais.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE), pelos momentos divertidos e pela disponibilidade dentro e fora do laboratório.

A natureza não é cruel, apenas implacavelmente indiferente. Esta é uma das lições mais duras que os humanos têm de aprender.

Richard Dawkins

Resumo

Lutzomyia longipalpis, principal vetor da *Leishmania infantum chagasi*, apresenta status taxonômico bastante controverso, sendo aventada a possibilidade de que esta espécie represente, na verdade, um complexo de espécies crípticas. Diferenças genéticas entre as espécies irmãs podem implicar em diferenças nas suas respectivas capacidades vetorais, a exemplo do que é observado no mosquito *Anopheles gambiae*. No intuito de fornecer subsídios para a resolução dos conflitos existentes acerca do real status taxonômico de populações brasileiras de *Lu. longipalpis*, o presente trabalho faz uso de métodos robustos e intensivos, baseados em modelos probabilísticos utilizando o gene *period*. Uma das vantagens desse tipo de abordagem multi-metodológica é o fato de por não dependerem de distância genética, podem ser empregados para avaliação de processos de especiação incipientes em que os polimorfismos genéticos não são abundantes. Os resultados encontrados indicam que os métodos de atribuição genética e de máxima verossimilhança apresentaram respostas interessantes não observadas quando se utilizam outras metodologias, incrementando assim, a discussão da taxonomia de *Lu. longipalpis*. Tais resultados sugerem uma subestruturação, não havendo correlação significativa entre a distância geográfica e a variabilidade genética. Fatores evolutivos como a retenção de polimorfismo ancestral parecem ser responsáveis pela diversidade entre as populações, justificando talvez os mecanismos atuantes na diferenciação do vetor e conseqüentemente na transmissão da *Leishmania* no Brasil.

Palavras-chave: Abordagem multi-metodológica; *Lutzomyia longipalpis*; *period*; Genética de populações.

Abstract

Lutzomyia longipalpis, the main vector of *Leishmania infantum chagasi*, presents quite controversial taxonomic status, and suggested the possibility that this species represents actually a complex of cryptic species. Genetic differences between sibling species may involve differences in their respective capacities vector, similar to what is observed in the mosquito *Anopheles Gambiae*. In order to provide support for the resolution of conflicts about the real taxonomic status of Brazilian populations of *Lu. longipalpis*, the present work uses intensive and robust methods based on probabilistic models using gene *period*. One advantage of this type of multi-methodological approach is that not depend on genetic distance, can be employed to evaluate processes of incipient spetiation wherein the genetic polymorphisms are not abundant. The results indicate that the methods of genetic allocation and maximum likelihood showed interesting responses not observed when using other methodologies, thereby increasing the discussion of the taxonomy of *Lu. longipalpis*. These results suggest a substructuring, no significant correlation between geographic distance and genetic variability. Evolutionary factors such as retention of ancestral polymorphism appear to be responsible for the diversity between populations, perhaps explaining the mechanisms acting on the vector differentiation and consequently the transmission of *Leishmania* in Brazil.

Keywords: Multi-methodological approach; *Lutzomyia longipalpis*; *period*; Population genetics.

Lista de Ilustrações

- Figura 1.** Flebotomíneo conservado em âmbar. Proveniente da Região neotropical e com datação do Cretácio inferior. (Fonte: The virtual *museum* – <http://www.fossilmuseum.net>). 03
- Figura 2.** Representação gráfica da expansão espacial e sua relação com o número de migrantes em subpopulações vizinhas. (Fonte: Excoffier et al., 2005). 11
- Figura 3.** Estrutura genômica do gene “*period*” em *D. melanogaster* com seus 20 éxons. Em destaque região utilizada em estudos genético-populacionais. Ainda em destaque sequencia consenso do gene *period* de *Lu. longipalpis* com 525 pb utilizada neste trabalho. (Fonte: Gotter et al., 1999). 16
- Figura 4:** Pontos de coleta dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* (1S e 2S). Sobral, Ceará (03°40'57.89"S, 40°21'4.20"O) e Caririaçu, Ceará (07° 02' 32" S, 39° 17' 01" O). (Fonte: EMBRAPA). 18
- Figura 5:** Representação gráfica dos sítios variáveis do gene *period* de *Lu. longipalpis* entre os morfotipos SOB1S, SOB2S, CAR1S e CAR2S. O tamanho de cada nucleotídeo é proporcional à sua frequência para os determinados sítios. 22
- Figura 6.** Matriz de distância inter-haplotípica e número de sítios polimórficos encontrados no morfotipo Sobral 1S. *Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do software Arlequin versão 3.5.1.2. 23
- Figura 7.** Matriz de distância genética baseada no F_{ST} entre os morfotipos 1S e 2S Sobral-CE e 1S e 2S Caririaçu no estado do Ceará. * Gerada pelo pacote 25

estatístico em linguagem R usando os dados de saída do software Arlequin versão 3.5.1.2.

Figura 8. Dendograma gerado pelo método UPGMA a partir de matrizes de F_{ST} com os 118 haplótipos que compuseram os morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Caririaçu 1S e Caririaçu 2S de *Lu.longipalpis* das localidades de Sobral e Caririaçu no Estado do Ceará. 26

Figura 9. Dendograma construído pelo método UPGMA a partir de matrizes de F_{ST} dos 118 haplótipos que compuseram os morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Caririaçu 1S e Caririaçu 2S de *Lu.longipalpis* das localidades de Sobral e Caririaçu no Estado do Ceará. (a) árvore em círculo com coloração azul para o morfotipo 1S e vermelha para 2S; (b) árvore irradiada com coloração vermelha para o morfotipo 1S e vermelha para 2S. 27

Figura 10: Estrutura genética da população com 118 haplótipos de *Lu. longipalpis* da cidade de Sobral e Caririaçu no Estado do Ceará. (a) Distribuição de Q de cada indivíduo para cada grupo. Cada indivíduo é representado por uma única linha vertical dividida em K cores, o tamanho do segmento colorido indica o grau de parentesco de cada indivíduo àquele grupo. (b) Estimativa do número de populações apropriado de acordo com Evanno *et al.* (2005). (c) Probabilidades *a posteriori* estimadas de K, para as localidades de Sobral e Caririaçu-CE 28

Figura 11: Árvore de máxima verossimilhança observada para a população de Sobral-CE 1S e 2S e Caririaçu 1S e 2S, baseada no modelo evolutivo GTR+I+G. Nota-se que esta topologia conseguiu agrupar os morfotipos em dois clados distintos 1S em azul e 2S em vermelho. A árvore foi enraizada com quatro grupos 30

externos diferentes para obter melhor polarização.

Figura 12: Árvore de máxima verossimilhança observada para a população de Sobral-CE 1S e 2S, baseada no modelo evolutivo GTR+I+G. Nota-se que esta topologia conseguiu agrupar os morfotipos em dois clados distintos 1S em azul e 2S em vermelho. A árvore foi enraizada com quatro grupos externos diferentes para obter melhor polarização da mesma. 31

Figura 13: Árvore de máxima verossimilhança para a população de Caririaçu-CE 1S e 2S baseada no modelo evolutivo $TrN+I+G$. Nota-se que esta topologia conseguiu agrupar os morfotipos em dois clados distintos 1S em azul e 2S em Cinza. A árvore foi enraizada com quatro grupos externos diferentes para obter melhor polarização da mesma. 32

Figura 14. Matriz de diferenças pareadas entre as populações estudadas: Entre os grupos; Dentro dos grupos e a distância de Nei para os morfotipos 1S e 2S Sobral-CE e 1S e 2S Caririaçu-CE. * Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do software Arlequin versão 3.5.1.2. 34

Figura 15. Matriz de tempo de divergência entre as populações de *Lu. longipalpis*. Em evidência o elevado valor tau presente entre os morfotipos 1S e 2S Sobral-CE e 1S e 2S Caririaçu-CE. * Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do software Arlequin versão 3.5.1.2. 34

Figura 16. Teste de Mantel gerado com as matrizes de F_{ST} e Matriz geográfica. No eixo horizontal, valores que representam a distância geográfica em Quilômetros entre os morfotipos; No eixo vertical, valores que representam a distância genética por F_{ST} entre os morfotipos. 35

Figura 17. Comparação entre a Expansão Demográfica e Espacial de *Lu. longipalpis*. (a-d) Gráficos de expansão demográfica dos morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Caririaçu 1S e Caririaçu 2S, respectivamente; (e-h) Gráficos de expansão espacial dos morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Caririaçu 1S e Caririaçu 2S, respectivamente. *Gráfico Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do software Arlequin versão 3.5.1.2. 37

Figura 18. Rede de haplótipos *median-joining*, construída com todo o conjunto haplotípico de *Lu. longipalpis* das localidades Sobral e Caririaçu, Ceará, Brasil. Cada círculo compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à sua frequência. Cada traço nas linhas que conectam os haplótipos representa um passo mutacional, mais de dez passos mutacionais foram representados por números. As cores dos haplótipos representam correspondentes para a mesma frequência. 38

Figura 19. Gráfico dos índices de Diversidade Molecular em populações de *Lu. longipalpis* dos morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Caririaçu 1S e Caririaçu 2S. No gráfico os valores de teta: **(θk)** Relação entre o numero esperado de alelos (k) e o tamanho da amostra; **(θH)** Homozigosidade esperada numa relação equilibrada entre deriva e mutação; **(θS)** Relação entre o numero de sitios segregantes (S), o tamanho da amostra (n) e os sitios não recombinantes; **($\theta \pi$)** Relação entre o numero médio de diferenças pareadas (π) e teta (θ). * Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do software Arlequin versão 3.5.1.2. 41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características gerais de 118 sequências de um fragmento do gene <i>period</i> de espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> das localidades cearenses de Sobral e Caririaçu.	23
Tabela 2. Valores de F_{ST} pareado para os morfotipos de <i>Lu. longipalpis</i> nas localidades de Sobral e Caririaçu no Estado do Ceará.	24
Tabela 3: Análise de Variância Molecular, aplicando-se o FST de Wright (1969), para as 118 sequencias do fragmento de 525 pb do gene <i>period</i> de <i>Lu. longipalpis</i> .	33
Tabela 4. Distância geográfica (km) e genética (F_{ST}) entre morfotipos de <i>Lu. longipalpis</i> nas localidades Cearense de Sobral e Caririaçu.	36
Tabela 5. Índices de Diversidade Molecular para as 118 sequencias do fragmento de 525 pb do gene <i>period</i> de <i>Lu. longipalpis</i> agrupadas em quatro morfotipos distintos.	40
Tabela 6. Testes de Neutralidade para as 118 sequencias do fragmento de 525 pb do gene <i>period</i> de <i>Lu. longipalpis</i> agrupadas em quatro grupos distintos.	42
Tabela 7. Simulações da expansão demográfica e espacial baseadas nos índices Tau e Teta e M, do gene <i>period</i> para os quatro morfotipos de <i>Lu. longipalpis</i> .	45

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

<i>per</i>	Gene period
NP	Método polinomial não determinístico - A Classe NP é constituída por todos os problemas de decisão para os quais existe um algoritmo não-determinístico limitado polinomialmente.
EA	Algoritmos Evolutivos
F _{ST}	Índice de Fixação
FSC	Índice de Fixação entre populações dentro dos grupos
FCT	Índice de Fixação entre grupos
DNA	Acido desoxirribonucleico
F	Estatísticas F
<i>tim</i>	Gene <i>timeless</i>
PAS	(Per-Arnt-Sim)- Domínio proteico que permite a dimerização proteína-proteína.
Thr-Gly	Região não conservada, que apresenta repetições dos aminoácidos treonina e glicina.
CLD	Domínio de localização citoplasmática
CDC	Armadilha luminosa para captura de Flebotominios
UPGMA	Método de pareamento por média não ponderada
Δk	Calculado com base na velocidade da ordem de mudança entre as probabilidades (Evanno et al. 2005). O Δk mostra um pico nítido para o verdadeiro valor de K.
K	Número de populações de um dado conjunto de dados

GTR+I+G *General Time Reversible* - Modelo de evolução estimado na proporção invariante de Gama.

τ Estimador do tempo de expansão

θ Índice de Diversidade entre populações

θ_k Relação entre o numero esperado de alelos (k) e o tamanho da amostra.

θ_H Homozigosidade esperada numa relação equilibrada entre deriva e mutação.

θ_S Relação entre o numero de sítios segregantes (S), o tamanho da amostra (n) e os sítios não recombinantes;

θ_π Relação entre o numero médio de diferenças pareadas (π) e teta (θ).

θ_S Uma estimativa de θ obtida a partir do número observado de sítios segregantes S

θ_π Uma estimativa de θ obtida a partir do número médio de diferenças pareadas π

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de ilustrações	iii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	ix
1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	02
2.1 Leishmaniose Visceral Americana	02
2.2 Flebotomíneos	03
2.3 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	04
2.4 <i>Lutzomyia longipalpis</i> pertence, de fato, a um complexo de espécies crípticas?	05
2.5. Algoritmos evolutivos	06
2.6. Algoritmos evolutivos e sua associação aos algoritmos probabilísticos no estudo de complexos de espécies.	07
2.7. Testes Usando a Teoria Neutra	09
2.7.1. Teste de Homozigose de Ewens-Watterson	10
2.7.2. Expansão Espacial	11
2.8. Estrutura Populacional Inferida Pela Análise De Variância Molecular (AMOVA)	12

2.9.	Teste De Mantel	14
2.10.	A Escolha do marcador: o gene <i>period</i> (per) em estudos de complexos de espécies.	15
3.	Objetivos	18
3.1.	Geral	18
3.2.	Específicos	18
4.	Material e Métodos	19
4.1.	Conjunto de dados	19
4.2.	Análises de estruturação genética	20
4.3.	Análises filogenéticas	21
5.	Resultados	21
5.1.	Propriedades gerais dos fragmentos do gene <i>period</i> (per) de <i>Lu. longipalpis</i>	23
5.2.	Análises de Distância Genética	25
5.3.	Análises de estruturação genética	29
5.4.	Análises Filogenéticas e Genético-populacionais	30
5.4.1.	Filogenia dos morfotipos 1S e 2S	30
5.4.2.	Análise de variância Molecular (AMOVA)	34
5.4.3.	Correlação entre expansão demográfica e espacial	36
5.4.4.	Análises da diversidade molecular	40
5.4.5.	Análise do efeito de expansão populacional	44

6. Discussão	46
7. Conclusões	50
8. Referências Bibliográficas	52
9. Apêndice	69
10. Currículo Lattes atualizado	72

1. Introdução

As leishmanioses são doenças parasitárias com uma ampla gama de manifestações clínicas, representando um importante problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Apresentam como agentes etiológicos parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, transmitidos por dípteros flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Das espécies da família, *Lu. longipalpis* destaca-se pela importância por ser considerado como principal transmissor da *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral, em áreas antropizadas rurais e periurbanas no Brasil, em todos os períodos do ano.

A facilidade de adaptação deste inseto a ambientes modificados e sua capacidade de infecção e transmissão de *Leishmania infantum chagasi*, faz de *Lu. longipalpis* o principal responsável pela doença nas regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste do Brasil. Esta capacidade vetorial associada a sua baixa capacidade de voo e isolamento geográfico característico figuram como características eco-etológicas tão distintas entre as populações brasileiras deste inseto, que geram interpretações conflitantes quanto ao seu real status taxonômico, levando alguns autores a discorrerem inclusive, sobre a existência de um complexo de espécies crípticas no Brasil. Neste caso, a forma mais apropriada para a resolução deste problema, parece ser o uso de ferramentas estatísticas robustas associadas a um eficiente marcador de especiação. Neste trabalho, ferramentas analíticas multi-metodológicas testaram entre outras coisas, os níveis de diversidade e estruturação genética presente em populações brasileiras de *Lu. longipalpis* usando como marcador um segmento de 525 pb do gene espécie-específico *period* (**per**), envolvido no ciclo circadiano do inseto.

2. Revisão da Literatura

2.1 Leishmaniose Visceral Americana

O agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA) no Continente Americano é a *Leishmania infantum chagasi*, cujo vetor principal é o díptero flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912). Na América Latina, a doença já foi registrada em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, concentrados especialmente nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Brasil-SVS/MS, 2011). A expansão da LVA no Brasil parece se dever, entre outros fatores, à ausência de políticas eficientes de controle, que são constantemente ignoradas pela falta de um maior entendimento sobre aspectos epidemiológicos importantes (Taylor *et al.*, 1999; Macleod *et al.*, 2000).

Com base na Resolução da Assembleia Mundial de Saúde 2007/60.13, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu o Comitê de Especialistas em Leishmanioses, que emitiu o primeiro relatório técnico atualizado sobre as leishmanioses em mais de 20 anos (OMS, 2012). Este relatório destacou a necessidade de se atualizar a base de evidências epidemiológicas, a fim de planejar abordagens apropriadas no controle da doença. A precisão das ações depende da fiabilidade de dados de incidência, duração, gravidade e mortalidade para uma dada condição, bem como os pressupostos básicos utilizados nos cálculos (Tibayrenc *et al.*, 1993; Bastien *et al.*, 1992). Apesar de atualmente um novo relatório estar em curso, a coleta de dados empíricos e validação de campo ainda não foram incluídos (OMS, 2012).

2.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos hematófagos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Esta subfamília é composta por seis gêneros, três dos quais são característicos do Velho Mundo [*Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*] e três são encontrados exclusivamente no Novo Mundo [*Warileyia*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia*] (Young and Duncan, 1994).

A família Psychodidae possui cerca de 2.900 espécies descritas, sendo uma das mais diversas da ordem Diptera. Encontra-se amplamente distribuída em todos os continentes, com exceção da Antártica, sendo encontrada sob diversas condições climáticas, altitudes e ambientes. Sua história evolutiva parece ter tido início do Mesozóico, sendo que os fósseis mais antigos conhecidos de psicodídeos pertencem à subfamília Phlebotominae (*Phlebotomites longifilis* e *Phlebotomites brevifilis*), datados do Cretáceo Inferior e descritos por Henning (1972) (Figura 1).



Figura 1. Flebotomíneo conservado em âmbar. Proveniente da Região neotropical e com datação do Cretáceo inferior. (Fonte: The virtual museum – <http://www.fossilmuseum.net>).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, onde as formas larvais diferem drasticamente dos indivíduos adultos. O ciclo de vida dos membros da subfamília Phlebotominae compreende os estágios de ovo, larva (quatro ínstaras), pupa e adulto, estendendo-se por um período que pode variar de 30 a 100 dias, a depender da espécie considerada e das condições ambientais verificadas durante o

desenvolvimento dos insetos. As posturas são efetuadas diretamente no solo, em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica em decomposição. Os ovos apresentam coloração variada, tendendo a adquirirem tonalidades mais escuras 24 horas após a sua deposição no solo. A eclosão dos ovos ocorre entre sete e dezessete dias após a postura, desde que as condições ambientais mantenham-se favoráveis (Young and Duncan, 1994).

2.3 *Lutzomyia longipalpis*

Lutzomyia longipalpis (Psychodidae: Phlebotominae), envolvido na manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral nas Américas, possui distribuição descontínua no Novo Mundo, habitando principalmente áreas de semiárido e de floresta tropical seca (Lainson and Rangel, 2005). A primeira descrição de *Lu. longipalpis* foi feita por Lutz e Neiva, em 1912, a partir de espécimes capturados nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

A observação da sobreposição das áreas de ocorrência e das áreas endêmicas de LVA na maior parte da América Latina reforçou a ideia inicial de distribuição descontínua que a incriminava como principal vetor da doença na região (Lainson and Rangel, 2005). A incriminação definitiva de *Lu. longipalpis* como principal transmissor de *Leishmania infantum chagasi* foi estabelecida quando cinco transmissões distintas para hamsters foram obtidas experimentalmente a partir da picada destes flebotomíneos (Lainson *et al.*, 1977).

No Brasil, *Lu. longipalpis* ocorre majoritariamente nas regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, em ecótopos silvestres e antropizados, nas zonas rurais e periurbanas e em qualquer período do ano (Lainson and Rangel, 2003). A baixa capacidade de voo, característica peculiar dos flebotomíneos, associada ao

isolamento geográfico, levaram alguns autores a discorrerem sobre a existência de um complexo de espécies crípticas no Brasil. (Bauzer, 2007; Silva, 2007).

2.4 *Lutzomyia longipalpis* pertence, de fato, a um complexo de espécies crípticas?

Sherlock and Sherlock (1961) foram os primeiros a sugerir que *Lutzomyia longipalpis* representaria um complexo de espécies, tomando como base a observação de variações em populações nordestinas quanto à capacidade de infecção e transmissão experimental de *Leishmania infantum chagasi*. Desde então, vários estudos com populações de *Lu. longipalpis* do Continente Americano vêm sendo desenvolvidos com o uso de diferentes ferramentas, visando definir o status taxonômico deste flebotomíneo (revisto por Bauzer *et al.* 2007).

Análises por microscopia eletrônica revelaram detalhes micromorfológicos de manchas encontradas nos tergitos abdominais de machos de *Lu. longipalpis*, indicando que se tratavam de numerosas pápulas com provável função secretora de feromônios (Lane & Ward, 1984). Lane *et al.* (1985) correlacionaram os diferentes feromônios isolados à quantidade de manchas que encontravam em cada população. Na década de 1990, a análise morfométrica mostrou-se uma ferramenta eficiente na taxonomia de flebotomíneos, complementando as observações morfológicas (Rangel *et al.* 1996).

Posteriormente, Bauzer *et al.* (2002), utilizando o gene *period* como marcador molecular, encontraram resultados que apontavam diferenças indicativas da existência de um complexo de espécies, uma vez que este gene controla o ritmo biológico e o som de corte, podendo levar as espécies ao isolamento reprodutivo. Bauzer *et al.* (2007) apresentaram uma nova revisão sobre este tema, discutindo

evidências favoráveis e contrárias ao complexo “*Lutzomyia longipalpis*”, neste trabalho, os autores consideram que as populações estudadas estariam passando por um processo de especiação recente. (Maingon *et al.* 2008).

2.5 Algoritmos evolutivos

Os Algoritmos Evolutivos (EA, do inglês *Evolutionary Algorithm*) são modelos computacionais dos processos naturais de evolução usados como ferramentas para a resolução de problemas. Apesar de haver uma grande variedade de modelos computacionais propostos, todos eles têm em comum o fato de buscar uma solução para um problema através da simulação da evolução das espécies usando mecanismos de seleção, mutação e reprodução similares àqueles encontrados na natureza (Alba *et al.*, 2004). Estes mecanismos, assim como os seus análogos naturais, dependem do desempenho dos indivíduos de uma espécie dentro do ambiente que a rodeia. Os EA funcionam mantendo uma população de estruturas (indivíduos), cada qual propondo uma determinada solução para um problema. Estas estruturas evoluem de forma semelhante àquela observada na natureza.

Os algoritmos evolutivos são usualmente aplicados para resolver um problema específico de caráter NP-completo (Mitchell, 1996). Sua relação com este problema é dada através da função de avaliação, a qual representa computacionalmente o problema, na forma de uma função a ser otimizada. Esta função é aplicada a cada indivíduo da população de estruturas mantida pelo EA e estes recebem uma avaliação que é uma quantificação numérica da sua qualidade como solução do problema. Esta avaliação é usada como a base do processo de seleção artificial mantido pelos EA. Quanto mais alta a avaliação do indivíduo, *mais apto* ele é

considerado e, conseqüentemente, maiores devem ser as suas chances de sobrevivência e reprodução (Batista *et al.*, 2004).

2.6. Algoritmos evolutivos associados aos algoritmos probabilísticos no estudo de complexos de espécies.

O ótimo desempenho dos algoritmos evolutivos na otimização computacional parece figurar como uma ferramenta eficiente no estudo dos complexos de espécies, principalmente quando associados aos algoritmos probabilísticos, cada vez mais empregados na avaliação de processos de especiação incipientes em que os polimorfismos genéticos não são abundantes (Excoffier *et al.*, 1992). Dentre os métodos probabilísticos mais utilizados na resolução de status taxonômicos divergentes, destacam-se os que se utilizam da máxima verossimilhança; constantemente utilizado em estudos de reconhecimento do status taxonômico de insetos vetores, como no caso do complexo *Anopheles albitarsis*, onde são descritas atualmente para o grupo quatro espécies crípticas (Lehr, 2005). Outros estudos também se valeram das topologias de máxima verossimilhança com o objetivo de elucidar questões conflitantes quanto ao real status taxonômico em espécies crípticas (Passamonti *et al.*, 2004; Wilkerson *et al.*, 2005).

Outro método comumente utilizado em estudos de estruturação populacional é o teste de atribuição genética, que se baseia em inferências bayesianas. Apesar de ainda não ter sido empregado para populações de *Lu. longipalpis*, este método é largamente utilizado com o objetivo de esclarecer a problemática taxonômica em espécies crípticas. Boyd (2007) aplicou esta metodologia com o intuito de determinar a composição dos membros do complexo de *Anopheles annulipes* em populações do Nordeste da Austrália, revelando a existência de pelo menos quatro

grupos populacionais simpátricos; outro exemplo do uso de inferências bayesianas é o emprego de testes de atribuição genética na estruturação do complexo *Culex pipiens*, que culminou no reconhecimento de três grupos bem definidos (Fonseca *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, os métodos de Análises de Variância Molecular [AMOVA] (Excoffier *et al.*, 1992) e o F_{ST} pareado Wright (1921) também se mostram eficientes no estudo da diversidade entre populações a partir de dados moleculares e na avaliação de hipóteses que suportem tal diferenciação. Estas análises consistem na estimativa de estruturação genética populacional da mesma maneira que as demais abordagens por variações nas frequências gênicas (Holsinger and Weir, 2009). As análises de F_{ST} pareado permitem classificações hierárquicas dos haplótipos e os remetem a permutações em três escalas distintas: entre populações entre os grupos (F_{ST}); entre populações dentro dos grupos (F_{SC}); e entre grupos (F_{CT}). Assim, O F_{ST} constitui uma metodologia clássica muito utilizada para medir os níveis de diferenciação entre subgrupos de uma população (Epperson, 2003) e para quantificar o efeito do cruzamento parental (*inbreeding*) na subestrutura de população, Wright (1921) definiu o que veio a ser chamado “*índice de fixação*”.

Este índice é frequentemente relacionado ao número de migrantes por geração, através das fórmulas $F_{ST} = 1 / 4Nm+1$ (para dados diploides) e $F_{ST} = 1 / 2Nm+1$ (para marcadores haploides), onde N corresponde ao tamanho efetivo da população e m corresponde a taxa de migração entre populações (Wright, 1921).

Dois exemplos da aplicação das análises de variância molecular e de distância genética baseadas em F_{ST} pareado, são descritos nos trabalhos de Mazzoni *et al.* (2006) e de Vigoder *et al.* (2010) que testaram respectivamente a hipótese de

ocorrência de introgressão entre *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani* e o grau de diferenciação entre as espécies *Lu. cruzi* e *Lu. longipalpis*.

Associado ao índice de F_{ST} pareado costuma-se usar o Teste de Mantel (1967). Esta metodologia testa a significância da correlação entre duas matrizes de similaridade (e.g. matriz pareada de índices F_{ST} e matriz de distância geográfica). Se Y é uma matriz de $n \times n$ medidas de distância genética, e X uma matriz de $n \times n$ medidas de distancia geográfica, entre combinações (i, j) de n populações, o teste de Mantel (M) é a soma dos produtos de elementos X_{ij} e Y_{ij} , exceto para os elementos da diagonal $i = j$ (Epperson, 2003). Desta forma, por definição, $M = \sum_{j=1}^i x_{ij} y_{ij}$. Para os elementos fora da diagonal, $SS(x)$ é a soma de desvios de X_{ij} de X e $SS(y)$ e a soma dos desvios de Y_{ij} . O produto destas somas constitui o coeficiente de correlação do teste de Mantel, assim definido pela correlação entre duas matrizes: $r_{xy} = M - n_{xy} / \sqrt{SS(x) \cdot SS(y)}$ (Smouse *et al.*, 1986).

2.7. Testes Usando a Teoria Neutra

Segundo Li (1997), a diferenciação tanto dentro como entre as populações também pode ser avaliada através da análise de mutações neutras, já que a maioria das substituições de bases que se tornam fixadas em uma população são seletivamente neutras, quando se trata do sucesso reprodutivo (*fitness*) (Kimura, 1968; 1983). Baseando-se no modelo de infinitos sítios sem recombinação, tem-se usado muito frequentemente o teste de neutralidade seletiva D de Tajima (Kimura, 1969), apropriado para sequências curtas de DNA. O teste D de Tajima calcula a diferença entre teta (θ) estimada do número de sítios segregantes (θ_s) e teta estimada a partir da média da divergência das sequências par a par (θ_p). A estatística D de Tajima é definida como: $D = \theta_p - \theta_s / \sqrt{var(\theta_p - \theta_s)}$ (Tajima, 1989).

Em condições de equilíbrio, a diferença entre as duas estimativas θ deve ser igual a zero, porque ambos os métodos para estimar θ devem ter o mesmo valor; se há desvios, o nível de significância deve ser testado por geração randômica de amostras sob a hipótese de neutralidade seletiva e equilíbrio populacional, usando um algoritmo de coalescência adaptado de Hudson (1990). Eventos como expansão populacional, efeito “gargalo de garrafa” ou heterogeneidade nas taxas de mutação podem gerar tais valores significativos (Tajima, 1993).

2.7.1. Teste de Homozigose de Ewens-Watterson

Este teste foi descrito por Watterson em 1978, tomando como base a teoria da amostragem para alelos neutros de Ewens (1972), que assume que a distribuição das frequências dos haplótipos seletivamente neutros podem ser convenientemente resumidas pela soma dos haplótipos (alelos) e suas frequências (F). Este teste mostra-se eficiente tanto em dados diploides quanto em dados haploides reservando-se ao fato de não gerar resultados estatísticos suficientemente seguros para uma interpretação biológica (Ewens, 1972).

A distribuição nula de F é gerada através da simulação de amostras aleatoriamente neutras com o mesmo número de genes ou haplótipos utilizando-se o algoritmo de Stewart (1977). A probabilidade de observar as amostras aleatórias com valores de F idênticos ou menores do que o amostral original é o que interessa neste tipo de abordagem. Este teste é atualmente limitado a tamanhos amostrais de 2.000 genes ou menos e 1000 haplótipos diferentes ou menos. Ele pode ser usado para testar a hipótese de neutralidade seletiva contra uma população ou testar a presença de alelos vantajosos (Watterson, 1978).

2.7.2. Expansão Espacial

A expansão espacial da população geralmente ocorre se ela é restrita a uma área muito pequena e o tamanho tende a aumentar ao longo do tempo. A população resultante torna-se geralmente subdividida no sentido de que os indivíduos tendem a escolher parceiros cada vez mais próximos geograficamente (Watterson, 1975).

Com base em simulações, Ray *et al* (2003) mostraram que uma grande expansão espacial pode conduzir ao mesmo tempo uma baixa na expansão demográfica em uma população panmítica. As simulações realizadas por Ray *et al.* (2003) foram realizadas em um modelo de gradação bidimensional onde um número de T gerações passadas restritas a uma única deme de tamanho N , começou a enviar demes migrantes vizinhas numa taxa m , progressivamente observou-se uma expansão demográfica exorbitante seguindo um ajuste na taxa intrínseca de crescimento r e durante todo o processo demes vizinhas continuaram a trocar uma fração m de migrantes (Ray *et al* 2003).

Embora este modelo seja difícil de descrever analiticamente, Excoffier (2004) derivou a distribuição esperada sob um modelo mais simples de expansão espacial, assumindo que se tenha amostrado genes de uma única deme ora pertencentes a uma população subdividida em um número infinito de demes, cada um de tamanho N , que trocam um m de demes migrantes. Este modelo chamado de infinita-ilha é, na verdade, o equivalente a um modelo continente-ilha, onde a deme amostrada troca migrantes na taxa m com uma única população de tamanho infinito algumas gerações T no passado (Figura 2).

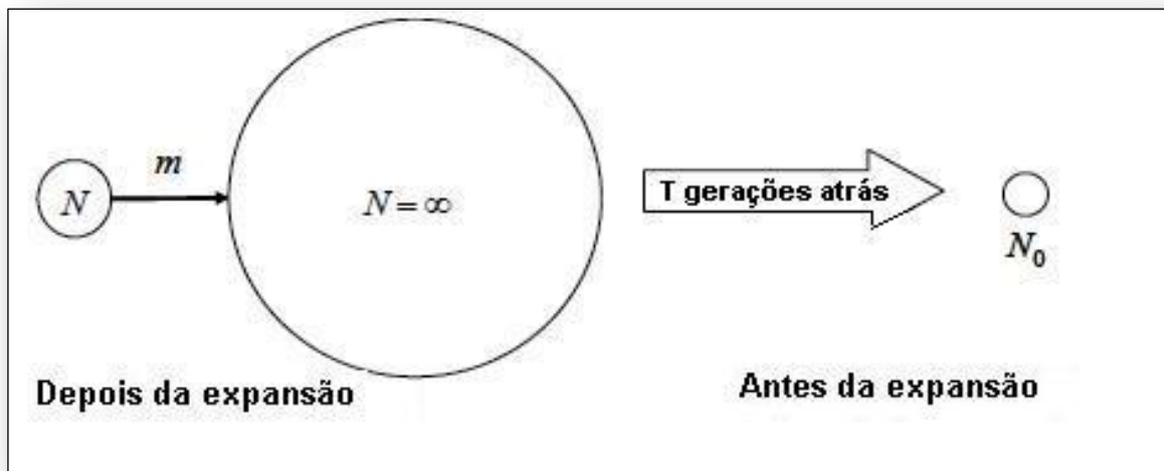


Figura 2. Representação gráfica da expansão espacial e sua relação com o número de migrantes em subpopulações vizinhas. (Fonte: Excoffier *et al.*, 2005).

2.8. Estrutura populacional inferida pela análise de variância molecular (AMOVA)

A estrutura genética das populações pode ser analisada por sua variância molecular. Inicialmente definida por Cockerham (1969; 1973), e estendido por Weir e Cockerham (1984), a Análise de Variância Molecular (AMOVA) é uma abordagem utilizada no *software* Arlequin (Excoffier *et al.* 1992) e é por definição a análise de variância é hierarquizada em componentes de covariância por suas diferenças intra e interindividuais ou intra e interpopulacionais (Weir, 1996). Os componentes de covariância σ_i^2 's são utilizados para calcular os índices de fixação, tal como originalmente definido por Wright (1951, 1965), em termos de coeficientes de endogamia, ou mais tarde, em termos de tempos de coalescentes por Slatkin (1991). Formalmente, no caso haplóide, assumimos que a *i*-ésima frequência haplotípica a partir da população de *j*-th no grupo *k*-th é uma equação linear da forma: $x_{ijk} = x + a_k + b_{jk} + c_{ijk}$, onde o vetor *x* é a expectativa de x_{ijk} desconhecido na média do conjunto estudado. Os efeitos de *a* para o grupo, *b* para a população e *c* para dentro de uma população de haplótipos de um grupo,

assumem fatores aditivos, aleatórios, independentes e componentes de covariância σ_a^2 , σ_b^2 e σ_c^2 respectivamente. A variância molecular total é a soma do componente de covariância devida à diferença entre haplótipos dentro de uma população. O mesmo raciocínio pode ser considerado para outros níveis hierárquicos, como para acomodar, por exemplo, o componente de covariância devido às diferenças entre haplótipos dentro indivíduos diplóides. Note-se que, no caso de uma estrutura hierárquica simples que consiste em indivíduos haplóides em populações, a forma de aplicação do algoritmo leva a um índice de fixação (F_{ST}) que é totalmente idêntico à da média ponderada das estatísticas F definida por Weir e Cockerham (1984). Em termos de coeficientes de endogamia e tempos de coalescência, este F_{ST} pode ser expresso como $F_{ST} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} = \frac{t_1 - t_0}{t_1}$, onde f_0 é a probabilidade de dois diferentes genes provenientes de uma mesma população serem idênticos por descendência, f_1 é a probabilidade de dois genes diferentes serem idênticos por descendência em populações diferentes, t_1 é o tempo médio de coalescência entre dois genes provenientes de duas populações diferentes, e t_0 é o tempo médio de coalescência de dois genes diferentes vindos de uma mesma população (Excoffier *et al.*, 1992). O pareamento por F_{ST} pode ser usado para se entender distâncias genéticas entre populações como aplicação de uma transformação ligeira e com tempo de divergência linear (Reynolds *et al.*, 1983). Os valores pareados de F_{ST} são dados na forma de matriz ressaltando a hipótese de que qualquer diferença entre as populações seja obtida permutando haplótipos entre as populações. O valor p do teste (p -value), que também é dado em forma de matriz, é a proporção de permutações que levam a um valor de F_{ST} maior ou igual ao observado (Slatkin, 1995).

2.9. Teste de Mantel

O teste de Mantel consiste em testar a significância da correlação entre duas ou mais matrizes por um procedimento de permutação que permite uma distribuição empírica nula no coeficiente de correlação, tendo em conta a correlação automática dos elementos da matriz (Mantel, 1967).

Em mais detalhes, o procedimento de teste prossegue como se segue. Primeiro, definem-se duas matrizes quadradas $X = \{ x_{ij} \}$ e $Y = \{ y_{ij} \}$ de dimensão N . Os elementos N^2 destas matrizes não são totalmente independentes porque existem apenas $N-1$ contrastes independentes em qualquer conjunto de dados (Cerioli, 2002). É por isso que no processo, a permutação dos elementos das matrizes não se dá de forma independente. Neste caso, a correlação das duas matrizes é

classicamente definida como: $r_{XY} = \frac{SP(X,Y)}{\sqrt{SS(X) \cdot SS(Y)}}$, onde r é a razão entre o

produto cruzado de X e Y sobre a raiz quadrada do produto das somas dos quadrados. Nota-se que o denominador da equação acima é insensível a permutação, de tal modo que somente o numerador será alterado mediante permuta de linhas e colunas. Pode-se então perceber que apenas a quantidade que vai realmente mudar entre as permutações é o produto de duas matrizes assinaladas

como $Z_{XY} = X * Y = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^i x_{ij} y_{ij}$ que é o único termo variável envolvido no

cálculo do produto cruzado. O procedimento de teste de Mantel aplicado a duas matrizes, então, consiste em calcular a quantidade Z_{XY} a partir das matrizes originais, permutar as linhas e colunas de uma matriz, mantendo a outra constante, e cada vez recalculando $*X_{YZ}$ comparando cada uma dessas vezes ao valor original de Z_{XY} (Guillot and Rousset, 2012).

2.10. A Escolha do marcador: o gene *period* (*per*) em estudos de complexos de espécies.

A escolha de um marcador molecular eficiente como os envolvidos no isolamento reprodutivo é particularmente interessante em estudos de especiação em insetos vetores. Em *Lu. longipalpis*, fragmentos de genes implicados no controle de características do som de corte, importante no isolamento sexual como o homólogo do *cacophony* de *Drosophila* e genes participantes do ciclo circadiano como *period* figuram como os mais utilizados (Kyriacou and Hall 1982, 1986, Ritchie *et al.* 1999). Neste trabalho usou-se como marcador o gene *period* que em *Drosophila melanogaster* e espécies afins participam da ritmicidade dos sons de corte (Kyriacou and Hall 1980, Demetriades *et al.* 1999). Estes ritmos são espécie-específicos e aparentemente são utilizados pelas fêmeas para reconhecer indivíduos da mesma espécie (Kyriacou and Hall 1982, 1986, Ritchie *et al.* 1999).

Como os controles por diferenças de ritmos parecem contribuir para o isolamento reprodutivo entre os grupos, o gene *period* pode ser considerado como um "gene de especiação" (Coyne, 1992). A proteína codificada por *period* (*per*) é um autorregulador do seu próprio gene, além de regular o gene *timeless* (*tim*), estando ambas associadas ao ciclo de feedback negativo, que é central para a determinação da ritmicidade circadiana (Hall, 2003). O gene *per* codifica uma proteína de aproximadamente 1200 aminoácidos (Citri *et al.*, 1987), apresentando duas regiões de grande importância: o domínio PAS, que corresponde ao domínio de dimerização localizado em uma região conservada (Hoffman *et al.*, 1991; Colot *et al.*, 1988); e uma região não conservada, que apresenta repetições dos aminoácidos treonina e glicina, conhecida como região Thr-Gly (Colot *et al.*, 1988).

Trabalhos envolvendo o gene *period* como marcador para testes de divergência foram iniciados por Peixoto *et al.* (2002b) e Bauzer (2002); em 2006, Mazzoni *et al.* (2006) estudaram a variação deste gene em cinco diferentes populações de *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani*, encontrando haplótipos “típicos” de uma espécie em indivíduos de outra espécie, sugerindo a ocorrência de introgressão ou a persistência de polimorfismos ancestrais. Nestes trabalhos e nos seguintes apenas uma região com 266 pb deste marcador foi utilizada em inferências genético-populacionais e de filogenia. Este fragmento se localiza entre o domínio PAS e a região Thr-Gly (Zheng *et al.*, 1999), e engloba quase que completamente o domínio de localização citoplasmática (CLD), além de possuir um íntron de 54 pb (Bauzer *et al.*, 2002a) (Figura 3).

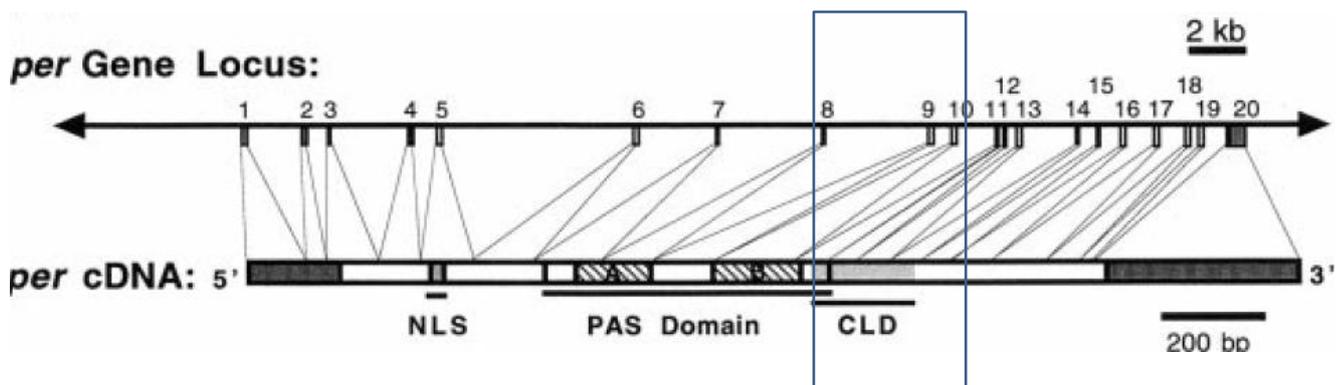


Figura 3. Estrutura genômica do gene “*period*” em *D. melanogaster* com seus 20 éxons. Em destaque região utilizada em estudos genético-populacionais. (Fonte: Gotter *et al.*, 1999).

Este mesmo fragmento também tem sido utilizado por outros autores empregando métodos alternativos como F_{ST} , AMOVA e rede de haplótipos na tentativa de resolver questões taxonomicamente contraditórias em *Lu. longipalpis* mas os resultados até o momento apresentam inconsistências (Araki *et al.*, 2009;

Bauzer, 2002b). Estas inconsistências talvez se devam ao tamanho limitado do fragmento (266 pb) até então utilizado em outros trabalhos (Bauzer *et al.*, 2002 a) e neste caso, a utilização de um fragmento maior como o utilizado em nosso trabalho com 525pb, em associação com ferramentas analíticas intensivas figure como uma alternativa na determinação da diversidade e estruturação genética das populações nordestinas de *Lu. longipalpis*, bem como forneçam subsídios para uma extrapolação acerca do real status taxonômico deste inseto vetor no Brasil.

3. Objetivos

3.1 Geral

- Avaliar os níveis de diversidade genética entre populações naturais de *Lutzomyia longipalpis* de duas localidades do Estado do Ceará, por aplicação de Metodologias analíticas múltiplas visando contribuir no reconhecimento do *status* taxonômico desta espécie no país.

3.2 Específicos

- Aplicar metodologias de análise que viabilizem a investigação dos padrões de variabilidade genética do gene *period*, argumentando acerca do significado evolutivo das variações encontradas;
- Correlacionar os padrões de diferenciação genética e distância geográficas observados entre as populações de *Lu. longipalpis*, visando identificar eventuais inconsistências que possam estar relacionadas à existência de processos incipientes de especiação;
- Implantação de uma plataforma multi-metodológica que forneça subsídios para o entendimento do real *status* taxonômico de populações brasileiras de *Lu. longipalpis*.

4. Material e Métodos

4.1. Conjunto de dados

Os 118 espécimes de *Lu. longipalpis* analisados neste trabalho foram coletados entre setembro de 2008 e agosto de 2009 nas localidades cearenses de Caririçu (07°02'31"S / 39°17'02"W; área: 637,4 Km²; altitude média: 715 m) e Sobral (3°41'15"S / 40°21'5"W; área: 2.122,9 Km²; altitude média: 69 m), ambas inseridas no bioma de caatinga (Figura 4). As capturas tiveram duração de três dias consecutivos e foram realizadas com armadilhas luminosas do tipo CDC. Em seguida, com o auxílio de estereomicroscópio, os espécimes de *Lu. longipalpis* foram separados quanto ao sexo e quanto ao número de pintas tergitais (uma ou duas pintas, aqui denominados de 1S e 2S, respectivamente).



Figura 4: Pontos de coleta dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* (1S e 2S). Sobral, Ceará (03°40'57.89"S, 40°21'4.20"O) e Caririçu, Ceará (07° 02' 32" S, 39° 17' 01" O). (Fonte: EMBRAPA).

A extração do DNA foi realizada segundo um protocolo padronizado à base do uso de Chelex 5%, que consistiu nas seguintes etapas: 1) maceração da amostra

em tubos plásticos contendo 100µl de Chelex® (Bio-Rad-Richmond, California, USA); 2) incubação das amostras a 55°C por uma hora e à 94°C por 30 minutos; 3) centrifugação a 13.000 rpm por seis minutos; e 4) recuperação e estocagem do sobrenadante a -4°C.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (GE Healthcare Life Sciences, Detroit, USA) e utilizado para a amplificação do marcador *period* com os *primers* *FW1* (5' AGCATCCTTTTGTAGCAAAC 3') e *RW1* (5' TCAGATGAACTCTTGCTGTC 3'), descritos por Mazzoni *et al.* (2006). Após a eletroforese, os produtos de amplificação (36 Sobral 1S – SOB1S; 23 Sobral 2S – SOB2S; 28 Caririaçu 1S – CAR1S; e 31 Caririaçu 2S – CAR2S) foram visualizados em gel de agarose a 1%. A purificação dos amplicons foi realizada com o Kit *Wizard*® Genomic DNA Purification (*Promega Corporation*, Madison, USA). O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado com o kit BigDye 3.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA), no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz/PE) e no Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Os cromatogramas gerados foram analisados com o programa Staden v. 1.6 (Staden, 1996). A especificidade das reações de sequenciamento foi confirmada pelo Blast (Altschul *et al.*, 1990).

4.2. Análises de estruturação genética

Os estimadores de F_{ST} pareado foram obtidos com o *software* Arlequin v. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005) utilizando-se 1000 permutações aleatórias. A matriz de F_{ST} gerada foi usada na construção de um dendrograma baseado no método de distância UPGMA com o *software* MEGA v. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). As matrizes de F_{ST} e de distância geográfica foram comparadas pelo Teste de Mantel (Mantel,

1967) utilizando o programa Multivar-Mantel for Windows v. 1.19 (Liedloff, 1999) com 1000 permutações aleatórias. As variáveis usadas na construção da matriz geográfica foram as distâncias lineares em quilômetros entre os morfotipos 1S das duas localidades estudadas, somando-se um quilômetro para os indivíduos dos morfotipos 2S de cada uma delas. A rede de haplótipos foi inferida mediante o método de median-joining network (Bandelt *et al.*, 1999), utilizando o programa Network v. 4.5 (<http://fluxus.engineering.com/sharenet.htm>).

As interpretações filogeográficas foram feitas com testes de expansão demográfica e espacial usando o *software* Arlequin v. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). A estruturação populacional foi averiguada utilizando-se AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), que se baseia na avaliação de diferentes grupos hierárquicos. A estruturação genética das populações de *Lu. longipalpis* foi verificada com o programa Structure v. 2.3 (Pritchard, 2000), que se baseia num algoritmo de agrupamento bayesiano que estima a probabilidade de um indivíduo pertencer a uma dada população. Foram descartadas as 20.000 interações iniciais, seguidas por 200.000 interações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), repetindo este procedimento para cada número de populações K , ajustado de 1 a 10. Para determinar o número de grupos K mais provável foi utilizada a quantidade *ad hoc* ΔK (Evanno *et al.*, 2005).

4.3. Análises filogenéticas

Para as análises filogenéticas foram utilizadas as sequências nucleotídicas previamente descritas. As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa MEGA v.4 (Tamura *et al.*, 2007) e o teste de sinal filogenético foi realizado com o programa TREE-PUZZLE v. 5.2 (Schmidt, 2002). A escolha do melhor modelo evolutivo foi realizada com o *software* jModelTest v 0.1.1 (Posada, 2008). Árvores

de máxima verossimilhança foram geradas com o programa PhyML v. 3.0 (Guindon and Gascuel, 2003), enquanto que a avaliação da consistência dos ramos foi realizada com teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudo-replicações.

5. Resultados

5.1. Propriedades gerais das sequências de segmentos do gene *period* (per) de *Lu. longipalpis*

Foram analisadas 118 sequências de um segmento do gene *period* que atenderam os critérios de qualidade definidos na seção Material e Métodos (525 pb de extensão e valores de Phred ≥ 40). A análise das sequências dos quatro morfotipos (SOB1S, SOB2S, CAR1S e CAR2S) revelou a presença de 51 sítios polimórficos (Figura 5), sendo os morfotipos SOB1S e CAR1S os mais variáveis (Tabela 1; Anexo I). O morfotipo SOB1S apresentou o maior número de sítios polimórficos e, por este motivo, foi escolhido para representar a matriz que relacionou a quantidade de polimorfismos com os valores das distâncias genéticas obtidas (Figura 6). Dados semelhantes foram produzidos para os outros morfotipos e podem ser visualizados no Anexo II.

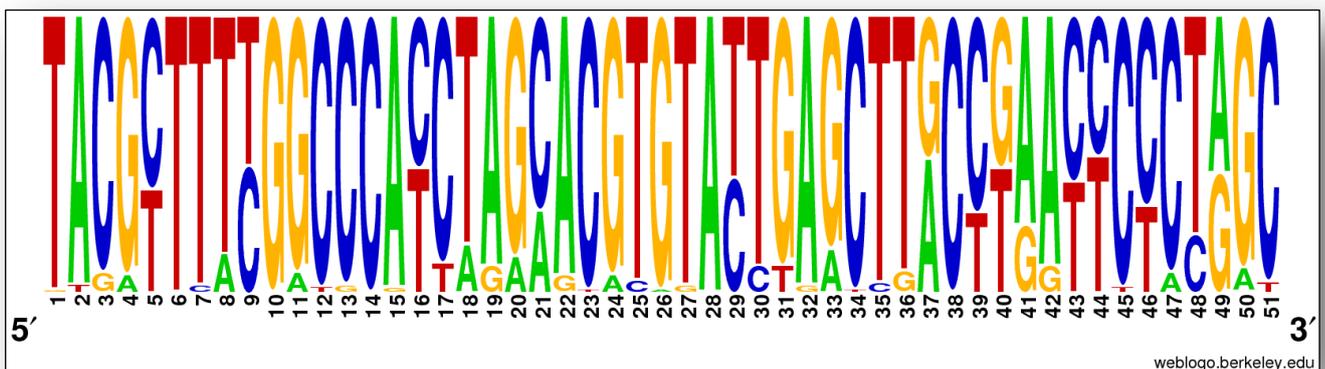


Figura 5: Representação gráfica de 51 sítios variáveis de um segmento do gene *period* de *Lu. longipalpis* entre os morfotipos 1S e 2S dos municípios de Sobral (SOB1S e SOB2S) e Caririáçu (CAR1S e CAR2S). O tamanho de cada nucleotídeo é proporcional à sua frequência para os determinados sítios. O logo foi construído com o programa WEBLOGO 3. (Crooks *et al.*, 2004).

Tabela 1. Características gerais de 118 sequências de um segmento de 525 pb do gene *period* de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* dos municípios de Sobral e Caririáçu, Ceará, Brasil.

	SOB1S	SOB2S	CAR1S	CAR2S	Média
Sequências	36	23	28	31	29,5
Número de sítios polimórficos	34	20	31	21	26,5
Sítios informativos de parcimônia	30	16	20	13	19,7

SOB1S = Sobral 1S; SOB2S = Sobral 2S; CAR1S = Caririáçu 1S; CAR2S = Caririáçu 2S.

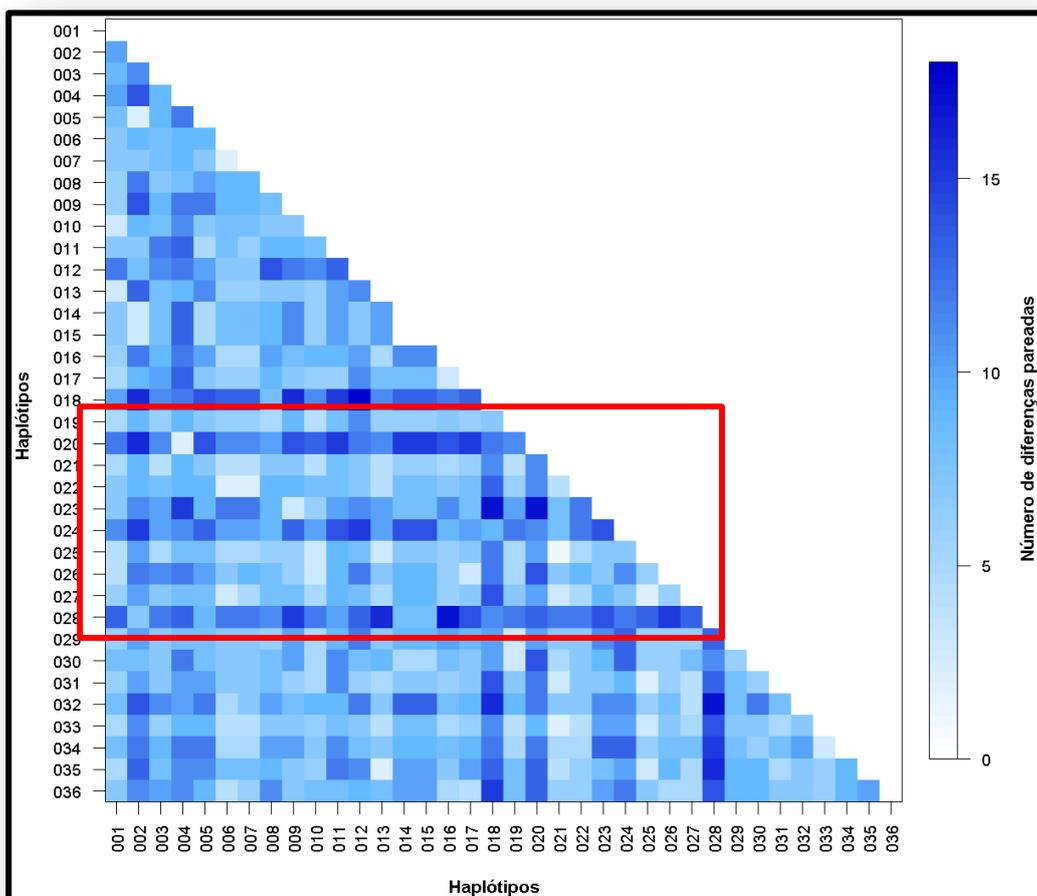


Figura 6. Matriz de distancia inter-haplótipica e número de sítios polimórficos encontrados no morfotipo Sobral 1S. Em destaque haplótipos com maior distância. *Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do *software* Arlequin versão 3.5.1.2.

5.2. Análises de Distância Genética

As análises baseadas nos valores de F_{ST} confirmaram a presença de duas entidades genéticas distintas (1S e 2S em ambas as localidades), com um componente de variação maior que 40% e com valor de p menor que 0,05. Já entre morfotipos idênticos provenientes de localidades distintas, as variações encontradas foram mínimas ($F_{ST} = 0,02$, entre SOB1S X CAR1S; $F_{ST} = 0$, para SOB2S X CAR2S) e estatisticamente não significativas, evidenciando a elevada similaridade genética entre indivíduos que exibem o mesmo morfotipo (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de F_{ST} pareado para os morfotipos de *Lu. longipalpis* das localidades de Sobral e Caririáçu, Ceará, Brasil.

Populações	SOB1S	SOB2S	CAR1S	CAR2S
SOB1S	-			
SOB2S	0,48	-		
CAR1S	0,02	0,52	-	
CAR2S	0,47	0,00	0,51	-

SOB1S = Sobral 1S; SOB2S = Sobral 2S; CAR1S = Caririáçu 1S; CAR2S = Caririáçu 2S

As variações de F_{ST} foram utilizadas na elaboração de uma matriz gráfica de distância genética que pareou os haplótipos em grupos definidos pela intensidade da cor azul (do claro ao escuro, do menor para o maior valor de F_{ST} , respectivamente). O uso dessa matriz ajudou no reconhecimento do grau de

similaridade entre morfotipos semelhantes de localidades distintas – azul mais suave (SOB1S e CAR1S; SOB2S e CAR2S) e entre morfotipos distintos – azul mais intenso (CAR1S x SOB2S; CAR2S x SOB 1S; CAR1S x CAR2S; SOB1S e SOB2S), independentemente das suas localidades de origem (Figura 7).

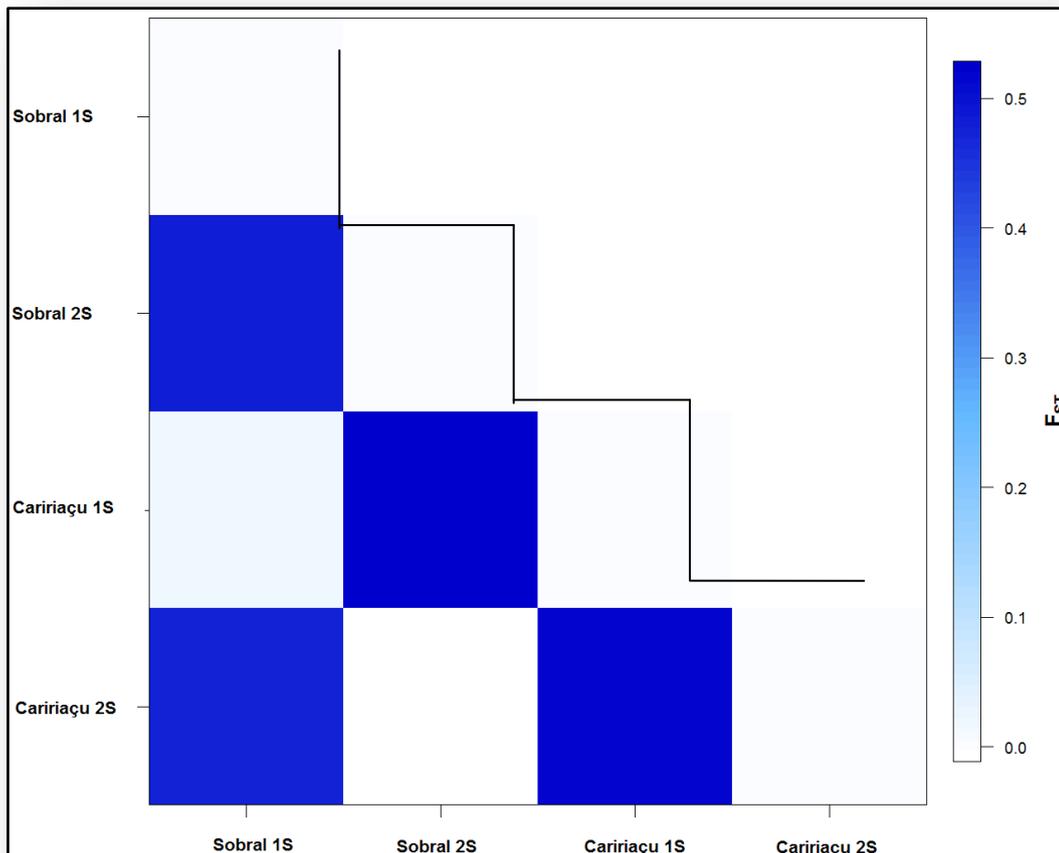


Figura 7. Matriz de distância genética baseada no F_{ST} entre os morfotipos 1S e 2S Sobral-CE e 1S e 2S das localidades de Sobral e Carriáçu, Ceará, Brasil. * Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do *software* Arlequin versão 3.5.1.2.

Os mesmos padrões de divergência também foram obtidos quando se empregaram métodos menos robustos de pareamento filogenético (e.g. UPGMA), refletindo a total separação dos haplótipos em dois táxons distintos (1S e 2S). Com a utilização deste método foi possível identificar variantes geográficos (SOB2S e CAR2S) que possuíam menor distância genética (Figura 8). Ainda com o método

UPGMA, foi possível relacionar os 118 haplótipos a dois táxons distintos, correspondentes aos morfotipos 1S (64 haplótipos) e 2S (54 haplótipos), não tendo se observado o compartilhamento de haplótipos entre os grupos (Figura 9).

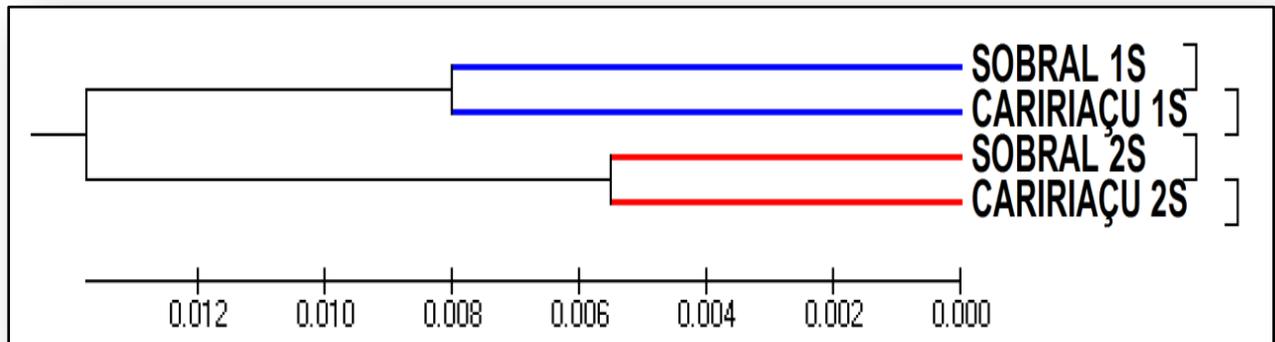


Figura 8. Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir de matrizes de F_{ST} com os 118 haplótipos que compuseram os morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Caririáçu 1S e Caririáçu 2S de *Lu.longipalpis* das localidades de Sobral e Caririáçu, Ceará, Brasil.

5.3. Análises de estruturação genética

Para os testes de estruturação genética das populações de *Lu. longipalpis*, o programa Structure indicou o número mais apropriado de populações como sendo $K = 2$, apoiado pelo valor de Δk e confirmado pela probabilidade *a posteriori*. Sucessivos aumentos em K não conseguiram separar os dois principais agrupamentos em grupos adicionais, confirmando a presença de apenas duas entidades genéticas distintas (1S e 2S). Esta informação também foi sustentada pela constatação da ausência de haplótipos compartilhados (Figura 9) e pela baixa probabilidade de parentesco ($< 20\%$) entre haplótipos de morfotipos diferentes (Figura 10).

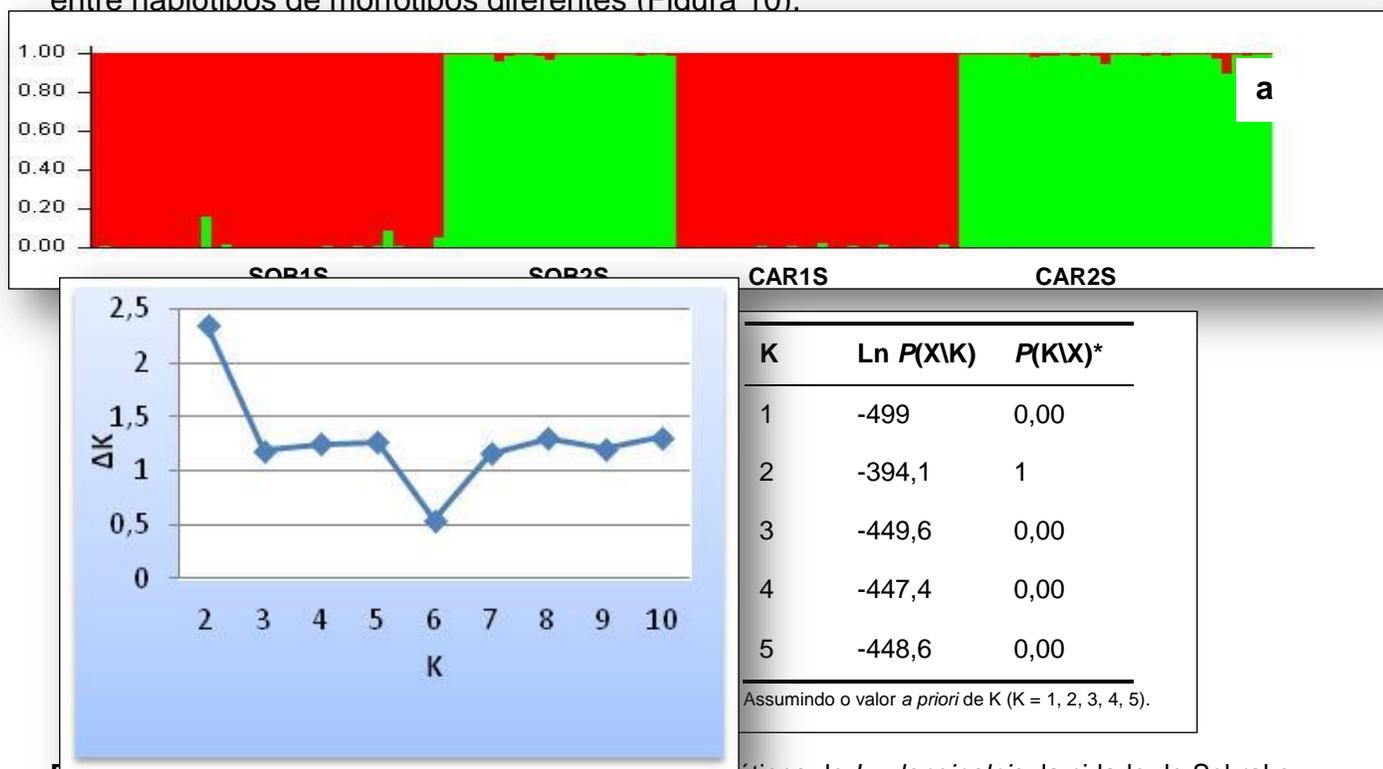


Figura 10. Estrutura genética da população com 110 haplótipos de *Lu. longipalpis* da cidade de Sobral e Caririçu, Ceará, Brasil. (a) Distribuição de Q de cada indivíduo para cada grupo. Cada indivíduo é representado por uma única linha vertical dividida em K cores, o tamanho do segmento colorido indica o grau de parentesco de cada indivíduo àquele grupo. (b) Estimativa do número de populações apropriado de acordo com Evanno *et al.* (2005). (c) Probabilidades *a posteriori* estimadas de K, para as localidades de Sobral e Caririçu-CE

5.4. Análises Filogenéticas e Genético-populacionais

5.4.1. Filogenia dos morfotipos 1S e 2S

Os mapas de máxima verossimilhança constataram a presença de sinal filogenético para todos os conjuntos de dados nos quatro morfotipos, apresentando mais de 70% dos quartetos resolvidos (dados não mostrados). O modelo evolutivo *GTR+I+G* foi o que melhor representou as diferenças entre os morfotipos 1S e 2S, com um valor de *bootstrap* significativo (57%) suportando a separação dos clados (Figura 11) e a total separação existente entre os morfotipos SOB1S e SOB2S (Figura 12) e CAR1S e CAR2S (Figura 13). Em todos os mapas de verossimilhança, sequências do gene *period* de *Lutzomyia cruzi*, *Drosophila melanogaster*, *D. mauritana* e *D. simulans*, usados como grupos externos, garantiram o enraizamento parcimonioso do conjunto de dados analisado neste trabalho.

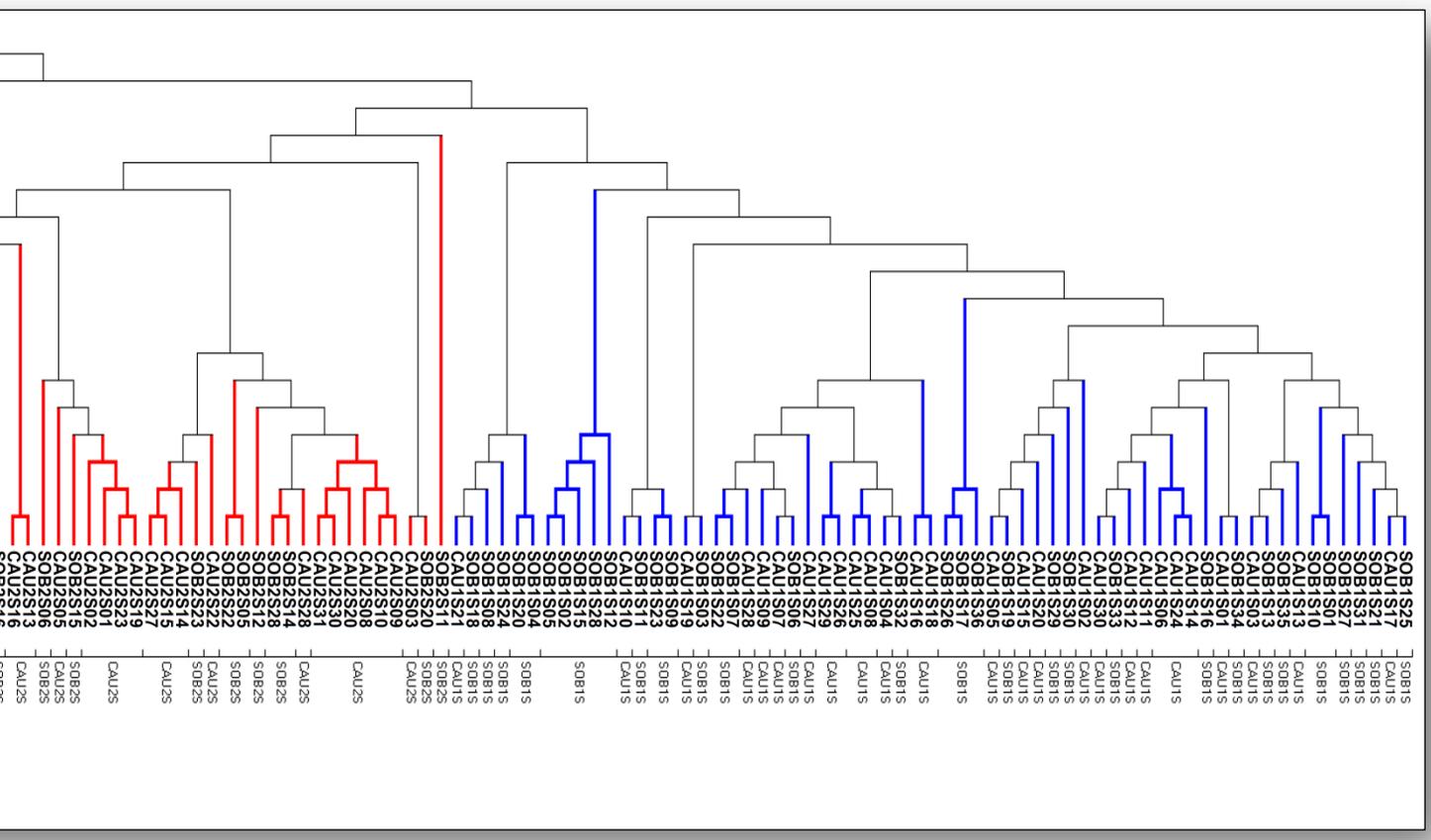


Figura 11: Árvore de máxima verossimilhança observada para a população de Sobral e Carriaguá, Ceará, Brasil., baseada no modelo evolutivo GTR+I+G. Nota-se que esta topologia conseguiu agrupar os morfotipos em dois clados distintos 1S em azul e 2S em vermelho. A árvore foi entalçada com quatro grupos externos diferentes para obter melhor polarização.

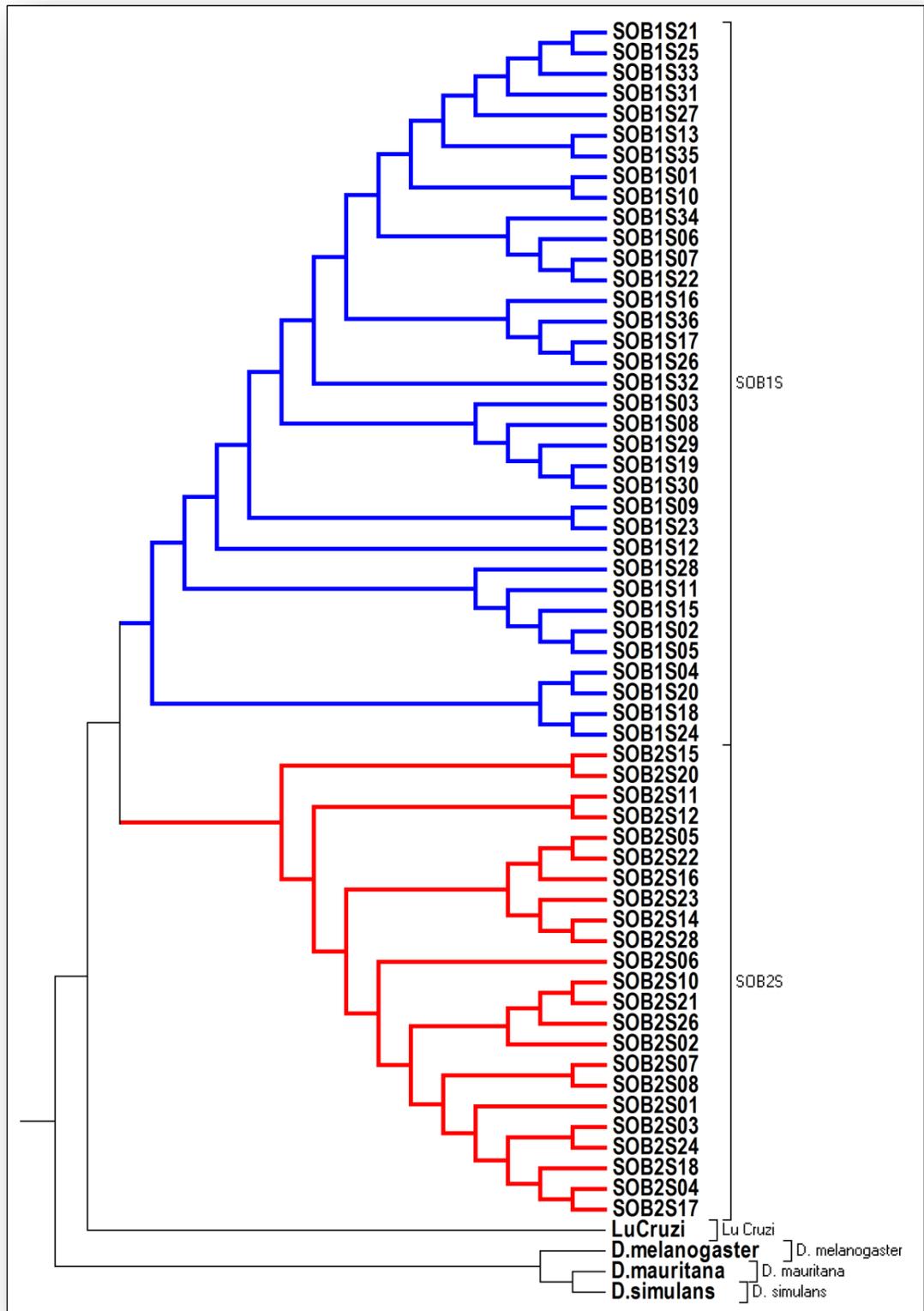


Figura 12: Árvore de máxima verossimilhança observada para as populações de Sobral, Ceará, Brasil, baseada no modelo evolutivo GTR+I+G. Nota-se que esta topologia conseguiu agrupar os morfotipos em dois cladros distintos 1S em azul e 2S em vermelho. A árvore foi enraizada com quatro grupos externos diferentes para obter melhor polarização da mesma.

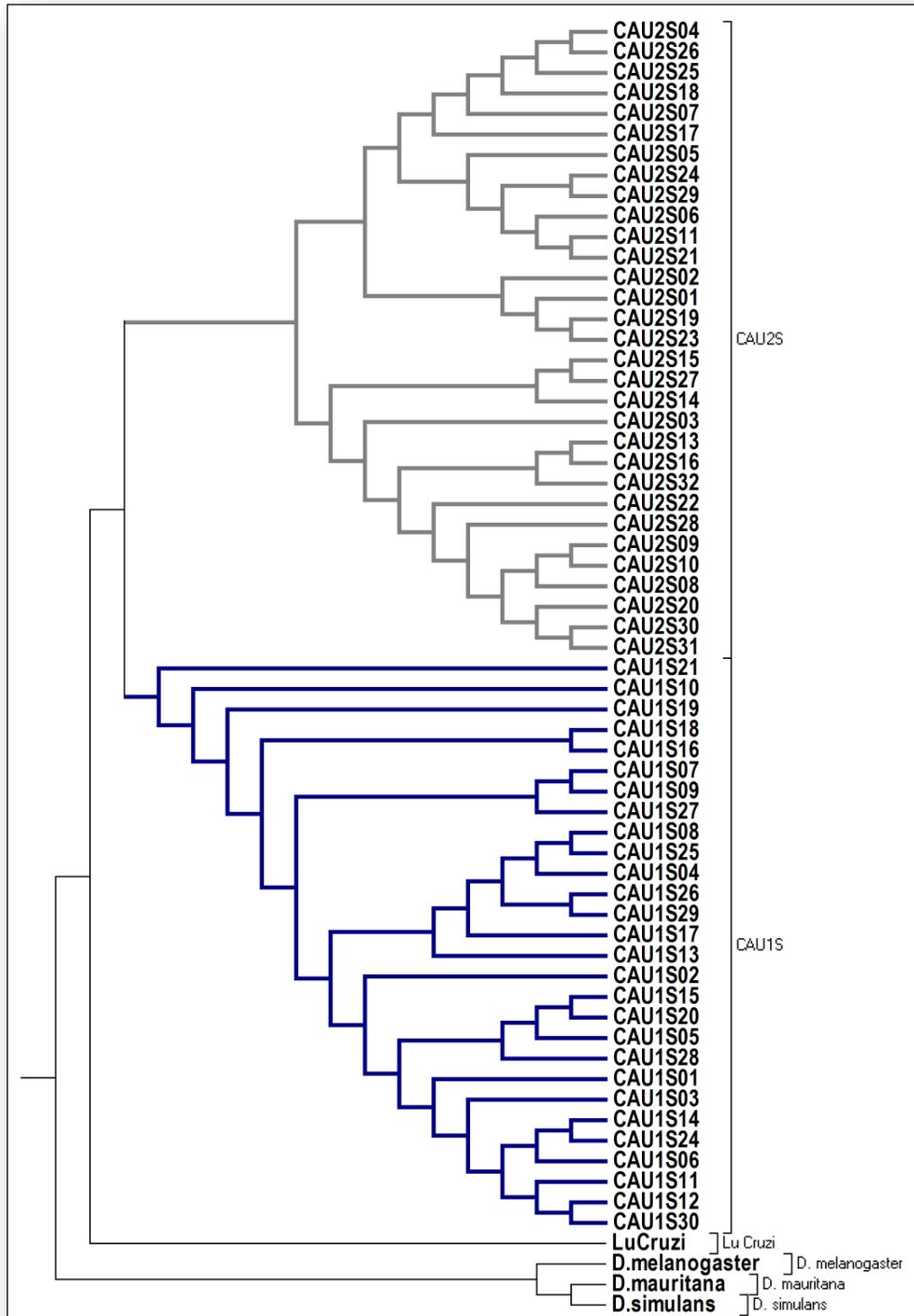


Figura 13: Árvore de máxima verossimilhança para as populações de Carinaçu, Ceará, baseada no modelo evolutivo GTR+I+G.

5.4.2. Análise de variância Molecular (AMOVA)

As análises de variação molecular das sequências do gene *period* de *Lu. longipalpis* revelaram valores de F_{ST} bastante significativos ($F_{ST} = 0,40$) quando subdivididos em seus quatro morfotipos (SOB1S, SOB2S, CAR1S, CAR2S) e ainda mais significativos ($F_{ST} = 0,599$) quanto às suas diferenças internas (Tabela 3). Foi detectada ainda a existência de três outros níveis de significância no conjunto de dados analisados: moderado, como o encontrado na relação entre os morfotipos de SOB1S e CAR1S; com significância mínima (SOB2S); e com significância nula, como o encontrado no morfotipo CAR2S (Figura 14). As variações de F_{ST} relacionadas à ancestralidade dos grupos revelaram um tempo menor de divergência para os morfotipos SOB1S e CAR1S, suportado pela análise de *mismatch* da distribuição observada ($\tau = 8,51$), com taxas de mutação constantes entre as localidades (Figura 15).

Tabela 3: Análise de Variância Molecular, aplicando-se o F_{ST} de Wright (1969), para as 118 sequências do fragmento de 525 pb do gene *period* de *Lu. longipalpis* provenientes das localidades de Sobral e Caririaçu, Ceará, Brasil.

Fonte da Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variância
Inter e Intrapopulacionais	3	216,7	2,3	40,0
Intrapopulacionais	114	401,3	3,5	59,9
Total	117	890,3	4,3	

FST: 0.40025 *p < 0.05

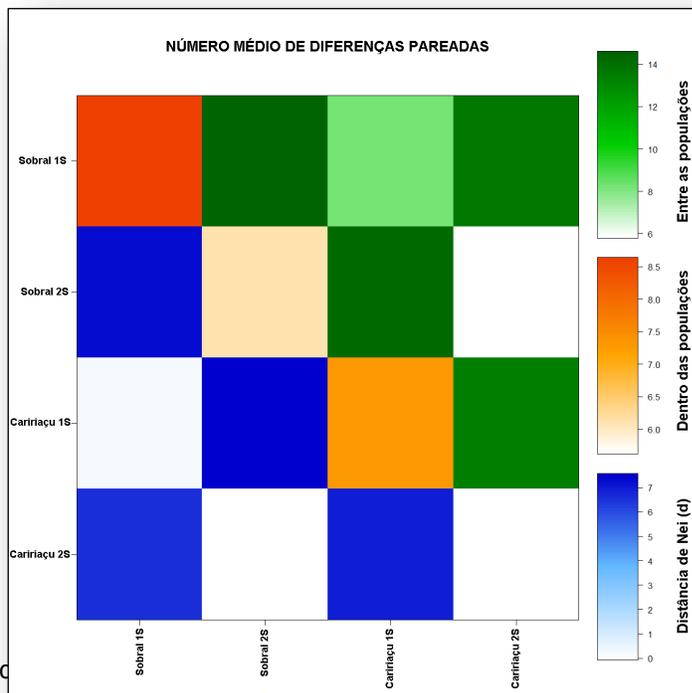


Figura 14. Matriz de diferenças genéticas entre os grupos; dentro dos grupos; e distância de Nei para os morfotipos 1S e 2S das localidades de Sobral e Caririáçu, Ceará, Brasil.

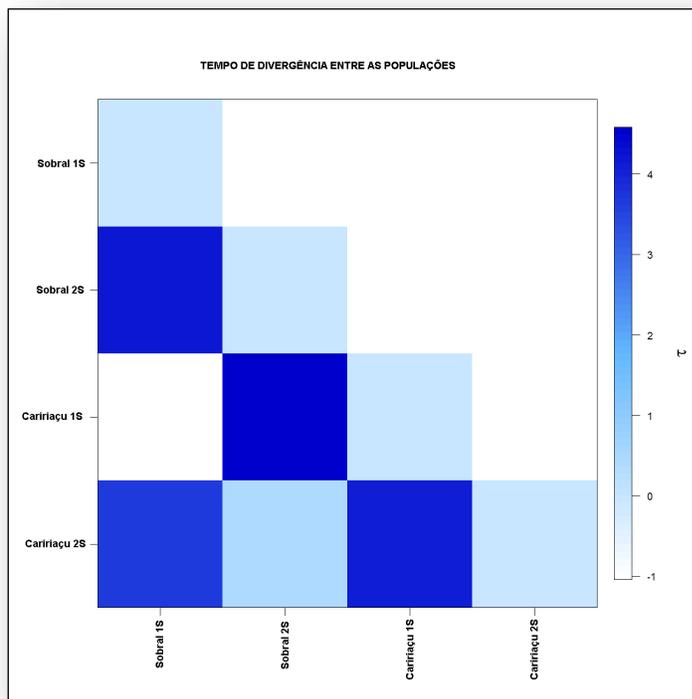


Figura 15. Matriz de tempo de divergência entre as populações. Em evidência o elevado valor τ presente entre os morfotipos 1S e 2S das localidades de Sobral e Caririáçu, Ceará, Brasil. * Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do software Arlequin versão 3.5.1.2.

5.4.3. Correlação entre expansão demográfica e espacial

O teste de Mantel não detectou correlação significativa entre as matrizes de F_{ST} e de distância geográfica ($r = 0,64$ – não significativo com $p = 0,07$), comprovando que a distância genética entre os morfotipos não está relacionada ao aumento da distância geográfica entre as localidades (Figura 16; Tabela 4). As curvas de expansão demográfica e espacial foram similares, uni ou bimodais e assimetricamente positivas em relação aos valores centrais. A sobreposição das curvas de expansão demográfica sobre as de expansão espacial sinalizam para a possível ocorrência de eventos de expansão não atuais e súbitos, em um primeiro cenário temporal com o morfotipo 2S (maior estruturação) e em um segundo cenário com o morfotipo 1S (menor estruturação) (Figura 17). A rede de haplótipos (Figura 18) também suporta esta afirmação, já que o maior número de haplótipos compartilhados é encontrado no morfotipo 1S (nove haplótipos), inclusive, com um haplótipo intermediário entre os morfotipos 1S e 2S, podendo ser considerado um elo entre eles (Figura 18).

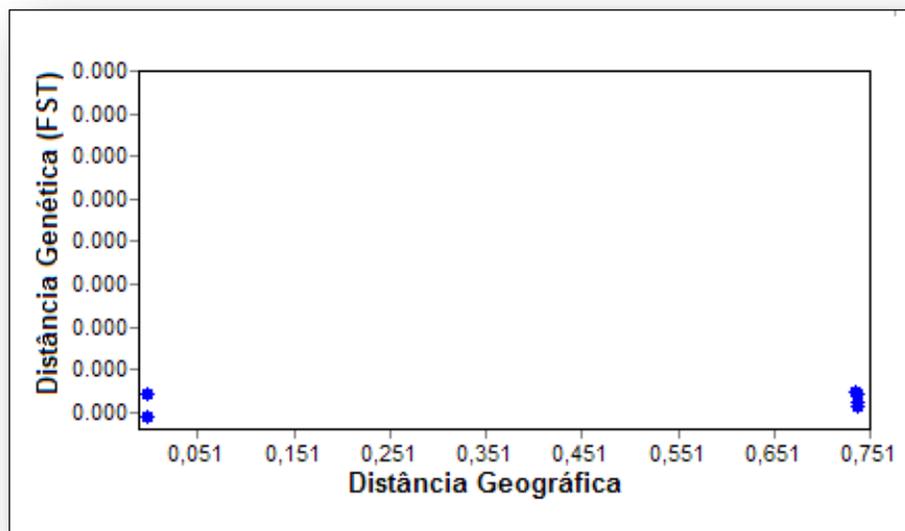


Figura 16. Teste de Mantel gerado com as matrizes de F_{ST} e Matriz geográfica. No eixo horizontal, valores que representam a distância geográfica em quilômetros e os valores de F_{ST} entre os morfotipos.

Tabela 4. Distâncias geográfica (km) e genética (F_{ST}) entre os morfotipos de *Lu. longipalpis* nas localidades Sobral e Caririaçu, Ceará, Brasil. Na diagonal superior os valores da distância genética (F_{ST}) entre os morfotipos e na diagonal inferior os valores da distância geográfica (Km).

Distância geográfica	SOB1S	SOB2S	CAR1S	CAR2S	Distância genética
SOB1S	-	0.48	0.02	0.47	SOB1S
SOB2S	0.00	-	0.52	0.00	SOB2S
CAR1S	0.73	0.73	-	0.51	CAR1S
CAR2S	0.74	0.73	0.00	-	CAR2S

SOB1S = Sobral 1S; SOB2S = Sobral 2S; CAR1S = Caririaçu 1S; CAR2S = Caririaçu 2S. Fonte: O autor (2013)

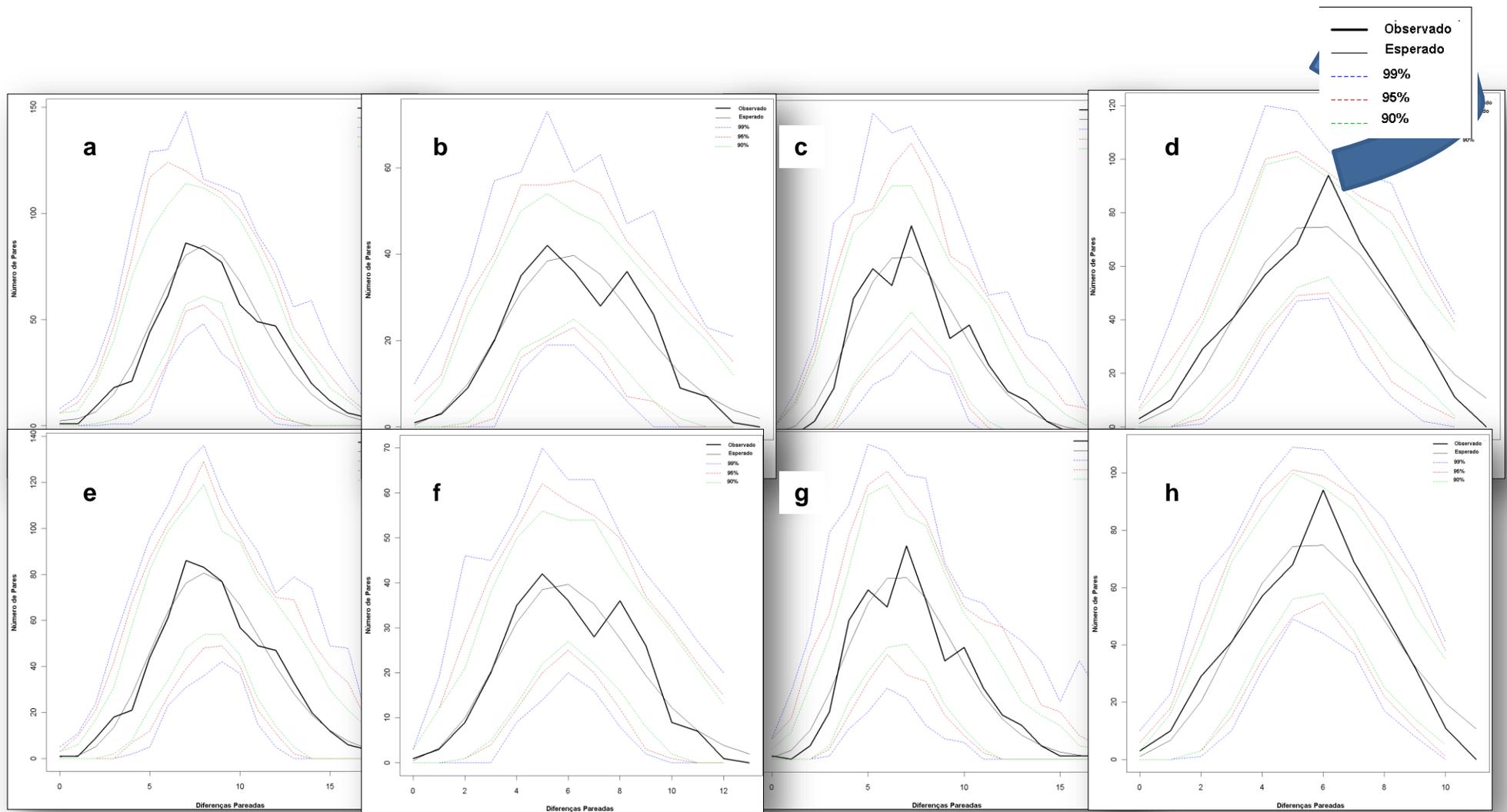


Figura 17. Comparação entre a Expansão Demográfica e Espacial de *Lu. longipalpis*. **(a-d)** Gráficos de expansão demográfica dos morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Carriáçu 1S e Carriáçu 2S, respectivamente; **(e-h)** Gráficos de expansão espacial dos morfotipos Sobral 1S, Sobral 2S, Carriáçu 1S e Carriáçu 2S, respectivamente. *Gráfico Gerado pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do *software* Arlequin versão 3.5.1.2.

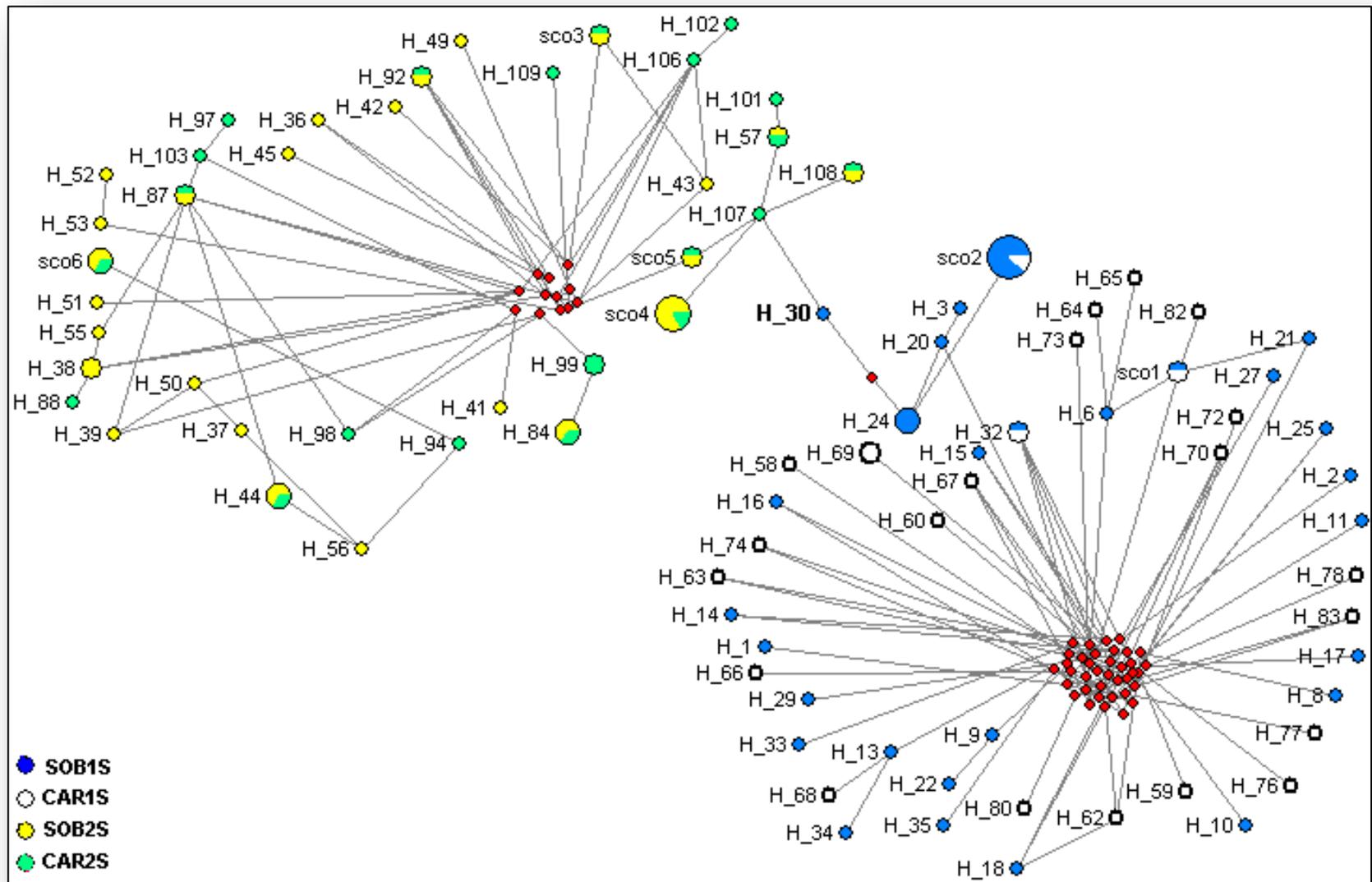


Figura 18. Rede de haplótipos *median-joining*, com as sequências dos morfotipos 1S e 2S de *Lu. longipalpis* das localidades de Sobral e Caririáçu, Ceará, Brasil. Cada círculo compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à sua frequência. Haplótipos com mesma frequência dividem o mesmo círculo em cores diferentes. Pontos vermelhos são haplótipos perdidos (*median vectors*).

5.4.4. Análises da diversidade molecular

As análises de diversidade molecular estimadas por θ refletiram um nível de relativamente baixo de diversidade haplotípica para os morfotipos SOB2S e CAR2S, com valores de θ_S e θ_π similares.

A correlação existente entre os valores θ e a diversidade haplotípica ressaltaram um padrão de ancestralidade com menor tempo de divergência para o tipo morfológico 2S (Figura 19). O padrão de ancestralidade para este morfotipo também é suportado pelos valores de τ (Tabela 7), quando se assume que as taxas de mutação são constantes.

As mutações encontradas entre os haplótipos (transições e transversões) apresentaram frequências iguais entre os tipos morfológicos, sendo as transversões menos comuns no tipo morfológico 2S (Tabela 5). Mutações do tipo *Indel* (inserções ou deleções) não foram encontradas em nenhum dos morfotipos.

Os testes **D** de Tajima e **F_s** de Fu aplicados para os mesmos morfotipos evidenciaram discordâncias entre as estimativas de θ geral e π , porém com valores negativos e altamente significativos para **F_s** de Fu, indicando a ausência de expansão populacional (Tabela 6). O índice de irregularidade (do inglês, *Raggedness*) com bootstrap paramétrico simulou novos valores θ para antes e depois de uma suposta expansão demográfica e neste caso, assumiu valor igual a zero para todos os morfotipos (Tabela 7).

Tabela 5. Índices de Diversidade Molecular para as 118 sequências do fragmento de 525 pb do gene *period* de *Lu. longipalpis* agrupadas em quatro morfotipos distintos das localidades de Sobral e Caririaçu, Ceará, Brasil.

ÍNDICES	SOB1S	SOB2S	CAR1S	CAR2S	Média	D.P.
Transições	22	17	20	17	19.0	2.4
Transversões	12	03	12	04	7.7	4.9
Substituições	34	20	32	21	26.7	7.2
Indels	0	0	0	0	0	0
π	8.6	6.1	7.3	5.6	6.9	1.3
θ_S	8.1	5.4	7.9	5.2	6.7	1.5
θ_S (d.p)	2.7	2.0	2.8	1.9	2.4	0.4
θ_π	8.6	6.1	7.3	5.6	6.9	1.3
θ_π (d.p)	4.5	3.3	3.9	3.0	3.7	0.6

SOB1S = Sobral 1S; SOB2S = Sobral 2S; CAR1S = Caririaçu 1S; CAR2S = Caririaçu 2S

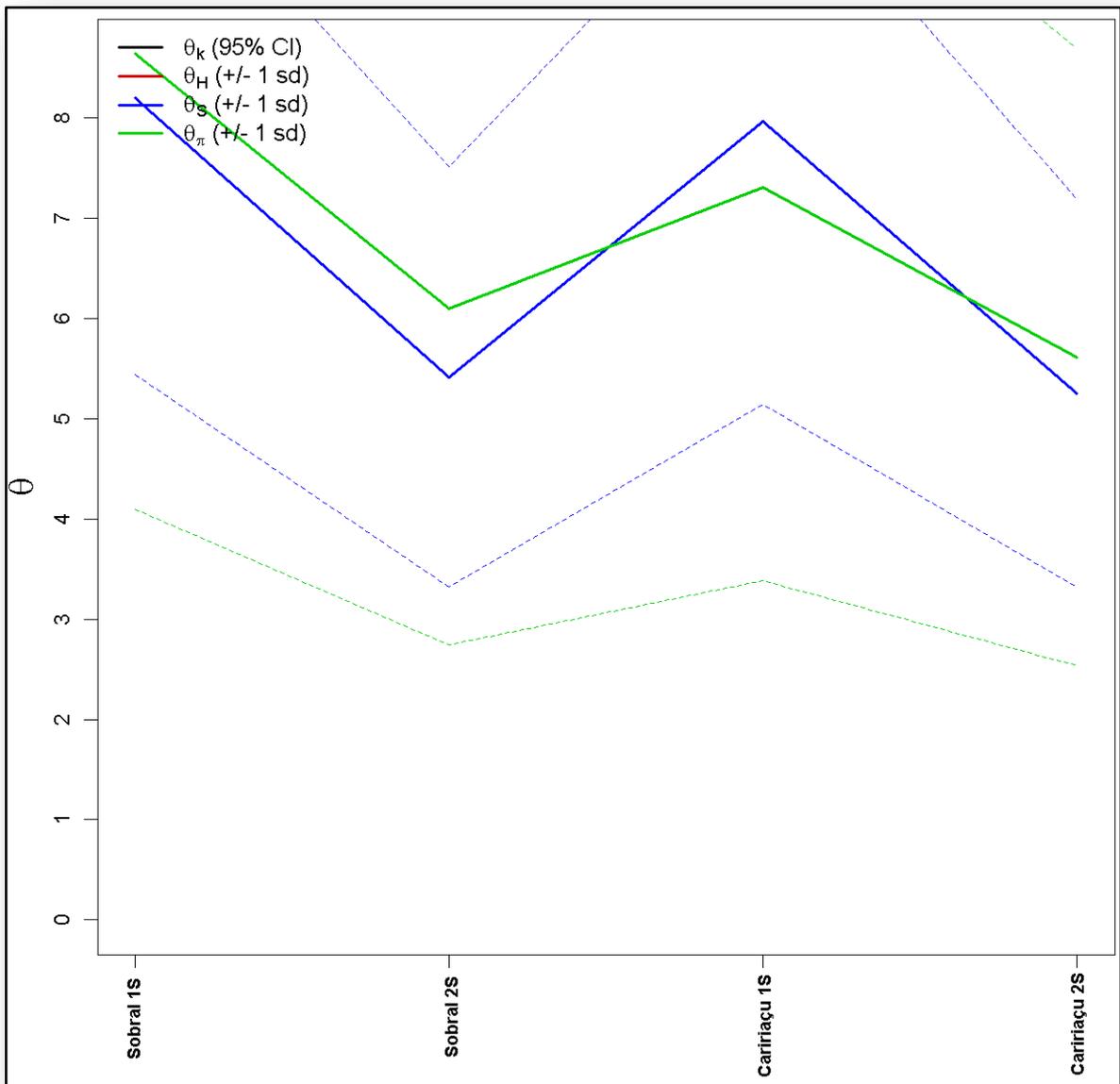


Figura 19. Gráfico dos índices de diversidade molecular em populações de *Lu. longipalpis* dos morfotipos 1S e 2S das localidades de Sobral (SOB1S e SOB2S) e Caririáçu CAR1S e CAR2S, Ceará, Brasil. No gráfico os valores de $\hat{\theta}$: (**θ_k**) Relação entre o número esperado de alelos (k) e o tamanho da amostra; (**θ_H**) Homozigosidade esperada numa relação equilibrada entre deriva e mutação; (**θ_S**) Relação entre o número de sítios segregantes (S), o tamanho da amostra (n) e os sítios não recombinantes; (**θ_π**) Relação entre o número médio de diferenças pareadas (π) e $\hat{\theta}$. * Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do *software* Arlequin versão 3.5.1.2.

Tabela 6. Testes de Neutralidade para as 118 sequências do fragmento de 525 pb do gene *period* de *Lu. longipalpis* das localidades de Sobral e Caririaçu, Ceará, Brasil, agrupadas em quatro grupos distintos.

TESTES	SOB1S	SOB2S	CAR1S	CAR2S	Média	D.P.
EWENS-WATTERSON						
Número de Alelos	36	23	28	31	29.50	5.44
CHAKRABORTY'S						
Número esperado de alelos	4.6	9.94	11.91	10.96	11.85	2.00
D DE TAJIMA						
Tamanho da amostra	36	23	28	31	29.50	5.44
S	34	20	31	21	26.50	7.04
π	8.64	6.10	7.30	5.61	6.91	1.35
D de Tajima	0.19	0.46	-0.30	0.23	0.14	0.32
D de Tajima (valor p)	0.62	0.70	0.41	0.65	0.60	0.13
FS DE FU						
Número de alelos	36	23	28	31	29.50	5.44
$\theta\pi$	8.64	6.10	7.30	5.61	6.91	1.35
Numero esperado de alelos	14.60	9.94	11.91	10.96	11.85	2.00
FS	-24.82	-21.64	-24.90	-25.38	-24.18	1.71
FS (valor p)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

SOB1S = Sobral 1S; SOB2S = Sobral 2S; CAR1S = Caririaçu 1S; CAR2S = Caririaçu 2S

5.4.5 Análise do efeito de expansão populacional

Para cada um dos morfotipos, entendidos aqui como grupos de indivíduos em cada ponto de coleta, foi calculado um valor de M (valor resultante de uma expansão espacial simulada) com o uso de programa Arlequin v. 3.5.

Neste cenário, o valor de M foi similar ao encontrado para expansão demográfica ($r = 0$) e esta similaridade entre os dados demográficos e espaciais revelou uniformidade na dispersão dos grupos, inclusive quando considerada a média atual do valor de θ igual a 0,69 (Tabela 7).

Tabela 7. Simulações da expansão demográfica e espacial baseadas nos índices τ , θ e M , do gene period para os quatro morfotipos de *Lu. longipalpis*. das localidades de Sobral e Caririaçu, Ceará, Brasil

TESTES	SOB1S	SOB2S	CAR1S	CAR2S	Média	D.P.
EXPANSÃO DEMOGRÁFICA						
τ	8.51	5.71	6.20	6.02	6.61	1.28
τ qt 5%	5.92.	4.20.	4.97.	3.96.	4.76.	0.88
θ	0.00	0.54	0.98	0.00	0,38	0.47
θ qt 5%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
θ 1	28.62	99.00	99.00	31.00	50.40	56.59
θ 1 qt 5%	91.71	42.82	59.23	88.43	70.55	23.55
D.P.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D.P. (valor de p)	0.70	0.52	0.53	0.47	0.55	0.10
R	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
EXPANSÃO ESPACIAL						
τ	7.47	5.72	6.22	6.02	6.36	0.76
τ qt 5%	5.74	3.86	4.26	4.20	4.52	0.83
θ	1.28	0.52	0.96	0.00	0.69	0.55
θ qt 5%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M	93.80	99.00	23.05	99.00	50.46	56.13
M qt 5%	26.71	14.10	17.79	22.47	20.02	56.69
D.P.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SSD Modelo (valor de p)	0.66	0.55	0.45	0.32	0.49	0.14
R	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00

SOB1S = Sobral 1S; SOB1S = Sobral 1S; CAR1S = Caririaçu 1S; CAR2S = Caririaçu 2S

6. Discussão

Com o uso de metodologias de análise filogenética e de estruturação populacional ainda não utilizadas em populações brasileiras de *Lu. longipalpis*, foi possível detectar a existência de espécies irmãs ocorrendo em simpatria nas localidades de Sobral e Caririaçu no Estado do Ceará. Os morfotipos (SOB1S, SOB2, CAR1S e CAR2) aqui descritos como correspondentes às subpopulações das duas localidades, tiveram suas distâncias genéticas, suportadas pelas análises de F_{ST} utilizando o marcador *per* (sem distinção fenotípica), e estruturação suficientemente significativos para tal interpretação.

Autores como Arrivillaga *et al.* (2003), Azevedo *et al.* (2000), Mukhopadhyay *et al.* (1997) (1998) e Mutebi *et al.* (1999), não conseguiram fazer inferências significativas sobre esta questão, exatamente por não encontrarem níveis significativos desta estruturação em populações de *Lu. longipalpis*, só descritos pela primeira vez por Coutinho-Abreu *et al.* (2008) de forma moderada, em populações deste inseto separadas pelo antigo curso do Rio São Francisco.

Diferentes graus de estruturação foram detectados para morfotipos de uma mesma região geográfica, sendo essencialmente maiores entre morfotipos iguais provenientes de regiões geograficamente distintas. Os morfotipos SOB1S e CAR1S, não apresentaram nível de estruturação significativo talvez por não possuírem variação inter-haplotípica considerável, sendo estas as principais componentes na estruturação moderada e alta para os morfotipos SOB2S e CAR2S, respectivamente. Estes dados sugerem que o alto grau de estruturação presente em CAR2S, pode estar relacionado a uma perda de haplótipos intermediários ao longo das gerações, associada à ausência de fluxo gênico em populações de *Lu. longipalpis* (Lins *et al.*, 2008).

Estes níveis de estruturação também foram suportados por metodologias simples de pareamento filogenético como UPGMA e por mais complexas como a rede de haplótipos, que neste caso, com um padrão descontínuo de divergência genética entre os grupos (suportando a ocorrência de isolamentos geográficos decorrentes de eventos pretéritos de fragmentação), foi observada uma numerosa quantidade de ramos com muitos passos mutacionais. Estas mutações, possivelmente se fixaram por deriva devido ao efeito fundador, que acompanha o comportamento de dispersão e/ou perda de haplótipos intermediários ao longo das gerações (Avice and Walker, 1999).

Os valores encontrados para distância genética suportam a presença deste padrão descontínuo de divergência entre os morfotipos estudados, já que consideraram importantes as mínimas diferenças entre os grupos quando os haplótipos entre eles foram permutados, bem como a inferência de valores maiores ou iguais ao observado na proporção dessas permutações, inclusive, pelo *valor de p* do teste.

A discriminação das duas entidades genéticas associadas aos fenótipos 1S e 2S, bem como a presença dos dois fenótipos de forma simultânea nas localidades, foi percebida quando as variações inter-haplotípicas foram hierarquizadas em todos os componentes de covariância, por suas diferenças intra e interindividuais ou intra e interpopulacionais, gerando dendogramas que suportaram a ideia de que as diferenças significativas encontradas entre SOB1S e CAR1S, por exemplo, sejam compartilhadas mais em sua forma que em seu número, já que o resultado do F_{ST} entre estes morfotipos foi tão baixo.

As análises da expansão espacial-demográfica revelaram uma distribuição diferente para os grupos, resultantes das diferenças encontradas nas frequências

em relação aos valores centrais. A curva bimodal e assimetricamente positiva para o morfotipo CAR2S, sugere um evento antigo de expansão, uma vez que se observa para este morfotipo especificamente, uma discordância entre o número de sítios divergentes e os valores θ , sendo ainda suportados pelos valores dos testes D de Tajima e FS de Fu. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Scarpassa *et al.* (2012) quando analisaram a possibilidade de populações amazônicas de *Lu. umbratilis* pertencerem a um complexo de espécie.

A associação dos valores descritos anteriormente (F_{ST} e de diversidade molecular) a índices de expansão como o de irregularidade, suporta a ideia do equilíbrio demográfico e espacial em um dado morfotipo (SOB2S) e uma atual propensão à expansão demográfica em outro (SOB1S). Alguns autores como Arrivillaga *et al.* (2002), acreditam que padrões atuais de expansão como os descritos neste trabalho se estabeleçam principalmente em função de possíveis eventos de expansão passados que, neste trabalho, foram analisados significativamente por testes robustos (utilizam em seu *script*, o número máximo das diferenças mutacionais encontradas) que revelaram a configuração do cenário de estruturação populacional percebido atualmente.

Esta observação suporta a ideia de que os níveis de estruturação devem estar mais associados às características biológicas compartilhadas (pintas tergiciais) do que ao isolamento por distância como presumido nos trabalhos de Araki *et al.* (2009), Bauzer *et al.* (2002) e Mazzoni *et al.* (2006) e (2008) e como nenhuma relação entre a distância genética e a distância geográfica foi estabelecida para os morfotipos, a falta de fluxo gênico (observada pelo não compartilhamento haplotípico) deve ser suportada pela presença de barreiras geográficas e pela baixa

capacidade de voo do inseto (Arrivillaga *et al.*, 2001), levando ao isolamento geográfico dos dois táxons encontrados para *Lu. longipalpis*.

Nas populações em que há simpatria entre os morfotipos, as análises de máxima verossimilhança, testes de atribuição, valores de F_{ST} e AMOVA também suportaram a existência de uma ordem decrescente nos padrões de estruturação genética nas localidades Sobral e Caririaçu, respectivamente. Em Sobral, o padrão fenotípico associado ao complexo de espécies crípticas é sustentado por todas as metodologias empregadas e tanto a quantidade quanto a frequência dos polimorfismos genéticos dentro das populações, sugerem que a diversidade molecular dos morfotipos 1S e 2S é devida às substituições sinônimas como principais componentes das variações.

Os estimadores θ mesmo sendo extremamente sensíveis a qualquer forma de variação molecular (Fu, 1997), suportaram a uniformidade entre os resultados encontrados por todas as metodologias empregadas, podendo ser interpretados como a confirmação filogenética ora assumida.

7. Conclusões

- A abordagem multi-metodológica figurou como alternativa confiável na resolução de conflitos taxonômicos de *Lutzomyia longipalpis* para as duas localidades estudadas separando os morfotipos 1S e 2S em duas entidades genéticas distintas no Estado do Ceará.
- As análises baseadas no índice F_{ST} evidenciaram a presença de duas entidades genéticas distintas, sendo uma formada pelos indivíduos que exibem uma pinta tergital (SOB1S e CAR1S) e outra pelos indivíduos que exibem duas destas pintas (SOB2S e CAR2S);
- A árvore filogenética gerada através do método de máxima verossimilhança confirmou o status monofilético dos grupos 1S e 2S, ratificando a importância da utilização de múltiplos grupos externos na polarização dos dendogramas;
- As análises de máxima verossimilhança, o teste de atribuição, o índice de fixação e a AMOVA indicaram que existe uma ordem decrescente nos padrões de estruturação genética entre as localidades estudadas;
- No contexto filogeográfico, não houve relação entre as matrizes de distância genética (F_{ST}) e geográfica evidenciando a falta de relação entre a estruturação encontrada e o fluxo gênico entre os grupos;
- A falta de fluxo gênico, suportada pela presença de barreiras geográficas e outros acidentes geológicos, possivelmente contribuiu no isolamento dos grupos em seus morfotipos distintos;
- Nos testes de atribuição genética, a discriminação de duas entidades genéticas (1S e 2S), suporta a ocorrência de retenção de polimorfismo ancestral, já descritos para o gênero;

- O morfotipo 2S apresentou menor estruturação genética, caracterizando-o como um grupo mais antigo e não propenso a uma atual expansão geográfica;

8. Referências Bibliográficas

Alba, R; Fei, ZJ; Payton, P.; Liu, Y; Moore, SL; Debbie, P; Cohn, J; D'Ascenzo, M; Gordon, JS; Rose, JKC; Martin, G; Tanksley, SD; Bouzayen, M; Jahn, MM; Giovannoni, J (2004). *ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: Tools for dissecting plant physiology and development. Plant J. 39, 697–714.*

Altschul SF; Gish W; Miller W; Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Araki NHT; Khatab IA; Hemamali KKGU; Inomata N; Wang X-R and Szmidt AE (2008) Phylogeography of *Larix sukaczewii* Dyl. and *Larix sibirica* L. inferred from nucleotide variation of nuclear genes. *Tree Genet Genomes* 4: 611-623.

Araki, AS; Vigoder, FM; Bauzer, LGSR; Ferreira, GEM; Souza, NA; Araujo, IB; Hamilton, JGC; Brazil, RP; Peixoto, AA (2009). Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3, 1-12

Arrivillaga JC; Norris DE; Feliciangeli MD; Lanzaro GC (2002) Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Inf Genet Evol* 2: 83–95.

Arrivillaga, J; Mutebi, JP; Pinango, H; Norris, D; Alexander, B; Feliciangeli, MD; Lanzaro, GC (2003). The taxonomic status of genetically divergent populations of

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. J. Med. Entomol. 40, 615-627.

Arrivillaga, JC; Feliciangeli, MD (2001). *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. J. Med. Entomol. 38, 783-790.

Avise, JC and Walker, D (1999). Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96: 992-995

Azevedo, AC; Monteiro, FA; Cabello, PH; Souza NA; Rosa-Freitas, MG; Rangel, EF (2000). Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95, 305-322.

Balbino, VQ; Coutinho-Abreu, IV; Sonoda, IV; Melo, MA; de Andrade, PP; de Castro, JÁ; Rebelo, JM; Carvalho, SM; Ramalho-Ortigao, M (2006). Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. Acta. Trop. 98, 15-24.

Bandelt, HJ; Forster P; Röhl, A (1999). Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. **16**: 37-48.

Bastien P; Blaineau C; Page`s M. (1992) Leishmania: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today* 8: 174–177.

Batista, GEAPA; Prati, RC; Monard, MC (2004), “A Study of the Behaviour of Several Methods for Balancing Machine Learning Training Data”, *SIGKDD explorations*, v. 6, n. 1 (Dec), pp. 20-29.

Bauzer LGSR; Souza NA; Maingon RDC; Peixoto AA (2007). *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 1-12.

Bauzer, LG; Souza, NA; Ward, RD; Kyriacou, CP; Peixoto, AA (2002a). The *period* gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect. Mol. Biol.* 11, 315-323.

Blaineau C; Bastien P; Page`s M (1992) Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. *Mol Biochem Parasitol* 50: 197–204.

Boyd, AM; Foley, DH (2007). Distribution of sibling species of the *Anopheles annulipes* complex (Diptera: Culicidae) in the Townsville region of Australia. *Austr. J. Entomol.* 46, 133–139.

Brasil-SVS/MS (2011). Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lta_deteccao_27_10_2010.pdf df.
acessado em 03.08.2011.

Cerioni, A. (2002). Testing mutual independence between two discrete-valued spatial processes: A correction to Pearson chi-squared. *Biometrics*, 58:888-897.

Citri, Y; Colot, HV; Jacquier, AC; Yu, Q; Hall, JC; Baltimore, D; Rosbash, MA (1987). Family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. *Nature*, 326, 42-47.

Cockerham, CC (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-83.

Cockerham, CC (1973) Analysis of gene frequencies. *Genetics* 74: 679-700.

Colot, HV; Hall, JC; Rosbash, MA (1988) Interspecific comparison of the period gene of *Drosophila* reveals large blocks of non-conserved coding DNA. *Embo. Journal*. 7, 3929-3937.

Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MM, Balbino VQ, Ramalho-Ortigão M (2008) ***Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco River in the speciation of this sand fly vector.** *Parasit Vectors* 2008, 1:16

Coyne, JA (1992) Genetics and speciation. *Nature* 355: 511-515.

Crooks, GE; Hon, G; Chandonia, JM; Brenner SE (2004) WebLogo: A sequence logo generator, *Genome Research*, 14:1188-1190

Demetriades MC; Thackeray JR; Kyriacou CP (1999). Courtship song rhythms in *Drosophila yakuba*. *Anim Behav* 57: 379-386.

Embrapa monitoramento por satélite (2013). **SOMABRASIL**: Sistema de Observação e Monitoramento da Agricultura no Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpm.embrapa.br/projetos/somabrasil/index.html>>. Acesso em: 24 fev. 2013.

Epperson, BK (2003). Geographical genetics. New Jersey: Princeton University Press, 356p. (Monographs in Population Biology, 38).

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.

Ewens. WJ (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles, *Theoretical Population Biology*, 3. 87-112.

Excoffier L; Laval LG and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform* 1: 47-50.

Excoffier, L. (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol Ecol* 13(4): 853-864

Excoffier, L; Smouse, P; Quattro, J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Fonseca, GABK; Alger, LP; Pinto, M; Araújo, R; Cavalcanti, C. (2004). Corredores de biodiversidade: o Corredor Central da Mata Atlântica. In: M.B. Arruda & L.F.S.N. Sá (eds.). *Corredores ecológicos: uma abordagem integradora de ecossistemas no Brasil*. pp. 47-65. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente edos Recursos Naturais Renováveis. Brasília.

Fu, YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

Golczer, G; Arrivillaga, J. (2010). Gen periodo no construye filogenias dentro del complejo de especie, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). *Metodos en ecologia y sistematica*. 5, 10-26.

Gotter AL.; Levine, JD.; Reppert SM. (1999) Sex-Linked *period* Genes in the Silkmoth, *Antheraea pernyi*: Implications for Circadian Clock Regulation and the Evolution of Sex Chromosomes. *Neuron*, Vol. 24, 953–965.

Guillot, G. and Rousset, F. (2012) On the use of the simple and partial Mantel tests in presence of spatial auto-correlation. arXiv:1112.0651v1..

Guindon, S., Gascuel, O., (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52(5), 696-704.

Hall, JD (2003). *Genetics and Molecular Biology of Rhythms in Drosophila and Other Insects*, Academic Press, Amsterdam 286pp.

Hennig, W (1972). Insekten fossilien aus der unteren Kreide IV. *Psychodidae (Phlebotominae)*, mit einer kritischer Übersicht über das phylogenetische System der Familie und die bisher beschriebenen Fossilien (Diptera). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde* 241: 1-69.

Hoffman, EC; Reyes, H; Chu, F; Sander, F; Conley, LH; Brooks, BA; Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 954-958.

Holsinger, KE. and Weir, BS. (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *EEB Articles*. Paper 22.

Disponível em: http://digitalcommons.uconn.edu/eeb_articles/22. Acessado em 22/11/2012.

Hudson, RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 7: 1–44.

Kimura, M. (1968), Evolutionary Rate at the Molecular Level, *Nature* 217: 624-26.

Kimura, M. (1969). The number of heterozygous nucleotides sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. *Genetics* 61: 893-903.

Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution* Cambridge University Press, Cambridge, England.

Kyriacou CP; Hall JC (1980). Circadian rhythm mutations in *Drosophila* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6929-6933.

Kyriacou CP; Hall JC (1982). The function of courtship song rhythms in *Drosophila*. *Anim Behav* 30: 784-801.

Kyriacou CP; Hall JC (1986). Interspecific genetic control of courtship song production and reception in *Drosophila*. *Science* 232: 494-497.

Lainson, R; Rangel, EF (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-

epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 811-27.

Lainson, R and Rangel, EF (2003) Ecologia das leishmanioses, p.291-309. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368p.

Lainson, R; Ward, RD; Shaw, JJ (1977). *Leishmania* in phlebotomid sandflies : VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania Mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 199, 309-320.

Lane RP; Ward RD (1984) **The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae).**

Lane, DJ; Stahl, DA; Olsen, GJ; Heller, DJ; Pace, NR (1985). Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J Bacteriol* 163, 75±81.

Lehr, MA; Kilpatrick, CW; Wilkerson, RC; Conn, E (2005). Cryptic species in the *anopheles (nyssorhynchus) albitarsis* (diptera: culicidae) complex: incongruence between random amplified polymorphic dna-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial dna *coi* gene sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(6), 908-917.

Li, WH (1997). *Molecular Evolution*. Sunderland, MA, Sinauer Associates.

Liedloff AC (1999) Mantel nonparametric test calculator. Version 2.0. Disponível em: <http://www.terc.csiro.au/mantel.htm> (Acessado em: 05/11/11).

Lins, RMMA; [Souza, NA](#) ; [Peixoto, AA](#) (2008) . Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, p. 736-740.

Lutz, A. and Neiva, A. (1912). Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem. Inst. O. Cruz*, 4:84-95

MacLeod A; Tweedie A; Welburn SC; Maudlin I; Turner CMR; Tait A (2000) Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: Reconciliation of clonal, panmictic, and epidemic population genetic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13442–13447.

Maingon RD.; Ward RD; Hamilton JG; Bauzer LG.; Peixoto AA (2008). The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends in Parasitol* 24: 12-17.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209-220.

Mazzoni, CJ; Araki, AS; Ferreira, GE; Azevedo, RV; Barbujani, G.; Peixoto, AA

(2008). Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC Evol. Biol.* 8, 141.

Mazzoni, CJ; Souza, NA; Andrade-Coelho, C; Kyriacou CP; Peixoto, AA (2006). Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the *period* gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC Evol. Biol.* 6, 1-11.

Mitchell, M., (1996) "*An Introduction to Genetic Algorithms*", 1a. Edição, Cambridge, Massachussets, The MIT Press.

Mukhopadhyay, J; Ghosh, K; Azevedo, AC; Rangel, EF; Munstermann, LE (1998a) Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14, 277-282.

Mukhopadhyay, J; Ghosh, K; Rangel, EF; Munstermann, LE (1998b) Genetic variability in biochemical characters of Brazilian field populations of the *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 893-901.

Mukhopadhyay, J; Rangel, E; Ghosh, K; Munstermann, L (1997) Patterns of genetic variability in colonized strains of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its consequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 216-221.

Mutebi, JP; Alexander, B; Sherlock, I; Wellington, J; Souza, AA; Shaw, J; Rangel,

EF; Lanzaro, GC (1999) Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61, 149-157.

Organização Mundial de Saúde (2012). Leishmaniasis. Disponível em: <http://who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/> en. Acessado em 28/07/2012.

Wright, S., (1921) Systems of mating. Genetics 6: 111-178.

Passamonti, M; Mantovani, B; Scali, V (2004). Phylogeny and karyotype evolution of the Iberian *Leptomyia attenuata* species complex (Insecta Phasmatodea). Mol. Phylogenet. Evol. 30, 87–96.

Peixoto, AA (2002b). Molecular divergence in the *period* gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Mol. Biol. Evol. 19, 1624-1627.

Peixoto, AA (2008). Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. BMC Evol. Biol. 8, 141.

Posada, D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol. Biol. Evol. 25, 1253-1256.

Pritchard, JK; Stephens, P; Donnelly, P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

Rangel EF; Souza NA; Wermelinger ED; Barbosa AF and Andrade CA. (1996).

Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz and Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. Mem Inst Oswaldo Cruz 81: 431-438.\

Ray N, Currat M; Excoffier L. (2003). Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. Mol Biol Evol 20(1): 76-86.

Reynolds, J; Weir, BS, and Cockerham, CC (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. Genetics 105:767-779.

Ritchie MG; Halsey EJ; Jennifer M; Gleason JM (1999). *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song. Anim Behav 58: 649-657.

Scarpassa VM; Alencar RB (2012) *Lutzomyia umbratilis*, the Main Vector of *Leishmania guyanensis*, Represents a Novel Species Complex? PLoS ONE 7(5): e37341. doi:10.1371/journal.pone.0037341

Schmidt, HA; Strimmer, K; Vingron, M; von Haeseler, A (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. Bioinformatics 18, 502-504.

Sherlock IA; Sherlock VA. (1961). On the experimental infection of "*Phlebotomus longipalpis*" by "*Leishmania donovani*". Rev Bras Biol 22: 409-418.

Silva DF.; Freitas RA.; Franco AMR (2007). Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. *Neotrop Entomol* 36: 138-144.

Slatkin, M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.

Slatkin, M (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* 58: 167-175.

Smouse, PE; Long, JC and Sokal, RR (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Syst. Zool.* 35: 627-632.

Staden, R (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5:233–241. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Stewart, FM (1977). Computer algorithm for obtaining a random set of allele frequencies for a locus in an equilibrium population. *Genetics*, Baltimore, v. 86, p. 482-483,.

Tajima, F (1989). Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123- 585-595.

Tajima, F (1993). Measurement of DNA polymorphism. In: *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*, edited by Takahata, N.

and Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA:Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59.

Tamura, K; Dudley, J; Nei, M; Kumar, S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.

Taylor JW; Geiser DM; Burt A; Koufopanou, V (1999) The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev* 12: 126– 146.

Tibayrenc, M (1993) Clonality in *Leishmania*. *Parasitol Today* 9: 58.

Vigoder, FM; Araki, AS; Bauzer, LGSR; Souza, NA; Brazil, RP; Peixoto, AA (2010). Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect. Genet. Evol.* 10(6), 734-739.

Watterson, GA (1978). The homozygosity test of neutrality. *Genetics* 88:405-417

Watterson, GA (1986) The homozygosity test after a change in population size. *genetics* 112: 899-907.

Watterson, GA (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor.Popul.Biol.* 7: 256-276.

Weir, BS (1996) Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA, USA.

Weir, BS. and Cockerham, CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Wilkerson, RC (2004). Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science* 303, 1535-1538.

Wilkerson, RC; Foster, PG; Li, C; Sallum, MAM (2005). Molecular Phylogeny of Neotropical *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Species Complex (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(6), 918-925.

Wilkerson, RC; Foster, PG; Li, C; Sallum, MAM (2005). Molecular Phylogeny of Neotropical *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Species Complex (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(6), 918-925.

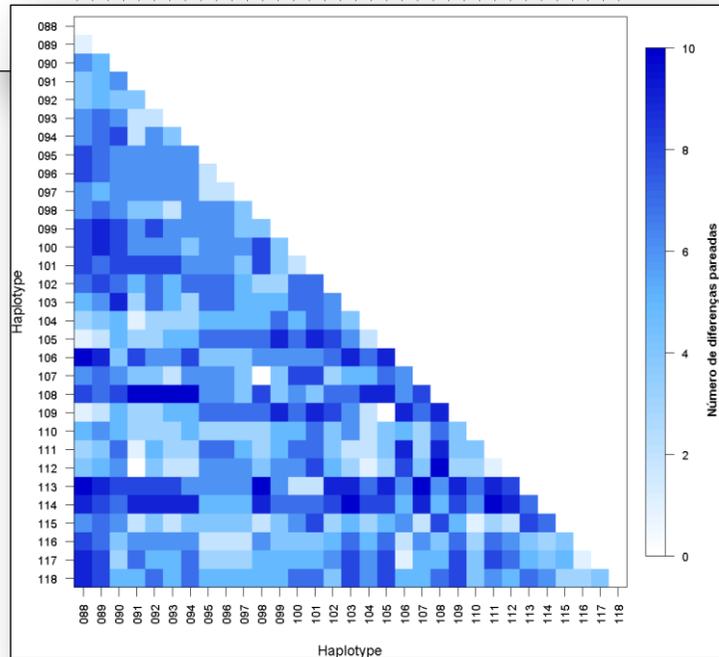
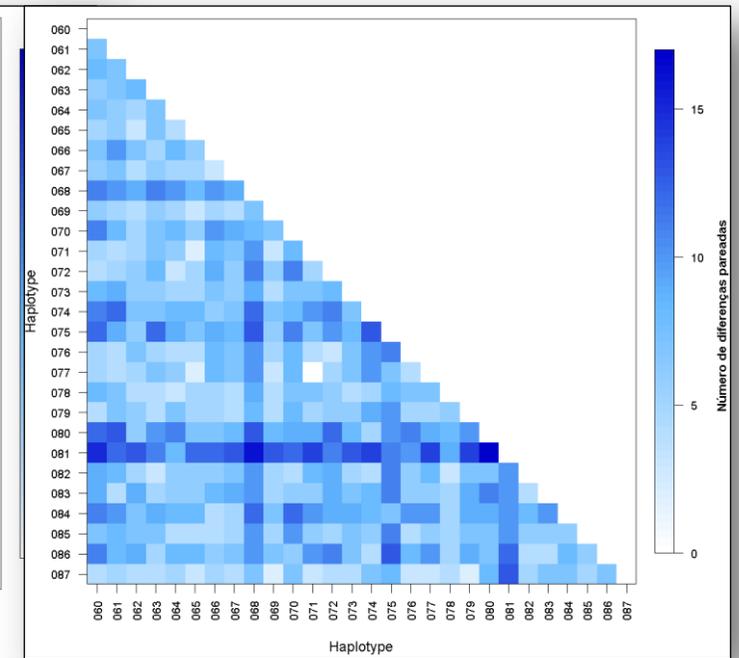
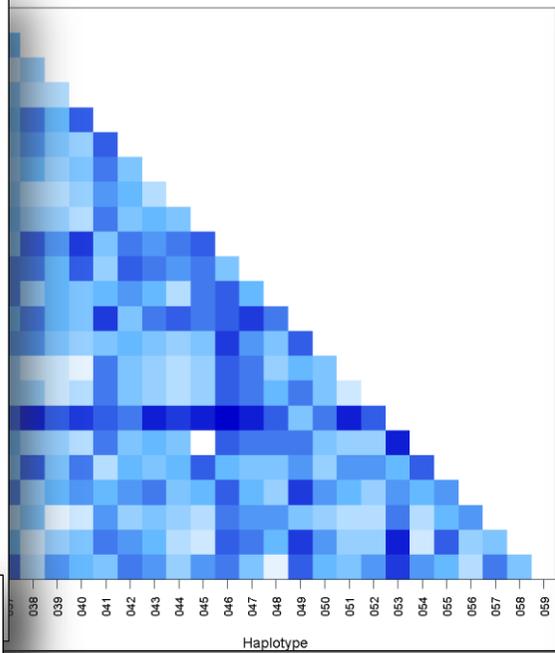
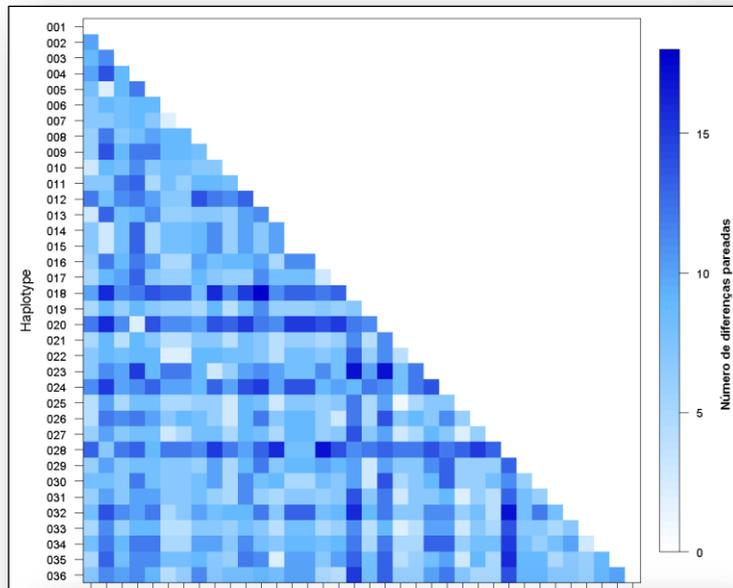
Wright, S (1951) The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* 15: 323-354.

Wright, S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evol* 19: 395-420.

Young, D.; and Duncan M. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand-flies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* 54: 1-881.

Zheng, XZ; Zhang, YP; Zhu, DL; Geng, ZC (1999) The *period* Gene: High Conservation of the Region Coding for Thr–Gly Dipeptides in the *Drosophila nasuta* Species Subgroup. *J. Mol. Evol.* 149, 406–410.

9. Apêndice



ANEXO II. Matriz de distância inter-haplotípica e número de sítios polimórficos encontrados nos morfotipos SOB1S (a); SOB2S (b); CAR1S (c); SOB2S (d). *Gerada pelo pacote estatístico em linguagem R usando os dados de saída do *software* Arlequin versão 3.5.1.2.

10. *Curriculum Vitae*

Nome Pierre Teodósio Félix
Filiação Reginaldo Teodósio da Silva e Maria Félix Cabral da Silva
Nascimento 12/04/1971 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 3047605 SSP - PE - 04/05/2002
CPF 622.122.654-68
Passaporte FG861633

Endereço residencial Rua Rio Sanhauá, 62
Ibura - Recife
51340-180, PE - Brasil
Telefone: 81 87694971

Endereço profissional Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão, Centro de Ciências Naturais, Laboratório de Citogenética Molecular
Loteamento Jardim São Vicente Ferrer
Cajá - Vitoria de Santo Antao
55610-100, PE - Brasil
Telefone: 81 35231020

Endereço eletrônico
E-mail para contato: pierre.felix@hotmail.com
E-mail alternativo: pierre.felix@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2008 Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Filogeografia molecular e genética de populações de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum* chagasi na Região Tropical
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

2000 - 2002 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Polimorfismo de inversões em cromossomos politênicos de populações naturais de *Drosophila malerkotliana* no Estado de Pernambuco e mapeamento in situ do loco Hsp83, Ano de obtenção: 2002
Orientador: José Ferreira dos Santos
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

1995 - 2000 Graduação em Curso de Bacharelado Em Ciências Biológicas.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

Título: caracterização eletroforética de proteínas totais e isoenzimas em uma linhagem de *Pleurotus sajor-caju*

Orientador: Marcos José Correia dos Santos

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2010 - 2010** Extensão universitária em GENÉTICA E BIOLOGIA DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Curso sobre normatização acadêmica. Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão, FAINTVISA, Vitoria De Santo Antao, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Oficina de Metodologia do Ensino Superior. Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão, FAINTVISA, Vitoria De Santo Antao, Brasil
- 1999 - 1999** Curso de curta duração em Redação de Textos Científicos. Instituto Agrônomo de Pernambuco, IPA, Recife, Brasil
- 1999 - 1999** Curso de curta duração em Citogenética Animal. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Bibliotecas Genômicas e de Cdna Confeção e Aplicação. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Hematologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Controle de Zoonoses. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Manipulação do Produto Gênico. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Técnicas Em Genética Molecular. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Princípios de Engenharia Genética. Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
- 1996 - 1996** Extensão universitária em Tópicos de Biologia Aplicados na Arqueologia

- Antrop.
Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, Brasil
- 1996 - 1996** Curso de curta duração em Oceanografia Geral.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1996 - 1996** Curso de curta duração em Hematologia Básica.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1996 - 1996** Curso de curta duração em Imunologia.
Faculdade Frassinetti do Recife, FAFIRE, Recife, Brasil
- 1995 - 1995** Curso de curta duração em Princípios Fundamentais de Cronobiologia.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1994 - 1994** Curso de curta duração em Manejo Reprodutivo de Ruminantes.
Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Joao Pessoa, Brasil
- 1994 - 1994** Curso de curta duração em Estudo das Emoções e Suas Repercussões Orgânicas A.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 1994 - 1994** Curso de curta duração em Genética Molecular.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão - FAINTVISA

Vínculo institucional

2002 - Atual Vínculo: Professor Titular , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

02/2011 - Atual Graduação, ENFERMAGEM
Disciplinas ministradas:
CITOLOGIA , GENÉTICA HUMANA

10/2009 - 10/2010 Direção e Administração, Centro de Ciências Naturais
Cargos ocupados:
Coordenador do Curso de Biologia

02/2009 - Atual Graduação, Farmacia

Disciplinas ministradas:
Biologia Molecular e celular , Genética

02/2009 - 12/2010 Graduação, Pedagogia Administração Escolar
Disciplinas ministradas:
Metodologia da Pesquisa

02/2009 - 08/2011 Graduação, História
Disciplinas ministradas:
Tecnologia da Informação e Comunicação

05/2008 - Atual Especialização
Especificação:
Metodologia da Pesquisa

03/2008 - 03/2009 Treinamento, Centro de Ciências Naturais,
Laboratório de Citogenética Molecular
Especificação:
Treinamento de Alunos para Estágio No Laboratório de
Bioinformática e Biologia Molecular em 2008 (LGMH-UFPE),
Treinamento de alunos para monitoria na disciplina de
genética de populações e Evolução

02/2008 - Atual Graduação, Psicologia
Disciplinas ministradas:
Metodologia da Pesquisa Psicológica e Psicosocial

01/2006 - Atual Especialização
Especificação:
Genética de Populações e Evolução

12/2005 - 07/2006 Direção e Administração, Departamento de
Comunicação e Marketing
Cargos ocupados:
Coordenador do Departamento de Comunicação e Marketing

06/2005 - Atual Conselhos, Comissões e Consultoria, Comissão Própria de
Avaliação (CPA)
Especificação:
Representante do Corpo Docente

01/2005 - Atual Serviço Técnico Especializado, Centro de Ciências Exatas e
Naturais
Especificação:
Comissão Própria de avaliação - SINAES

- 08/2004 - 12/2005** Graduação, Pedagogia Administração Escolar
Disciplinas ministradas:
Estatística aplicada a administração escolar
- 08/2004 - 12/2006** Graduação, Licenciatura Em Estudos Sociais História e Geograf
Disciplinas ministradas:
Metodos e tecnicas em Pesquisa e educação
- 06/2004 - 07/2004** Serviço Técnico Especializado, Departamento de Pessoal, Diretoria
Especificação:
Relatorio de politicas Sociais e de Pessoal da FAINTVISA
- 01/2004 - 12/2006** Direção e Administração, Centro de Pesquisa Pós Graduação Extensão e Atualização Cppgea, Pós Graduação Em Genética
Cargos ocupados:
Coordenador do Curso de pós-Graduação em Genética
- 04/2003 - Atual** Especialização
Especificação:
FUNDAMENTOS DE GENÉTICA
- 03/2003 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Naturais, Laboratório de Citogenética Molecular
Linhas de pesquisa:
Citogenética de drosofilídeos , polimorfismo de inversão cromossômica , Bioinformática e Genética de Populações de Insetos Vetores da Leshimaniose Visceral
- 01/2003 - 01/2004** Conselhos, Comissões e Consultoria, Coordenação de Ciencias Farmaceuticas, Farmacia
Especificação:
Co-assessoria no Projeto Pedagógico e PDI
- 01/2003 - Atual** Graduação, Ciências Biológicas
Disciplinas ministradas:
Citogenética, Genética de populações e Evolução, Genética Molecular, Métodos e Técnicas
- 09/2002 - 10/2002** Serviço Técnico Especializado, Centro de Pesquisa Pós Graduação Extensão e Atualização Cppgea, Coordenação Geral
Especificação:
Elaboração de Cursos de Graduação para a FAINTVISA

08/2002 - 12/2002 Graduação, Ciências Biológicas
Disciplinas ministradas:
*Anatomia Humana , Anatomia Vegetal , Fisiologia vegetal ,
Morfologia vegetal*

07/2002 - 08/2002 Serviço Técnico Especializado, Centro de Pesquisa
Pós Graduação Extensão e Atualização Cppgea,
Coordenação Geral
Especificação:
*Elaboração do Relatório PDI dos cursos de Licenciatura e
Bacharelado da FANTVISA*

2. Colégio de Aplicação Bel Mario Bezerra - CAMB*

Vínculo institucional

2004 - 2011 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor
titular , Carga horária: 25, Regime: Parcial

Atividades

08/2004 - Atual Ensino médio
Especificação:
Biologia

3. Forum Permanente Pela Vida da Bacia do Rio Tapacurá - FORUM*

Vínculo institucional

2006 - 2008 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: NENHUM.
Carga horária: 0, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

04/2006 - Atual Direção e Administração, Forum
Cargos ocupados:
Coordenador da Secretaria Executiva

Linhas de pesquisa

- 1.** Bioinformática e Genética de Populações de Insetos Vetores da
Leshimaniose Visceral
- 2.** Citogenética de drosofilídeos

3. polimorfismo de inversão cromossômica

Membro de corpo editorial

1. **ATHOS - REVISTA DE ESTUDOS INTEGRADOS DAS FAINTVISA**

Vínculo

2009 - Atual Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Genética de Populações e Evolução
2. Citogenética de Drosofilídios
3. Genética Bioquímica de Plantas Cultivadas
4. Citogenética de Plantas Cultivadas
5. Bioinformática

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2011 - Atual** ESTUDO DE BIODIVERSIDADE DE DÍPTEROS HEMATÓFAGOS (CULICIDAE E PHLEBOTOMINAE) EM ÁREAS DOS EXTREMOS NORTE E SUL DO DOMÍNIO DE MATA ATLÂNTICA NO BRASIL
Descrição: submetido para Edital nº 47/2010 - Chamada 2 - Pesquisa em Redes Temáticas para ampliação do conhecimento sobre a biota, o papel funcional, uso e conservação da Biodiversidade Brasileira, coordenado por Carlos Brisola Marcondes cbrisola@pq.cnpq.br.
situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Pierre Teodósio Félix (Responsável);
- 2011 - Atual** Epidemiologia Molecular da Leishmaniose Visceral em Área de Transmissão Ativa no Sertão do Estado de Pernambuco,
Descrição: submetido para Edital MCT/CNPq 14/2010 - Universal - Faixa B - De R\$ 20.000,01 a R\$ 50.000,00, coordenado por Valdir de Queiroz Balbino vqbalbino@pq.cnpq.br. Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Pierre Teodósio Félix (Responsável);
Financiador(es): Ministério da Ciência e Tecnologia-MCT
- 2003 - 2004** Caracterização citogenética de polimorfismo de inversões em cromossomos politênicos de populações naturais de Drosophila.
Descrição: Projeto de pesquisa realizado no laboratório de Citogenética

da FAINTVISA

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Pierre Teodósio Félix (Responsável); Suellen Cristina da Cunha Dias

Financiador(es): Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão-FAINTVISA

1996 - 2002 Polimorfismo de inversões e mapeamento in situ do loco Hsp83 nos cromossomos politênicos de *Drosophila malerkotliana*

Descrição: PROGRAMA: 25001019037P-1 GENÉTICA - UFPE Entre as espécies do gênero *Drosophila*, a *Drosophila malerkotliana* tem se destacado na nossa região por sua fácil adaptação e um alto índice de ocorrência em detrimento das outras espécies do gênero. Esta espécie foi registrada no Brasil nos anos 70, e no Amazonas nos anos 80, onde foi observado um aumento das populações desta espécie em relação às outras. Coletas realizadas em Pernambuco na década de 60 indicavam as espécies do grupo willistoni e *D. melanogaster* como as mais frequentes. *Drosophila malerkotliana* prefere áreas de vegetação abertas (caatinga, cerrados, dunas e pastos) ocorrendo também em florestas de galeria e nas restingas, sendo encontrados indivíduos em parques e no lixo de São Paulo e no Rio Ivaí no Paraná. Foi relatada a dominância desta espécie numa reserva florestal próxima a Belém do Pará, na Amazônia, fenômeno que também ocorre em regiões da América Latina, como o Caribe. Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização citogenética de populações de *Drosophila malerkotliana* em locais do litoral Pernambucano. Nossos objetivos principais são : 1) Identificar as espécies de *Drosophila* ocorrentes nos diversos ambientes do Estado de Pernambuco; e 2) Realizar estudos citogenéticos das populações e em espécies de interesse; 3) Determinação das frequências relativas das espécies encontradas em cada local de coleta; 4) Construir um mapa politênico para as populações nordestinas de *D. malerkotliana*; 5) Localizar e descrever as inversões encontradas em relação ao mapa cromossômico de *D. malerkotliana*; 6) Determinação das frequências das inversões nas populações; e 7) Comparar os resultados obtidos com trabalhos prévios realizados em *D. malerkotliana* aqui em Recife.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Pierre Teodósio Félix Tania Tassinari Rieger; José Ferreira dos Santos (Responsável)

1996 - 2003 Diversidade de drosofilídios do Estado de Pernambuco

Descrição: PROGRAMA: 25001019037P-1 GENÉTICA - UFPE Os relatos sobre espécies de *Drosophila* do Nordeste são escassos, pois desde a década de 60 não têm sido realizados estudos sistemáticos destes

dípteros na Região. Há relatos da ocorrência de espécies dos grupos melanogaster e willistoni. Iniciamos um projeto de levantamento da diversidade de espécies e sua frequência relativa, em ambientes urbanos e reservas naturais da Região, principalmente do Estado de Pernambuco. O objetivo principal deste projeto é caracterizar a diversidade da fauna de drosofilídeos que ocorre na região visando selecionar espécies de interesse para futuras investigações.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (3);

Integrantes: Pierre Teodósio Félix Tania Tassinari Rieger (Responsável);

José Ferreira dos Santos; Sandra Vasconcelos de Oliveira Silva; Sérgio

Roberto da Costa Souza Leão Campos

Projeto de extensão

2005 - 2008 Reflorestágua

Descrição: Projeto de reflorestamento do rio tapacurá - parceria da SNE e CAMB (FAINTVISA)

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Pierre Teodósio Félix (Responsável);

Financiador(es): Colegio de Aplicação Faintvisa-CAMB, Petróleo Brasileiro - Rio de Janeiro - Matriz-PETROBRAS

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Francês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2000 Sócio Presidente, ASSOCIAÇÃO PERNAMBUCANA DE BIÓLOGOS

Produção

Produção bibliográfica

Livros publicados

1. FÉLIX, P. T.

Genética de populações - Uma Introdução ao Estudo dos Porcessos Evolutivos. recife : Livro Rápido- Elógica, 2008, v.100. p.130.

Apresentação de trabalho e palestra

1. FÉLIX, P. T.

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE); ABORDAGEM MULTIALGORÍTIMICA UTILIZANDO O GENE PERIOD, 2011. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Maria Anália da Silva. **A acessibilidade aos quadros funcionais da administração pública e os limites do Gestor ao poder de contratar**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
2. Marcondes Carneiro da Silva. **A Administração Gerencial e sua relação com a governança e a governabilidade nas organizações Públicas**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
3. Voleide Silva Vasconcelos. **A realidade do serviço social no cotidiano dos profissionais assistentes sociais na área de saúde do trabalhador**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
4. Vera Maria Travassos Oliveira. **A Reforma agrária: O assentamento das famílias em terras improdutivas na zona da mata de Pernambuco, a questão política e a interferência dos latifundiários**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
5. Eunice de Oliveira Santos de Santana. **A relação professor-aluno-aprendizagem**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
6. José Domingos dos Santos. **A seguridade social no Brasil, quem faz parte deste universo e de que forma**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
7. Ivani Gomes da Silva. **Acidentes com materiais biológicos ocorridos entre os profissionais de enfermagem de um hospital em Pernambuco**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
8. Marta Cristiani Brandão Araujo. **Análise das competências e expectativas do gestor Público: Um enfoque na gerência empreendedora e seus entraves**. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
9. Jeane Lima de Barros. **Caracterização Sócio-Sanitária e de Infra-estrutura na saúde Pública e sua Relação Evidente com a qualidade de vida nas comunidades**

carentes no Município de Jaboatão dos Guararapes.. 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

10. Iris Fernanda Souto Maior. **Consórcio Intermunicipal para o pólo de confecções do agreste pernambucano: A integração para o desenvolvimento.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

11. Ilse do Espírito Santo Silva. **Controle Interno na Administração Pública: A Busca por resultados.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

12. Alice Estácia da Conceição Marques. **Controle Social no SUS através dos conselhos de saúde: Espaço de construção de cidadania.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

13. Luiz Guilherme Passos Marinho. **Estratégias de Controle da Corrupção no Brasil.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

14. Monica Maria Melo de oliveira Siqueira. **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia- FACEPE 19 anos: Trajetória e Avanços.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

15. Nadja Bezerra da Silva. **Ganhos ambientais, orçamentários e sociais, adquiridos como gerenciamento público eficaz, na coleta seletiva de lixo.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

16. Alexsandro Araújo de Sena. **Gestão do Turismo no Litoral Pernambucano: O turismo Náutico no Litoral Norte.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

17. Paulo Gualberto de Sá Júnior. **Gestão em Saúde: Programa Nacional de Imunizações-PNI: Cobertura vacinal de crianças e adultos no hospital Geral de Areias. Recife-PE.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

18. Aline Bulhões Álvares Xavier. **Gestão escolar democrática.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

19. José Maurício Ferreira de Lima. **Gestão Pública de Mãos atadas.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

20. Maria das Graças Santana Ferreira. **Implantação do Plano de Grenciamento de resíduos sólidos no Hospital Getúlio Vargas. Recife-PE.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
21. Silvia Selma Alexandre da Silva. **implantação do processo de reciclagem de papel na administração Pública e privada: Possíveis contribuições na qualidade do meio ambiente e na arrecadação de fundos.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
22. Maria do Carmo Gomes da Silva. **implantação do projeto de capacitação dos(as) conselheiros(as) da saúde sobre o papel do controle social nas políticas públicas de saúde, visando ao fortalecimento do sistema único de saúde-SUS.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
23. Adenilda Félix de Araújo. **Incrá: Função Social da Terra- Propriedade Rural.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
24. Giovanna Vera Cruz dos Santos. **Indisciplina e violência no âmbito escolar.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
25. Marcelo da Rocha Teixeira. **Inovação na Administração Pública- Um estudo de caso na prefeitura da cidade de Camaragibe.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
26. Pollyana L'amour. **O consumo de drogas e o cotidiano escolar.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
27. Marly Wanderley Souto Maior. **O meio Ambiente e sua degradação.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
28. Gildo Rodrigues Alves. **Os conselhos de saúde como instrumento de controle social.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
29. Maria Clara Cavalcanti de Almeida. **Processo administrativo disciplinar: Um estudo de revisão sobre o gerenciamento do direito de defesa do acusado.** 2009. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão
30. Erivaldo Gumerindo de Souza Filho. **Acidentes no trânsito: Novas maneiras de Gestão na segurança de usuários da malha viária.** 2008. Monografia (Pós-

Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

31. Elvson Cardoso dos Santos. **Sistema de cotas na universidades brasileiras: Uma abordagem crítica**. 2008. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Pública) - Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão

Eventos

Participação em eventos

1. Conferencista no(a) **II CONIC/CONEX FAINTVISA**, 2012. (Oficina)
GENÉTICA FORENSES:USO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NA RESOLUÇÃO DE CRIMES.

2. Conferencista no(a) **I SIMPÓSIO DE ENTOMOLOGIA APLICADA**, 2010. (Simpósio)
Biotecnologia como ferramenta no manejo de insetos.

3. **IV WORKSHOP DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS**, 2010. (Oficina)

4. **1st Brazilian-German Meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy**, 2010. (Encontro)

Organização de evento

1. **FÉLIX, P. T.**

Evento em comemoração ao dia do Psicólogo, 2008. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **FÉLIX, P. T.**

Participação em banca de Wellington Luis da Cunha. **Caracterização in silico de sequências de Lutzomyia longipalpis(Diptera: Psycodidae)**, 2009 (Bacharelado Em Ciências Biológicas Ciências Ambientais) Universidade Federal de Pernambuco

2. **FÉLIX, P. T.**

Participação em banca de Tiago Levi Diniz Lima. **Estrutura genética de populações de Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psycodidae), vetor da Leishmania infantum chagasi**, 2009

(Curso de Bacharelado Em Ciências Biológicas) Universidade Federal Rural de Pernambuco

3. FÉLIX, P. T.

Participação em banca de ANA PAULA ALMEIDA DE OLIVEIRA. **CRIAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS DE SEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS DE LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA PSYCODIDADE)**, 2008

(Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade de Pernambuco

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	1
Livros publicados.....	1
Jornais de Notícias.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	8
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	4
Demais produções bibliográficas.....	2

Produção técnica

Trabalhos técnicos (assessoria).....	3
Trabalhos técnicos (consultoria).....	2
Curso de curta duração ministrado (extensão).....	3
Curso de curta duração ministrado (aperfeiçoamento).....	2

Orientações

Orientação concluída (monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização).....	31
Orientação concluída (iniciação científica).....	6
Orientação concluída (orientação de outra natureza).....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	17
Participações em eventos (simpósio).....	3
Participações em eventos (oficina).....	4
Participações em eventos (encontro).....	4
Organização de evento (congresso).....	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	4

Produção cultural

Outra produção artística/cultural.....	2
Demais trabalhos relevantes	
Demais trabalhos relevantes.....	1