

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

MOISÉS THIAGO DE SOUZA FREITAS

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS DO
COMPLEXO *Lutzomyia umbratilis* ATRAVÉS DE MARCADORES
MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

**Recife
2018**

MOISÉS THIAGO DE SOUZA FREITAS

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS
DO COMPLEXO *Lutzomyia umbratilis* ATRAVÉS DE
MARCADORES MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

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: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa

**Recife
2018**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Freitas, Moisés Thiago de Souza

Estruturação genética de populações alopátricas do complexo *Lutzomyia umbratilis* através de marcadores mitocondrial e nuclear/ Moisés Thiago de Souza Freitas- 2018.

63 folhas: il., fig.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Coorientador: Felipe Arley Costa Pessoa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Leishmaniose 2. *Lutzomyia* 3. Marcadores genéticos I. Balbino, Valdir de Queiroz (orient.) II. Pessoa, Felipe Arley Costa (coorient.) III. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-125

MOISÉS THIAGO DE SOUZA FREITAS

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS
DO COMPLEXO *Lutzomyia umbratilis* ATRAVÉS DE
MARCADORES MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

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.

Aprovado em 08/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antonio Mauro Rezende
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- Fiocruz-PE

Dr. Martin Alejandro Montes
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Carlos Henrique Nery Costa
Universidade Federal do Piauí

**Recife
2018**

Eu dedico este manuscrito a minha esposa em especial e a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por ter me concedido a bolsa de doutorado durante o período de anos.

Gostaria de agradecer também às instituições e aos laboratórios que forneceram a ajuda financeira e infraestrutura para a realização deste trabalho (Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz-AM e ao Programa de Pós Graduação em Genética - UFPE).

Deixo também meus sinceros agradecimentos a todos meus amigos que contribuíram de alguma forma para finalização desta etapa de vida acadêmica, então venho retribuir a todos pela ajuda, amizade e aprendizado durante todo este período, os quais foram de grande valia para minha formação acadêmica e pessoal.

Quero agradecer aos meus orientadores Valdir de Queiroz Balbino e Felipe Arley Costa Pessoa por seu comprometimento, amizade e serenidade no decorrer deste período de doutorado, além de ter propiciado todo o suporte e ajuda necessária para realização destes estudos e artigos científicos.

Agradeço a minha esposa Elaine Cristina Batista Ferreira por todo suporte, amor, dedicação e principalmente companheirismo durante esta período de pós graduação, mas que com toda certeza valeu a pena, pois nos trouxe maturidade e conhecimento suficiente para sabermos que poderemos transpor as adversidades da vida.

Deixo meus agradecimentos também a pesquisadora Cláudia Maria Ríos Velásquez do Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz Amazonas, por todo o suporte prestado durante este período na Pós-graduação.

"O homem, em sua arrogância, pensa de si mesmo como uma grande obra, merecedora da intervenção de uma divindade"

Charles Darwin, 1938

.

RESUMO

Na América do Sul, *Lutzomyia umbratilis* é o principal vetor de *Leishmania guyanensis*, uma das espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. No Brasil, *Lu. umbratilis* foi registrado na região Amazônica e no estado de Pernambuco, região Nordeste, onde foi identificada uma população isolada. Este estudo avaliou a estrutura filogeográfica e as diferenças de tamanho e forma da asa destas três populações brasileiras. Amostras de *Lu. umbratilis* foram coletadas de Rio Preto da Eva (norte do rio Amazonas), de Manacapuru (sul do rio Amazonas) e da população isolada do Recife, Pernambuco. Estas amostras foram processadas para obtenção de sequências do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* e do gene nuclear *period*. A análise morfométrica da forma de asa direita das três populações foi feita através de análise canônica discriminatória. A análise filogenética revelou a presença de dois clados monofiléticos distintos: um clado composto pelas amostras de Recife e Rio Preto da Eva e o outro por amostras de Manacapuru. A comparação da população de Manacapuru com as populações de Recife e Rio Preto da Eva gerou altos índices de divergência interpopulacional. A análise morfométrica indicou dois grupos distintos entre as populações estudadas. A análise discriminatória canônica da forma das asas indicou que a população de Rio Preto da Eva está significativamente mais próxima da população do Recife, e ambas as populações foram geneticamente distantes de Manacapuru. Os sítios polimórficos e a análise morfométrica indicam que a distância, a falta de continuidade e as diferenças ambientais não modificaram a relação ancestral entre as populações de Recife e Rio Preto da Eva. As semelhanças genéticas e morfológicas compartilhadas pelas populações de Recife e Rio Preto da Eva sugerem que essas populações estão mais estreitamente relacionadas evolutivamente. Estes resultados confirmam a existência de um complexo de *Lu. umbratilis* nas regiões Norte e Nordeste.

Palavras-chave: *Period*. *COI*. Filogeografia.

ABSTRACT

In South America, *Lutzomyia umbratilis* is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the species involved in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. In Brazil, *Lu. umbratilis* has been recorded in the Amazon region, and in the state of Pernambuco, Northeastern region, where an isolated population has been identified. This study assessed the phylogeographic structure and size and shape differences of the wing of three Brazilian populations. Samples of *Lu. umbratilis* were collected from Rio Preto da Eva (north of the Amazon River, Amazonas), from Manacapuru (south of the Amazon River), and from the isolated population in Recife, Pernambuco state. These samples were processed to obtain sequences of the Cytochrome *Oxidase I* mitochondrial gene and *period* nuclear gene. Geometrics morphometry analysis of the right wing shape of the three populations was made using discriminate canonical analysis. Phylogenetic analysis revealed the presence of two distinct monophyletic clades: one clade comprised of the Recife and Rio Preto da Eva samples, and the other clade comprised of the Manacapuru samples. Comparing the Manacapuru population with the Recife and Rio Preto da Eva populations generated high indices of interpopulational divergence. Geometric morphometry analysis indicated two distinct groups between the studied populations. Canonical variate analysis of wing shape indicated that Rio Preto da Eva population is significantly closer to Recife population, and both populations were genetically distant from Manacapuru. The polymorphic sites and geometric morphometry analysis indicate that the distance, lack of continuity and environmental differences have not modified the ancestral relationship between Recife and Rio Preto da Eva populations. The genetic and morphological similarities shared by the Recife and Rio Preto da Eva populations suggest that these populations are more closely related evolutionarily. These results confirm the existence of an *Lu. umbratilis* species complex in the North and Northeast regions.

Key-words: *Period*. *COI*. Filogeografia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania chagasi</i> nos hospedeiros..	10
FIGURA 2: Deformações cutâneas.....	11
FIGURA 3: Ciclo biológico de flebotomíneos do gênero <i>Lutzomyia</i> ..	13
FIGURA 4: Fêmea de flebotomíneo adulta e ingurgitada.....	14
FIGURA 5: Genoma mitocondrial.....	17
FIGURA 6: CAPÍTULO I.....	22
FIGURA 7: CAPÍTULO II.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LTA	- Leishmaniose Tegumentar Americana
WHO/OMS	- Organização Mundial de Saúde
COX I	- Citocromo Oxidase I
RFLP	- Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
RAPD	- Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
SSCP	- Polimorfismo de conformação de filamento único
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
mtDNA	- DNA mitocondrial
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
MG	- Morfometria geométrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	07
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	09
2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	09
2.2 <i>Lutzomyia umbratilis</i>	12
2.3 MARCADORES MOLECULARES.....	16
2.4 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA ALAR.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 CAPÍTULOS.....	22
4.1 CAPÍTULO I.....	22
4.2 CAPÍTULO II.....	34
6 DISCUSSÃO GERAL.....	42
7 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO A - CURRICULUM VITAE (LATTES).....	52

1 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) pertencem ao grupo de insetos com relevância na saúde pública pois possuem a capacidade de transmitir determinadas espécies de patógenos, dentre estes o agente etiológico causador da leishmaniose. Entre as espécies de flebotomíneos, *Lutzomyia umbratilis* destaca-se por ser o principal transmissor do parasito *Leishmania guyanensis*, sendo este um dos causadores da leishmaniose tegumentar Americana.

No Brasil, *Lu. umbratilis* apresenta ampla distribuição na região Norte, todavia existe uma população isolada na mata Atlântica remanescente do estado de Pernambuco. Na região Amazônica, esta espécie possui registros naturalmente infectados com *Le. guyanensis* apenas no lado leste do Rio Negro e norte do Rio Amazonas. No lado sul do Rio Amazonas, as populações de *Lu. umbratilis* apesar de abundantes não foram encontrados infectados com *Le. guyanensis*. Esses fatos levam a sugerir que este sistema fluvial poderia representar uma barreira geográfica para o ciclo de transmissão da *Le. guyanensis* na região amazônica. Em 1988, foi sugerido pela primeira vez que *Lu. umbratilis* poderia representar um complexo de espécies, uma vez que não foi observada a transmissão da *Le. guyanensis* no lado sul do rio Amazonas.

A partir destas primeiras evidências, estudos genéticos e bionômicos (e.g. fecundidade, longevidade e fertilidade) foram conduzidos em populações desta espécie na região Norte, sugerindo a existência de um complexo de espécies, com ao menos duas espécies incipientes.

Diversos estudos tem demonstrado que os rios amazônicos possuem papel relevante no processo de divergência genética e especiação de alguns grupos de insetos, principalmente em grupos com baixa capacidade de locomoção, contribuindo diretamente nas mudanças dos padrões evolutivos e o surgimento de espécies crípticas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a estrutura filogeográfica de três populações de *Lu. umbratilis*, sendo duas destas localizadas na região Norte (Rio Preto da Eva, AM e Manacapuru, AM) e a outra na região Nordeste (Recife, PE) através do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* e o gene nuclear *period*. Além das ferramentas moleculares,

nós fizemos uso da morfometria das asas como marcador morfológico para avaliar a estruturação destas populações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por aproximadamente 30 espécies de protozoários da família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. Devido à diversidade de agentes etiológicos, diferenças próprias dos hospedeiros e aspectos epidemiológicos as leishmanioses apresentam formas clínicas distintas: tegumentar (cutânea), tegumentar-mucosa e visceral (Lynne *et al.*, 1997).

Estas enfermidades são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças devido a alta taxa de incidência e capacidade de produzir deformações nos hospedeiros. Em torno de 95% dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. No mundo, mais de dois terços dos novos casos de LTA ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e República Árabe Síria. Estima-se que entre 0,6 milhão e 1 milhão de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo (WHO, 2016).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético, onde há uma alternância de hospedeiros, vivendo uma fase no vertebrado e outra no vetor, sendo este último responsável pela transmissão dos parasitas para os mamíferos (Figura 1) (Lainson *et al.*, 1978; Grimaldi *et al.*, 1989).

Espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas através das fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Estes parasitos apresentam-se na forma promastigota ou amastigota, sendo que os promastigotas se replicam no inseto vetor e os amastigotas são as formas presentes nos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Soares-Bezerra *et al.*, 2004). As formas replicativas são as amastigotas intracelulares, presentes em células do sistema fagocítico mononuclear, enquanto que as formas infectivas são as promastigotas (Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

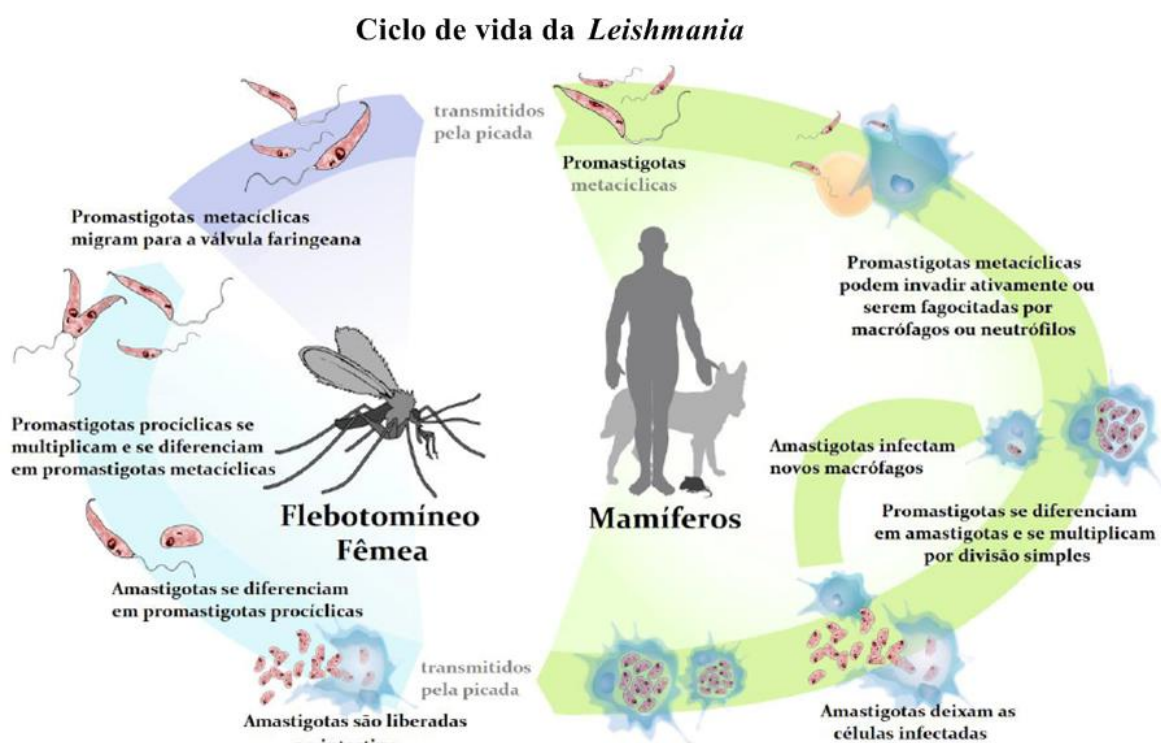


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania chagasi* nos hospedeiros (Fonte: www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/infogerais.htm).

As leishmanioses constituem enfermidades de animais silvestres (marsupiais, carnívoros desdentados e primatas), e mais raramente domésticos. O homem representa o hospedeiro eventual e parece não ter um papel relevante na manutenção dos parasitas na natureza. A inoculação do parasito pelo inseto determina uma lesão cutânea na porta de entrada, a qual pode regredir espontaneamente. Contudo, a infecção pode permanecer no hospedeiro transformando-se em lesões cutâneas, e posteriormente invadindo a mucosa nasofaríngea, podendo ocasionar diferentes quadros clínicos, dentre eles, as formas visceral e cutânea (Furtado, 1994; WHO, 2016).

A leishmaniose é uma das doenças mais antigas da humanidade, apresentando seus primeiros relatos na Ásia Central. De acordo com as regiões que ocorriam os casos, recebia denominações específicas, tais como: ferida de Balkh, nome de uma cidade do Afeganistão, botão de Aleppo, na Síria e botão de Bagdá, no Iraque. As primeiras descrições clínicas datadas referiam-se a uma doença que destruía o nariz e as cavidades bucais de índios na encosta da Cordilheira dos Andes, nos vales quentes e úmidos. Os relatos iniciais sobre o

papel do flebotomíneos na transmissão da LTA ocorreram no Peru, no final do século XVIII (Rey, 1992; Genaro, 2004).

No Brasil, Alexandre Cerqueira em 1885, na Bahia, foi o primeiro a identificar a doença e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Em 1908, durante a construção da estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, ocorreram inúmeros casos, principalmente na cidade de Bauru, ficando conhecida por úlcera-de-Baurú. Em 1911, Gaspar Vianna, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente etiológico da LTA (Gontijo e Carvalho, 2003).

Contudo, o papel dos flebotomíneos na transmissão do parasito causador da LTA foi confirmado apenas em 1922 (Brasil, 2007). Até o momento, seis espécies de *Leishmania* foram incriminadas como causadoras da LTA no Brasil, entre elas a *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* destaca-se por ser uma das espécies mais proeminentes quanto ao caráter epidemiológico (Gontijo e Carvalho, 2003).

A LTA é uma das afecções dermatológicas que merece elevada atenção no contexto da saúde pública, devido à magnitude da doença assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem (Figura 2). Além disto, esta doença ocasiona reflexos diretos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (WHO, 2016).



Figura 2: Deformações cutâneas (Fonte: [NEVES, David P. "Parasitologia Humana" 11ª ed. 2010](#)).

Na década de 80, a LTA apresentou registros em 19 Estados Brasileiros. Em 2003, casos autóctones foram confirmados em todas as Unidades Federativas do Brasil (Brasil, 2007). No período de 2007 a 2015 foram registrados mais de 250.000 casos, sendo as Regiões Norte e Nordeste com maiores incidências no país. A região Nordeste comporta pouco mais de 30% dos casos do Brasil (56.120), tendo a maior parte das incidências nos estados do Maranhão, Ceará, Bahia e Pernambuco (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2016).

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

2.2 *Lutzomyia umbratilis*

Os flebotomíneos são os responsáveis pela transmissão dos agentes etiológicos da leishmanioses tegumentar e visceral Americana (LTA e LVA, respectivamente). Estes insetos pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*. Este gênero está subdividido em vários subgêneros e espécies. Todavia, as fêmeas são as únicas responsáveis pela transmissão dos agentes etiológicos da LTA e LVA no momento da sua ingestão do sangue humano (Iglésias, 1997; Marcondes, 2001).

Flebotomíneos são insetos pequenos cujo tamanho varia de 1,5 a 3mm, olhos grandes, muito pilosos e de cor palha e castanho-claro, facilmente reconhecíveis pela maneira que adotam quando permanecem em repouso, pois as asas ficam entreabertas e ligeiramente erguidas. Por isso, este inseto também é conhecido como cangalha, cangalhinha, asa-dura, orelha-de-veado, palha,

birigui, tatuíra, bererê, tatuquira, murutinga, escangalhado e asa branca (Rey, 1992; Brasil, 1997; Marzochi *et al.*, 1999).

No mundo, segundo Bates *et al.* (2015) são conhecidas aproximadamente 990 espécies de flebotomíneos, das quais 60% se encontram na região Neotropical. No Brasil tem-se conhecimento de 273 espécies, e 27 delas possuem alguma implicação na transmissão da LTA (Shimabukuro *et al.*, 2016). Dentre as espécies encontradas no Brasil, pelo menos 147 são características de habitats essencialmente silvestres, ficando o contato com o ser humano restrito quando este entra no ambiente natural dos flebotomíneos (Aguiar, 2003; Lainson, 2005).

O ciclo biológico de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3) (Brazil e Brazil, 2003). Após a cópula, as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido, no solo, e com alto teor de matéria orgânica, para garantir a alimentação das larvas. O período de desenvolvimento ocorre entre 30 e 40 dias de acordo com a temperatura passando de ovo ao inseto adulto (Rangel e Lainson, 2003).

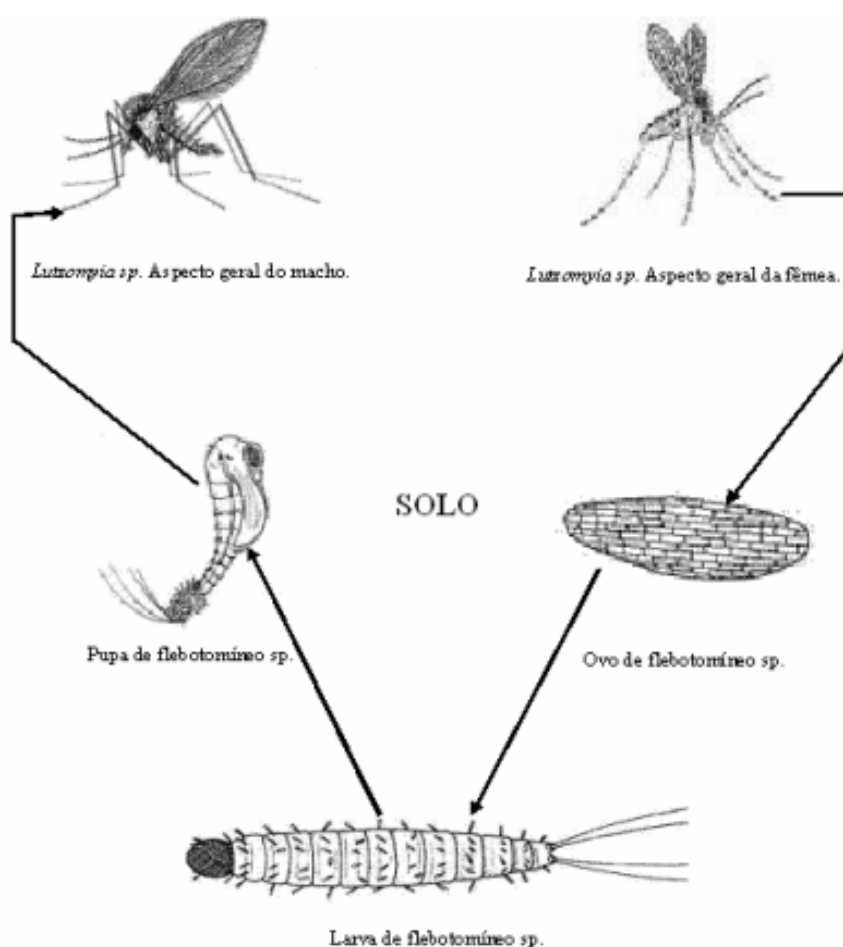


Figura 3: Ciclo biológico de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. (Fonte: [Brazil e Brazil, 2003](#)).

Apenas as fêmeas são hematófagas, sendo sua longevidade estimada em média de 20 dias (Figura 4). Elas apresentam hábitos variados, o que possibilita realizar o repasto sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados, inclusive nos seres humanos. Em áreas urbanas, o cão demonstra ser a principal fonte de alimentação no ambiente doméstico (Marcondes, 2001; Rey, 2001).



Figura 4: Fêmea de flebotomíneo adulta, ingurgitada (Fonte: www.parasitologia.icb.ufmg.br).

A transmissão dos parasitos se dá quando as fêmeas dos flebotomíneos sugam sangue infectado de animais mamíferos silvestres, domésticos ou do homem, ingerindo macrófagos parasitados por formas amastigotas. Após a infecção das fêmeas pelo parasito, elas podem realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberando as formas promastigotas metacíclicas juntamente a sua saliva (Desjeux, 2004).

Os flebotomíneos apresentam hábitos crepusculares e noturnos e podem ser encontrados em tocas de animais, currais, chiqueiros, podendo invadir residências e abrigar-se em locais mais escuros. Os flebotomíneos possuem normalmente uma baixa capacidade de voo, o qual se caracteriza por um aspecto saltitante, tendo um raio de ação bem limitado (inferior a 200 metros) (Alexander, 1987; Rey, 1992; Iglésias, 1997; Marzochi *et al.*, 1999).

De acordo com Young e Duncan (1994) e Marcondes (2001), as principais espécies transmissoras do parasita ao homem e animais no Brasil são: *Lutzomyia anduzei* (Rozeboom, 1942), *Lutzomyia antunesi* (Coutinho, 1939), *Lutzomyia ayrozai* (Barretto e Coutinho, 1940), *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931), *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912), *Lutzomyia migonei* (França, 1920), *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926), *Lutzomyia olmeca bicolor* (Fairchild e Theodor, 1971), *Lutzomyia olmeca nociva* (Young e Arias, 1982), *Lutzomyia paraensis* (Costa Lima, 1941), *Lutzomyia pessoai* (Coutinho e Barretto, 1940), *Lutzomyia quamiventrís squamiventrís* (Lutz e Neiva, 1912), *Lutzomyia tuberculata* (Mangabeira, 1941), *Lutzomyia ubiquitallis* (Mangabeira 1942), *Lutzomyia umbratilis* (Ward e Fraiha, 1977), *Lutzomyia wellcomi* (Fraiha, Shaw e Lainson, 1971) e *Lutzomyia whitmani* (Antunes e Coutinho, 1939).

Em estudo realizado por Lainson e Shaw (2005) foi sugerido que os agentes patogênicos *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (Lainson e Shaw, 1972); *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Floch, 1954) e *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* (Vianna, 1991) são os principais causadores da LTA.

Lutzomyia (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward e Fraiha (Diptera: Psychodidae) é o principal vetor da *Leishmania guyanensis*, agente etiológico da LTA (Lainson *et al.*, 1976; 1979; 1981). Esta espécie está presente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela, tendo sua distribuição interligada primordialmente a floresta amazônica (Aguilar e Medeiros, 2003).

No Brasil, *Lu. umbratilis* apresenta uma ampla distribuição na bacia amazônica, todavia existe uma população isolada na remanescente Mata Atlântica do estado de Pernambuco, região Nordeste (Balbino *et al.*, 2001), onde pouco se sabe sobre a sua importância epidemiológica na transmissão da *Le. guyanensis*. A descontinuidade de distribuição e a baixa capacidade de dispersão dos flebotomíneos podem promover a especiação alopátrica, ou seja, uma subestruturação ocasionada pelo interrompimento do fluxo gênico dentro de populações (De Queiroz, 1998).

Na região Amazônica, onde esta espécie vem sendo estudada durante algum tempo devido a sua importância médica, há registros de *Lu. umbratilis* naturalmente infectados com *Le. guyanensis* apenas no lado Leste do Rio Negro e do lado Norte do Rio Amazonas (Arias e Freitas 1977; 1978; Arias *et al.*, 1981;

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

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Marcador molecular pode ser definido como uma característica molecular oriunda de um organismo que pode ser visto ou medido, direta ou indiretamente, através de diferentes técnicas, as quais podem fornecer informações sobre o genótipo do indivíduo (Avisé, 1994). O uso de marcadores moleculares nas pesquisas tem auxiliado no monitoramento, diferenciação, classificação e estabelecimento das relações genealógicas ou filogenéticas; estes marcadores podem ser classificados em duas categorias bioquímicos e genéticos (moleculares) e sua utilização depende estritamente da abordagem a ser utilizada na pesquisa (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Parker *et al.*, 1998; Walker e Rapley, 2000).

Os marcadores genéticos são mais versáteis do que os bioquímicos (e.g. isoenzimas), pois permitem ser avaliados por uma variedade de técnicas, tais como RFLP (Aransay *et al.*, 1999), hibridação da cadeia de DNA (Maingon *et al.*, 1993), RAPD-PCR (Adamson *et al.*, 1993; Dvorak *et al.*, 2006; Maingon *et al.*, 1993), SSCP (Arrivillaga *et al.*, 2003), microssatélites (Ready, 1999; Aransay *et al.*, 2003; Maingon *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2005; Day e Hamarsheh *et al.*, 2006) ou sequenciamento de DNA (Vivero *et al.*, 2007). Os marcadores genéticos podem ser classificados de acordo com o local do genoma analisado, tal como o genoma mitocondrial ou genoma nuclear. A diferença dos padrões de herança pode ser muito útil em estudos taxonômicos, sistemáticos, filogenéticos ou filogeográficos (Avisé *et al.*, 1987; Simon *et al.*, 1994; Kambhampati e Smith, 1995; Essegir *et al.*, 1997; Togerson *et al.*, 2003; Beati *et al.*, 2004).

Desde as décadas de 70-80, o DNA mitocondrial (mtDNA) (Figura 5) passou a fazer parte de muitos estudos envolvendo estruturação genética, genética de populações, filogenia e filogeografia (Wilson *et al.*, 1985; Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Avise, 1994).

Dentre as principais características podemos citar: um genoma pequeno e circular, a herança materna e ausência de recombinação, a presença de poucos genes, 37 no total (13 genes codificadores de proteínas, 22 para RNA transportadores e 2 para as subunidades ribossômicas). Estes genes possuem uma taxa de substituição elevada, quando comparada ao genoma nuclear. Por apresentar estas características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas, o genoma mitocondrial tem chamado a atenção dos pesquisadores para aplicação em diversos estudos evolutivos (Avise, 1994).

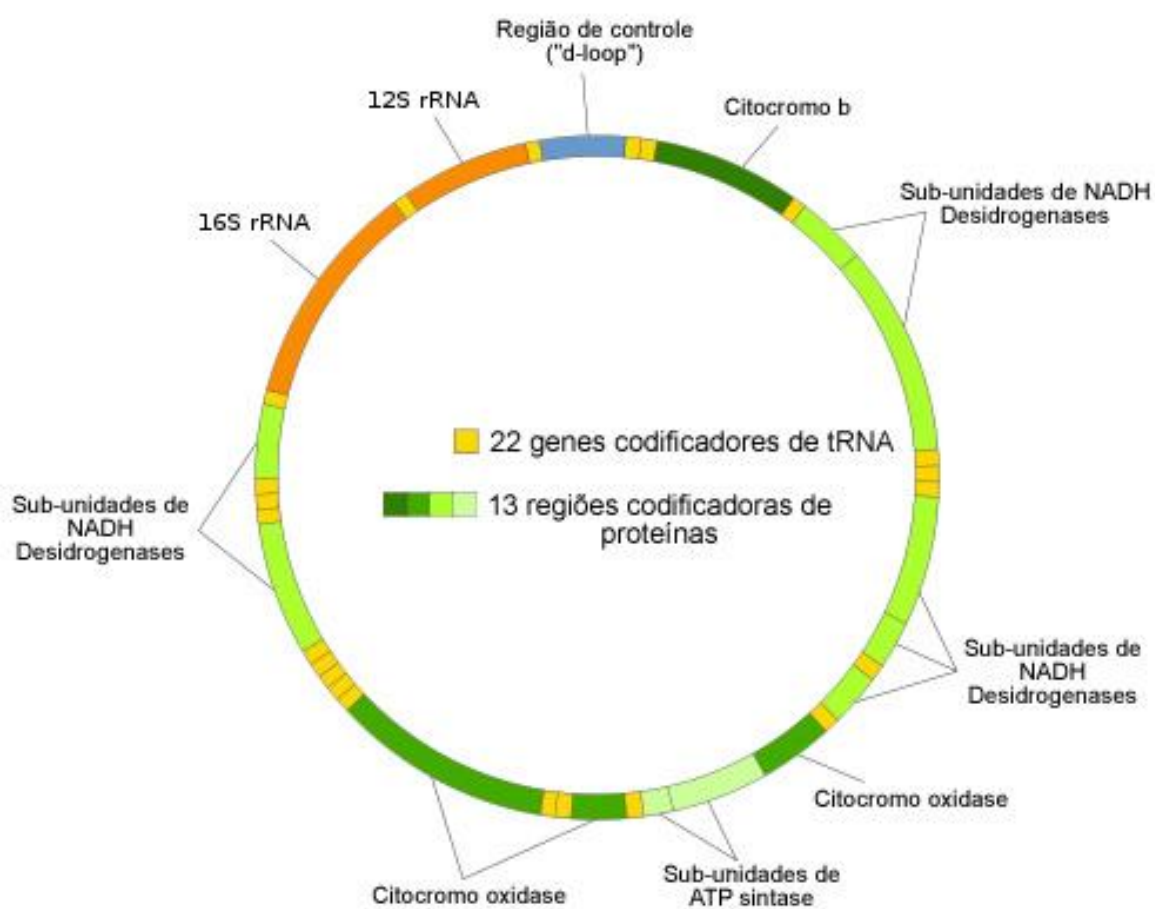


Figura 5: Genoma mitocondrial (Fonte: <https://netnature.files.wordpress.com/2015/06/sem-tc3adtulo22.png>)

Dentre os genes mitocondriais, *Citocromo Oxidase I* (COX I) possui uma maior amplitude de sinal filogenético. Em comum com outros genes codificadores de proteínas, seus nucleotídeos de terceira posição mostram uma elevada incidência de substituições de bases, levando a uma taxa de evolução molecular que é cerca de três vezes maior do que 12S ou 16S (Knowlton e Weigt, 1998). Na verdade, a evolução deste gene é suficientemente rápida para permitir a discriminação de não apenas espécies intimamente associadas, mas também grupos filogeográficas dentro de uma única espécie (Cox e Hebert 2001; Wares e Cunningham, 2001). O gene COX I apresenta características que podem proporcionar uma das mais profundas percepções fitogeográficas do que as alternativas (e.g. *Citocromo B*), entretanto estudos tem demonstrado que este gene pode ser também utilizado em conjunto com outros genes mitocondriais para resolver casos de divergência recente (Simmons e Weller, 2001).

Apesar do elevado sinal filogenético, estas alterações não acarretam na mudança da sequência de aminoácidos, sendo esta mais lenta neste gene do que em qualquer outro gene mitocondrial (Lynch e Jarrell, 1993). Estudos sobre a filogenia molecular de artrópodes sugerem que o gene mitocondrial COX I pode ser informativo para esclarecer a taxonomia de espécies vetoras à nível de espécie (Navajas *et al.*, 1994; Navajas *et al.*, 1996; Navajas *et al.*, 1998; Roderick e Gillespie, 1998). O gene COX I já foi utilizado previamente para estudar os complexos de espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia umbratilis*, *Anopheles albitarsis* e *Triatoma brasiliensis* obtendo-se considerável eficiência para identificação da subestruturação genética dentro destas populações (Arrivillaga *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2004; Scarpassa e Alencar, 2012; Gomez *et al.*, 2013).

Os marcadores nucleares tem sido também bastante utilizado para diferenciação entre espécies crípticas e identificar a variação genética entre as populações (Bauzer *et al.*, 2002; Waycott *et al.*, 2002; Uchimura *et al.*, 2006). Em *Drosophila melanogaster*, genes que controlam o comportamento reprodutivo foram isolados e clonados; estes marcadores moleculares têm um enorme potencial para a análise intra e interpopulacional. Entre estes, o gene *period* é particularmente importante porque ele controla os ritmos das atividades locomotora (Konopka e Benzer, 1971), e controla uma característica dos "sons copulatórios" que os machos produzem durante o cortejo (Kyriacou e Hall, 1980). Ambas características comportamentais têm sido implicados na manutenção de

isolamento sexual entre espécies (Kyriacou e Hall, 1980, 1982, 1986; Ritchie *et al.*, 1999; Sakai e Ishida, 2001). Portanto, o gene *period* tem sido chamado de "gene de especiação", porque controla as diferenças de ritmos dos sons copulatórios que podem contribuir para o isolamento reprodutivo (Coyne, 1992).

Em flebótomos, o gene *period* também tem sido utilizado em estudos de genética de populações para identificar possíveis membros do complexo *Lutzomyia longipalpis* no Brasil (Bauzer *et al.*, 2002, 2007). Em um recente estudo, o gene *period* revelou estruturação geográfica moderada entre populações de *L. longipalpis* do estado do Ceará, e revelou uma variabilidade significativa entre os fenótipos 1mancha (1S) e 2 manchas (2S) abdominais nesta espécie (Costa-Junior *et al.*, 2015) .

2.4 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA ALAR

Inicialmente, esse termo referia-se a diferentes estudos que analisassem quantitativamente a variação morfológica dos mais diversos grupos de organismos. A morfometria era baseada na comparação dos valores médios de uma ou mais medidas das estruturas morfológicas. No entanto, desde a década de 1990, novas técnicas surgiram, permitindo a descrição da variação na forma das estruturas morfológicas intra e interpopulacional, e então auxiliando de maneira relevante a descrição da origem ecológica ou filogenética de diversos grupos de organismos (Monteiro e Reis 1999; Dujardin, 2008; Demari-Silva *et al.*, 2014).

A morfometria geométrica tem se constituído uma área de conhecimento extremamente nova, uma vez que sua aplicabilidade e importância começaram a ser percebidas mais recentemente através dos estudos implementados em diversos grupos de espécies (Dujardin, 2008). Hoje já representa uma ferramenta importante em análises taxonômicas e sistemáticas, apresentando algumas vantagens em comparação à morfometria tradicional. Esta técnica baseia-se no uso de coordenadas cartesianas de marcos anatômicos e métodos de superposição para obter a configuração consenso desses pontos anatômicos homólogos (*landmarks*). A vantagem da utilização de coordenadas é poder analisar a forma das estruturas, apresentar de maneira gráfica suas diferenças e indicar com precisão as regiões onde se concentram o maior número de

variações, possibilitando a reconstrução da forma após a realização das análises multivariadas (Rohlf e Marcus, 1993).

As principais vantagens da utilização da técnica da morfometria geométrica com o intuito de realizar a diferenciação de espécies, é a velocidade da coleta de material de teste (várias imagens de asas podem ser digitalizadas e analisadas em um mesmo dia), o baixo custo do processo (pois somente necessita de material para digitalização de imagens) e o material que pode ser facilmente obtido tanto de exemplares secos quanto frescos (Lyra *et al.*, 2010). Entretanto, as normas técnicas sugerem que asas não podem estar danificadas, o que, comparado a tantas outras técnicas disponíveis não representa uma desvantagem tão contundente (Lyra *et al.*, 2010). Análises moleculares, técnicas mais utilizadas atualmente juntamente à taxonomia para discriminação de espécies, necessita da utilização de equipamentos e reagentes onerosos para aplicação deste tipo de técnica, além de haver a necessidade de tempo e experiência para a interpretação dos resultados (Calle *et al.*, 2008). Por essas razões, a morfometria geométrica se apresenta como um tipo de técnica que permite, com menor custo e tempo, diferenciar espécies com um alto grau de confiança (Calle *et al.*, 2008) atuando como uma alternativa de análise muito eficiente.

As técnicas de morfometria têm sido muito aplicadas em diversos estudos envolvendo insetos de interesse médico como os mosquitos do gênero *Anopheles* (Calle *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2012), *Aedes* (Jirakanjanakit e Dujardin, 2005; Vidal *et al.*, 2012) triatomíneos (Dujardin *et al.*, 1997; Dujardin, 2008) e *Culex* (Demari-Silva *et al.*, 2014). Com relação aos flebotomíneos, a utilização dessa técnica pode ser vista na literatura em alguns estudos mais recentes os quais empregam para resolução de problemas taxonômicos, sistemáticos e descrições de variações morfológicas e populacionais (Prudhomme *et al.*, 2012).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Comparar os padrões de diferenciação genética entre populações alopátricas de *Lutzomyia umbratilis* distribuídas nas regiões Norte e Nordeste através de marcadores moleculares e morfológicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a estruturação genética e filogeografia de três populações naturais de *Lutzomyia umbratilis*, sendo duas do estado do Amazonas (Rio Preto da Eva e Manacapuru) e uma de Pernambuco (Recife) através dos marcadores moleculares *COX I* e *period*.
- b) Avaliar o papel do Rio Amazonas como barreira geográfica para o fluxo gênico das populações de *Lutzomyia umbratilis* encontradas ao norte e sul da Bacia Amazônica.

4 CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO I

Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Moises Thiago de Souza Freitas¹

Email: moisestsf@hotmail.com

Claudia Maria Ríos-Velasquez³

Email: criosvelasquez@gmail.com

César Raimundo Lima Costa Jr¹

Email: cjrs@iq.com.br

Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Jr¹

Email: cjsantifigo@hotmail.com

Nádia Consuelo Aragão¹

Email: nadibr2@yahoo.com.br

Lidiane Gomes da Silva¹

Email: lidianegomesp@hotmail.com

Marcus Vinicius de Aragão Batista⁴

Email: genetics_marcus@hotmail.com

Teresa Cristina Leal Balbino²

Email: cristina@cpqam.fiocruz.br

Felipe Arley Costa Pessoa³

Email: facpessoa@gmail.com

Valdir de Queiroz Balbino^{1*}

* Corresponding author

Email: vqbalbino@gmail.com

¹ Departament of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil

² Departament of Microbiology, Research Center Aggeu Magalhaes, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil

³ Laboratory of Infectious Disease Ecology in the Amazon, Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69.057-070 Manaus, Amazonas, Brazil.

⁴ Department of Biology, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n - Rosa Elze, São Cristóvão, 49100-000 Aracajú, Sergipe, Brazil.



RESEARCH

Open Access



Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*

Moises Thiago de Souza Freitas¹, Claudia Maria Ríos-Velasquez³, César Raimundo Lima Costa Jr¹, Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Jr¹, Nádia Consuelo Aragão¹, Lidianne Gomes da Silva¹, Marcus Vinicius de Aragão Batista⁴, Teresa Cristina Leal Balbino², Felipe Arley Costa Pessoa³ and Valdir de Queiroz Balbino^{1*}

Abstract

Background: In South America, *Lutzomyia umbratilis* is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the species involved in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. In Brazil, *L. umbratilis* has been recorded in the Amazon region, and in the state of Pernambuco, Northeastern region, where an isolated population has been identified. This study assessed the phylogeographic structure and size and shape differences of the wing of three Brazilian populations.

Methods: Samples of *L. umbratilis* were collected from Rio Preto da Eva (north of the Amazon River, Amazonas), from Manacapuru (south of the Amazon River), and from the isolated population in Recife, Pernambuco state. These samples were processed to obtain sequences of the Cytochrome Oxidase I mitochondrial gene. Geometric morphometry analysis of the right wing shape of the three populations was made using discriminate canonical analysis.

Results: Phylogenetic analysis revealed the presence of two distinct monophyletic clades: one clade comprised of the Recife and Rio Preto da Eva samples, and the other clade comprised of the Manacapuru samples. Comparing the Manacapuru population with the Recife and Rio Preto da Eva populations generated high indices of interpopulational divergence. Geometric morphometry analysis indicated two distinct groups between the studied populations. Canonical variate analysis of wing shape indicated that Rio Preto da Eva population is significantly closer to Recife population, and both populations were genetically distant from Manacapuru.

Conclusion: The polymorphic sites and geometric morphometry analysis indicate that the distance, lack of continuity and environmental differences have not modified the ancestral relationship between Recife and Rio Preto da Eva populations. The genetic and morphological similarities shared by the Recife and Rio Preto da Eva populations suggest that these populations are more closely related evolutionarily. These results confirm the existence of an *L. umbratilis* species complex in the North and Northeast regions.

Keywords: *Lutzomyia umbratilis*, Species complex, Phylogenetic analysis, Geometric morphometry

* Correspondence: vqbalbino@gmail.com

¹Department of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50732-970, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 de Souza Freitas et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Lutzomyia umbratilis (Diptera: Psychodidae) is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the pathogenic agents of American tegumentary leishmaniasis (ATL) [1–3]. This species is found in Brazil, Bolivia, Colombia, French Guyana, Guyana, Peru, Suriname and Venezuela [4, 5]. In Brazil, *L. umbratilis* is widely distributed in the Amazon basin and there is an isolated population in remnants of the Brazilian Atlantic rain forest in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil [4–6]. Of the states in the Northeastern Region, Pernambuco has the third highest number of ATL cases reported in Metropolitan Regions [7]. On the other side of Brazil, in the Amazon region, the presence of *L. umbratilis* naturally infected with *Leishmania guyanensis* has been recorded on the east side of the Negro River and the north side of the Amazon River, but not on the south side [8]. In the state of Amazonas, 12,005 cases of ATL were registered between 1994 and 2005; in 2003, 60.18 % of ATL cases occurred in the city of Manaus, where *L. umbratilis* is recognized as the most significant vector [9, 10].

Considerable geographic distance separates the *L. umbratilis* populations of the North and Northeast Regions. The low dispersal capacity and geographic isolation of sand flies may result in population structuring, which is amplified by the presence of abiotic barriers [11–13]. The *L. umbratilis* populations of the North and Northeast Regions are separated by distance and abiotic barriers significant enough to suggest that these individuals may have evolved into genetically differentiated populations.

Bionomical (e.g. fecundity, fertility, and duration of larval development) and genetic differences between *L. umbratilis* populations on the north and south sides of the Amazon River, suggest that these populations might represent a species complex comprised of at least two incipient species [14, 15]. In light of this possibility, this study aimed to assess the evolutionary relationships between populations of *L. umbratilis* from the states of Pernambuco and Amazonas.

Methods

Field collection and identification of phlebotomine sand flies

Field collections were done in Rio Preto da Eva (north of the Amazon River, Amazonas) (2°50'50"S/59°56'28"W), from Manacapuru (south of the Amazon River) (3°12'41"S/60°26'20") municipalities, located in the Amazonas State, North Region of Brazil, and in the Atlantic Forest Ecological Reserve of Dois Irmãos (8°03'14"S/34°52'52"W) in Recife Municipality, Pernambuco State, Northeast Region of Brazil.

Adult specimens were collected by suction in tree trunks using CDC light traps. The samples were conserved in

95 % alcohol, at -20 °C. The genitalia of the individuals were slide mounted and stored as a voucher, and the sand flies were identified using the keys of Young and Duncan [4].

DNA extraction, PCR, and sequencing

In all, 201 specimens of *L. umbratilis* were used in the experiments geometric morphometry and molecular biology. For molecular analysis, 129 specimens of *L. umbratilis* were used: 36 from Manacapuru (24 males and 12 females); 38 from Rio Preto da Eva (15 males and 23 females); and 55 from Recife (25 males and 30 females).

Genomic DNA extraction was carried out using Chelex®100 (BioRad, Berkeley, California, USA), according to Lima Costa-Junior *et al.* [16]. A fragment of 597 bp of the Cytochrome Oxidase I (COI) was amplified by PCR using the universal primers CI-J-1632 (+): 5-TGATCAAATTTATAAT-3 and CI-N-2191 (-): 5-GGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3, described by Simon *et al.* [17]. Amplification reactions were done using the Mix Go Taq Colorless kit, according to manufacturer specifications (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). PCR products were visualized in 1 % agarose gel through UV light and they were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). Sequencing was carried out in ABI 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA). Only sequences with a Phred score above 30 were used in the analysis. Contig assembly was carried out using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Local alignments were done using BLAST [18]. All new sequences produced in this study have been deposited in GenBank under accession numbers: KM407009 to KM407137.

Phylogenetic analysis

Nucleotide sequences were aligned using Muscle [19], incorporated in MEGA v. 5.0 [20]. Phylogenetic analysis was carried out with the Maximum Likelihood criterion using PhyML [21]. The evolutionary model that best fits the data was HKY + G, according to jModelTest [22]. The consistency of the branches was assessed using 1000 bootstrap replicates. *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia migonei* and *Phlebotomus papatasi* were used as the outgroup.

Divergence time estimate

The time at which the two main clades diverged (into the Manacapuru and Rio Preto/Recife isolates) was estimated with a relaxed molecular clock using BEAST v. 1.7.5 [23]. The analysis was done for 10,000,000 generations, sampling every 1000 generations. The nucleotide substitution model used was HKY + G. An uncorrelated lognormal clock and a tree prior with Yulebirth process

were used. The tree with the higher clade Bayesian Posterior Probabilities (BPP) was obtained with TreeAnnotator v. 1.7.5 (available in BEAST package), using the *meanheights* option and 10,000 trees as burnin to assure stationarity.

Genetic diversity

Intra-population genetic diversity was measured by the haplotype and nucleotide diversity, K value (number of genetic groups), number of polymorphic sites, and number of transitions and transversions using DnaSP v. 4.0 [24] and Arlequin v. 3.5 [25]. The frequencies of polymorphic sites were also assessed using WebLogo tool (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Tajima's D neutrality test, Fu's F_s statistics, and the Mismatch distribution were performed using Arlequin v. 3.5 [25]. The Raggedness index (r) and the Sum of squared deviations (SSD) were used in order to validate the model of recent expansion obtained using the Mismatch distribution. Genetic differentiation was assessed with the pairwise fixation index F_{st} using Arlequin v. 3.5 [25].

The average number of substitutions per site among populations (D_{xy}), the total number of substitutions per site among populations (D_a), the number of shared polymorphisms among populations (S_s), and the number of fixed differences among populations (S_f) were calculated using DnaSP v. 4.0 [24].

The haplotype network was created with NETWORK v. 4.6 (www.fluxus-engineering.com) using the Median-joining method [26] to verify the level of haplotype sharing and distribution frequency among the populations.

Population structure

Genetic structure analysis was performed using Structure v. 2.3 [27]. Interactions were carried out with 20,000 interactions of burning, followed by 200,000 generations of Markov Chain Monte Carlo, adjusted 1 to 10 for each "K" population. Ad hoc quantity ΔK [28] was used to determine the most accurate number of "K" groups.

Geometric morphometry of the wings

The right wings of adult females of *L. umbratilis* from the municipalities of Rio Preto da Eva ($n = 18$), Manacapuru ($n = 27$) and Recife ($n = 27$) were dissected with forceps and mounted between microscope slide and cover slide using Berlese fluid. Images of each wing were obtained at 4× magnification using a JVC KY-F55 digital camera coupled to a Leica DM 1000 optical microscope.

A total of eight 'type I' landmarks (LM) were identified (Fig. 1), all in the wing venation intersections [29]. The coordinates of wing landmarks were digitized using the TpsDig2 v 2.18 (QSC - James Rohlf). The shape variables were calculated with *tpsRelW* v. 1.46. MOGwin v. 0.82

was used to analyze the shape variables by the generalized Procrustes analysis superimposition algorithm (GPA) [30].

The GPA algorithm was used to extract the centroid size; allowing size and shape to be analyzed separately. Size variations were analyzed using the Kruskal-Wallis test. The effect of allometry was analyzed by regression analysis using the coordinates of the landmarks and the centroid size for the three populations. Discriminant analysis of the canonical variables was performed to compare the shape with the overall mean wing size of each population, and the Mahalanobis distances were calculated using 10,000 permutations. To the morphometric statistical analyses we used the softwares TpsUtil 1.60, TpsDig2 v 2.18 (QSC - James Rohlf), TpsRelw 1.54 (QSC - James Rohlf), Tet, MorphoJ 1.06 and Past Program (Paleontological Statistics) v. 2.00.

Results

Molecular analysis

Altogether, 129 specimens of *L. umbratilis* were analyzed. Across the region of sequence analyzed (597 bp), 66 (12.2 %) polymorphic sites observed; these were comprised of 42 (~63.6 %) parsimony-informative sites and 24 (~36.4 %) singletons. Among the polymorphic sites, 84.9 % of the nucleotide substitutions were transitions and 15.1 % were transversions. Analysis of the polymorphic sites identified 13 fixed single nucleotide polymorphisms (SNP) within the 597 bp fragment of COI used in our analyses (Fig. 2). Indels and non-synonymous nucleotide substitutions were not found.

The Maximum Likelihood analysis indicated difference, revealing two distinct clades, well-supported with bootstrap values of 93 and 99 %, respectively (Fig. 3). This result indicates that the Recife and Rio Preto da Eva populations are more closely related evolutionarily, which reinforces the possibility that Recife individuals are ancestrally linked to individuals from the northern margin of the Amazon River.

Genetic-structure analysis indicated that the populations studied divide into two main subgroups, with the *ad hoc* quantity supporting the number $K = 2$. Cluster analysis corroborated the separation of the samples into two clades (Fig. 4). Bayesian inference showed that the separation of these two clades occurred between 0.79 and 1.68 Mya—sometime between the Pleistocene and Pliocene.

There were 51 alleles observed across the three populations. The most frequent haplotypes were H2, shared by 21 Manacapuru individuals, and H16, shared by 15 Recife and Rio Preto da Eva individuals (Fig. 5). The greatest number of haplotypes was observed in the Recife and Rio Preto da Eva populations representing 76.4 % of the total alleles, which shows that these populations possess a higher level of genetic diversity.

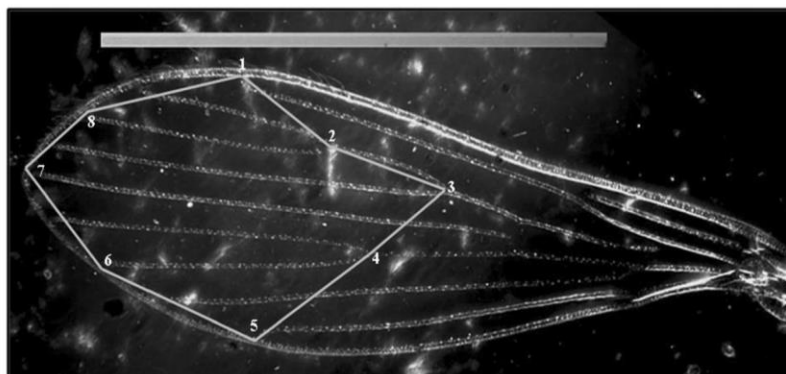


Fig. 1 Photograph of the right wing of *L. umbratilis* female, showing the position of landmarks (LM). The numbers indicate the order of LM collection; their junction forms a geometric shape. Scale: 1 mm

Intrapopulation analysis of *L. umbratilis* specimens revealed a higher level of nucleotide and haplotype diversity in specimens from Rio Preto da Eva and Recife, than in specimens from Manacapuru (Table 1).

In addition, the Rio Preto da Eva and Recife populations exhibited a higher level of differentiation than the Manacapuru population, which reflects the high level of genetic divergence that exists between the two clades (Table 2).

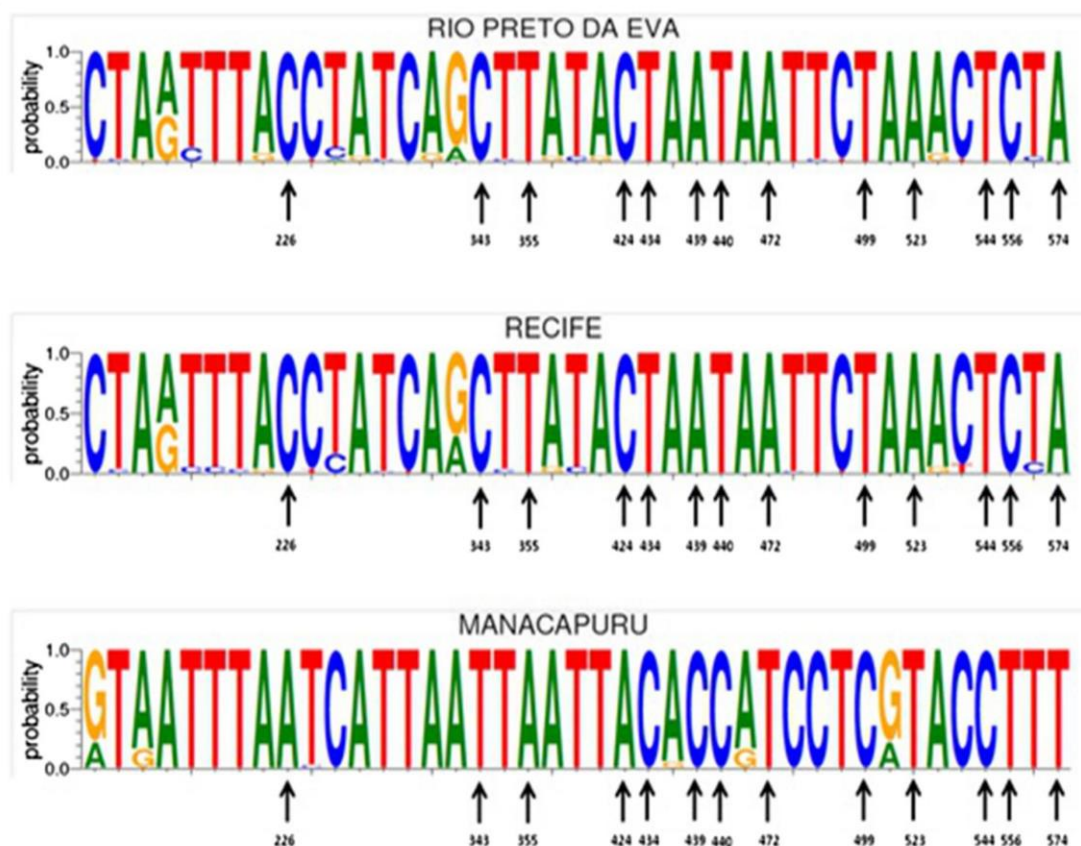
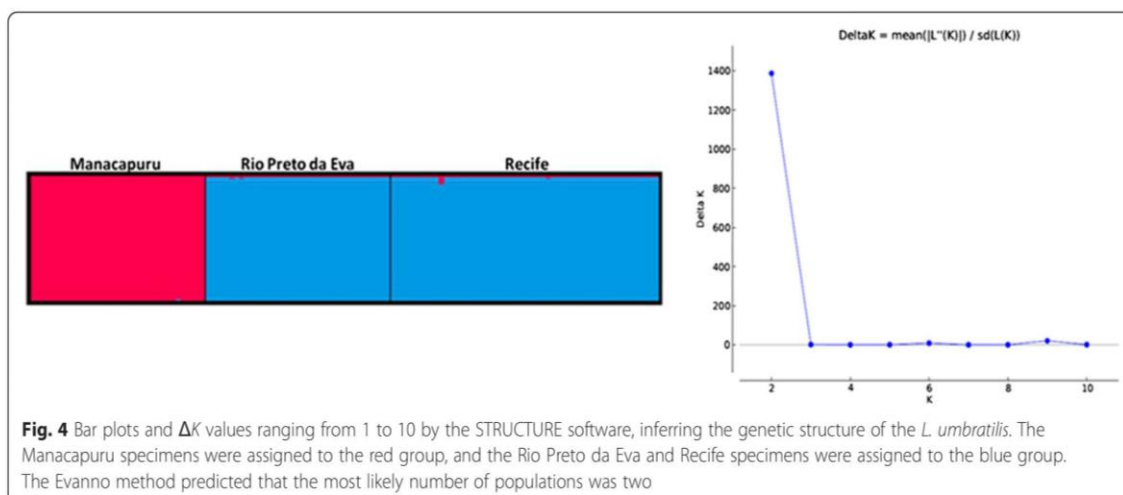
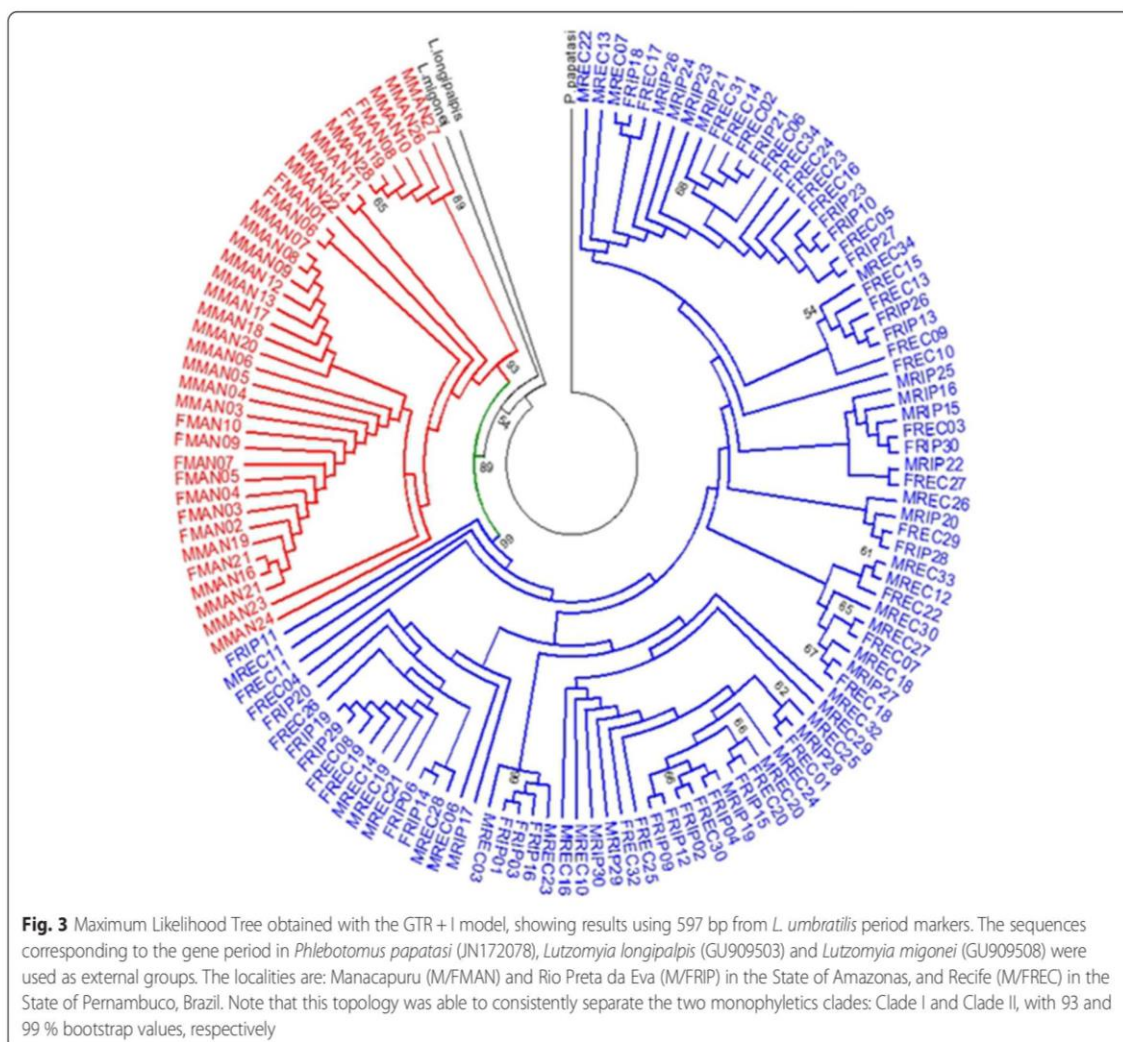


Fig. 2 Schematic representation of polymorphisms of a fragment of 597 bp of the gene Cytochrome Oxidase I using Weblog. Shown are the sequences obtained from *L. umbratilis* collected in Recife, State of Pernambuco, Rio Preto da Eva and Manacapuru, State of Amazonas, Brazil. Font size is indicative of the frequency of a nucleotide at any given site. Fixed (black arrows)



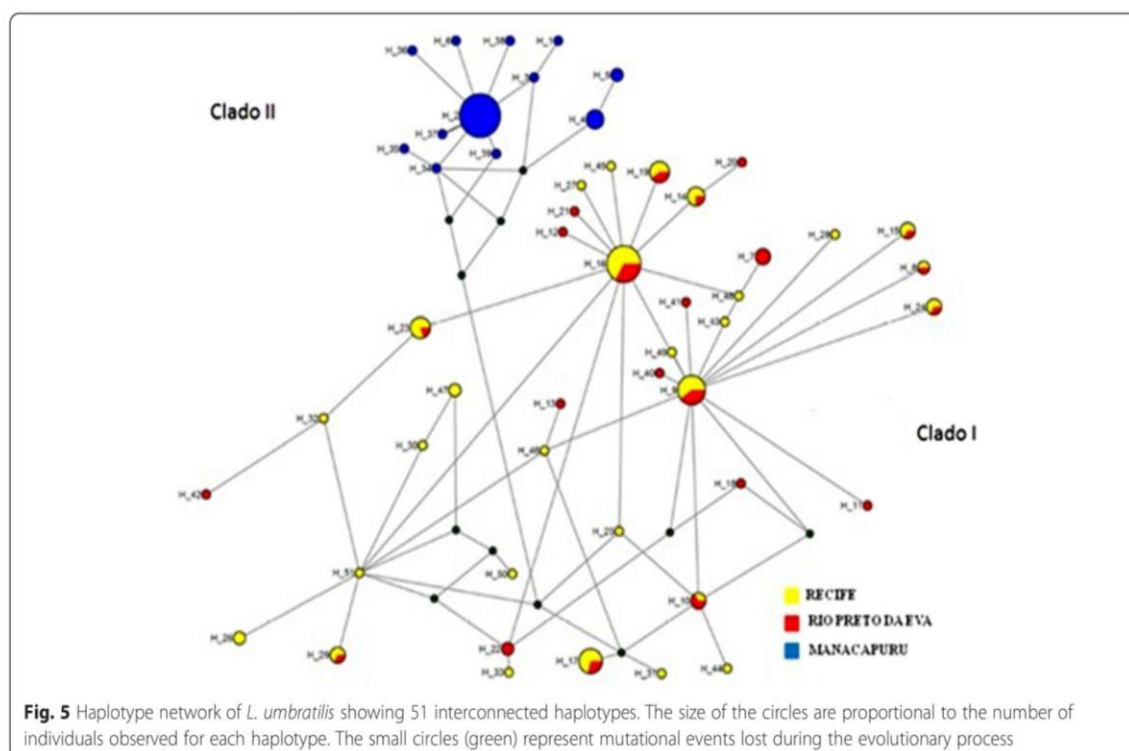


Fig. 5 Haplotype network of *L. umbratilis* showing 51 interconnected haplotypes. The size of the circles are proportional to the number of individuals observed for each haplotype. The small circles (green) represent mutational events lost during the evolutionary process

Tajima's D test was negative and significant ($P < 0.05$) for all populations, which shows deviation from the neutrality model. This result could be explained by the high number of rare haplotypes in these populations, which would reinforce the possibility of recent expansion or positive selection. Fu's F_s was also negative and significant ($P < 0.01$) for all populations, which confirms the hypothesis of recent expansion (Table 3).

The Mismatch distribution also confirms that these populations have recently undergone a process of demographic expansion. The raggedness index (r) did not reject the null hypothesis of recent demographic expansion. The sum of square deviation test (SSD) was not significant. The haplotype fixation index (F_{st}) was significant (0.89677 – 0.89357) when comparing the Rio Preto da Eva and Recife populations with the Manacapuru population (Table 2)—this reflects a high level of genetic divergence between these two groups.

Table 1 Intra-population genetic diversity measures for each sample

Samples	Ts/Tv	NS	Hd	π
Manacapuru (AM)	10/8	18	0.65556	0.003539
Rio Preto da Eva (AM)	26/1	26	0.95875	0.004870
Recife (PE)	26/2	28	0.94545	0.004807
Total	49/19	66	0.94755	0.019231

Ts/Tv transitions/transversions, NS Number of polymorphic sites Hd Haplotype diversity, π Nucleotide diversity

Geometric morphometry

Differences in wing size were observed among the three populations studied. The median centroid size of Rio Preto da Eva specimens was larger than specimens from Manacapuru and Recife (Fig. 6). The mean centroid size of Rio Preto da Eva was significantly different from Manacapuru ($p < 0.05$; ANOVA + Tukey's pairwise comparisons), but not from the Recife population ($p > 0.05$; ANOVA + Tukey's pairwise comparisons). Also, no significant difference in the mean centroid size was observed between Recife and Manacapuru populations ($p > 0.05$; ANOVA + Tukey's pairwise comparisons). The allometric effect was 17.18 % ($p < 0.0001$), and it was removed from the shape analysis.

The canonical variate analysis for the wing shape showed that individuals were clustered into distinct groups in the morphospace according to each population (Fig. 7). Manacapuru and Recife were forming two groups slightly overlapped, whereas Rio Preto da Eva was highly overlapped with the other two populations. The Mahalanobis distance between Manacapuru and Recife populations were 2.0604; and between Manacapuru and Rio Preto da Eva was 1.6548. Rio Preto da Eva and Recife showed the lower distance (1.5246) ($p < 0.0028$ in all comparisons using 10.000 permutations).

Discussion

Analysis indicated the presence of two distinct clades in *L. umbratilis*: Manacapuru (Clade I), and Rio Preto da

Table 2 Genetic differentiation among samples

Populations	Kxy	Fst	Dxy	Da	Ss	Sf
Manacapuru X Rio Preto da Eva	24.41228	0.89677	0.04089	0.03669	2	17
Manacapuru X Recife	24.09141	0.89357	0.04935	0.03618	2	16
Rio Preto da Eva X Recife	2.89617	0.00261	0.00485	0.00001	15	0

Kxy Average nucleotide pairwise differences between two groups, Fst Pair-wise genetic differentiation, Dxy Average number of nucleotide substitutions per site between populations, Da Number of net nucleotide substitutions per site between populations, Ss Number of shared polymorphisms between pairs of populations, Sf Number of fixed differences between pairs of populations

Eva and Recife (Clade II). Naturally infected populations of *L. umbratilis* have been identified in Rio Preto da Eva [31]. The fact that the Recife and Rio Preto da Eva populations are so similar, may suggest that *L. guyanensis* could be capable of infecting the Recife population. This highlights the necessity of studies that seek to ascertain the vector capacity of the Recife population of *L. umbratilis*.

The lack of a main natural reservoir (*Choloepus didactylus*) in the Atlantic forest could act as a limiting factor in the biological cycle of *L. guyanensis*. Due to the absence of records of this etiological agent in the state of Pernambuco, *L. umbratilis* has not been incriminated as vectors of ATL despite the high number of cases [3].

The genetic difference observed between Rio Preto da Eva (north of the Amazon River, Amazonas) and Manacapuru (south of the Amazon River) populations in this study could be related to changes in the course of the Amazon River [32]. The analyzes suggest that changes in the course of the Amazon River initially isolated the *L. umbratilis* population from Manacapuru for a long period. According to Haffer [33], separation and a long period of isolation along opposite margins of the river must have had a crucial impact on the speciation of several groups of organisms in the region. This geographic isolation could have caused genetic and bionomic changes in the population from Manacapuru (south of the Amazon River) when compared to the population from Rio Preto da Eva (north of the Amazon River) [14, 15]. This vicariant event happened with other species in this region, such as monkeys and birds [34].

During this long period of separation among *L. umbratilis* populations from the central Amazonian, the populations from Rio Preto da Eva (north of the Amazon River) and Recife (Northeast region) remained possibly linked by Amazon and Atlantic forests until the last glacial period.

Table 3 Neutrality tests and population expansion parameters estimated for each sample

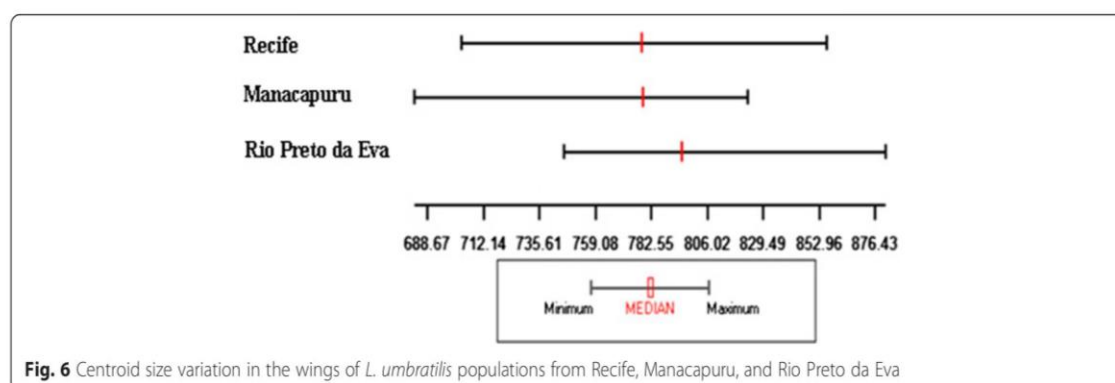
Samples	Tajima's D	Fu's Fs	R	SSD
Manacapuru (AM)	-1.70806*	-4.44368**	0.07692	0.02268
Rio Preto da Eva (AM)	-1.81708*	-16.57669**	0.03686	0.00190

The presence of a clade formed by Rio Preto da Eva and Recife individuals suggests that these populations diverged more recent, possibly during Pleistocene, as occurred in *Lutzomyia whitmani* [35]. Ready et al. [35] assessed *L. whitmani* populations of North and Northeast regions suggesting that there was a continuum of intercrossing between the Amazon and Atlantic forests. This data is supported by our geometric morphometry analysis of wings. These results were unexpected because of the distance, lack of continuity and environmental differences between Amazon and Atlantic forest. The occurrence of several Amazon species of sand flies in Pernambuco reinforce the idea of a continuum between the Amazon and Atlantic forest [36, 37]. However, ecological vicariance should have contributed to the segregation of these populations, primarily via geological and climatic changes—as seen among other organisms in the Amazon region [34].

Fluctuations of climate and vegetation could have modified the distribution of tropical forests during the Cenozoic, resulting in the retraction and expansion of Amazon vegetation [38]. This process could have contributed to the formation of passages between the Atlantic and Amazon forests. This is a possible explanation for the high level of genetic similarity between the North and Northeast populations. The same scenario was observed in the *L. whitmani* and *L. longipalpis* species [39, 40].

In the taxonomic analysis of the *L. umbratilis* complex, phylogenetic analysis showed that the COI marker used had a high discriminatory capacity; thereby demonstrating the presence of two clades within the Central Amazon and Northeast populations. This gene was used previously to study the *L. longipalpis*, *L. umbratilis*, *Anopheles albittarsis* and *Triatoma brasiliensis* complexes with considerable efficiency [15], [41, 42], [43–45]. The applicability of this mitochondrial marker was bolstered by statistical support from the maximum likelihood tree, which detected the presence of two clades for *L. umbratilis*.

The divergence time estimate indicates that the two clades diverged approximately 0.89 Mya (0.79 – 1.68 Mya), during the Pleistocene. Scarpassa and Alencar [45] obtained similar results when they analyzed the



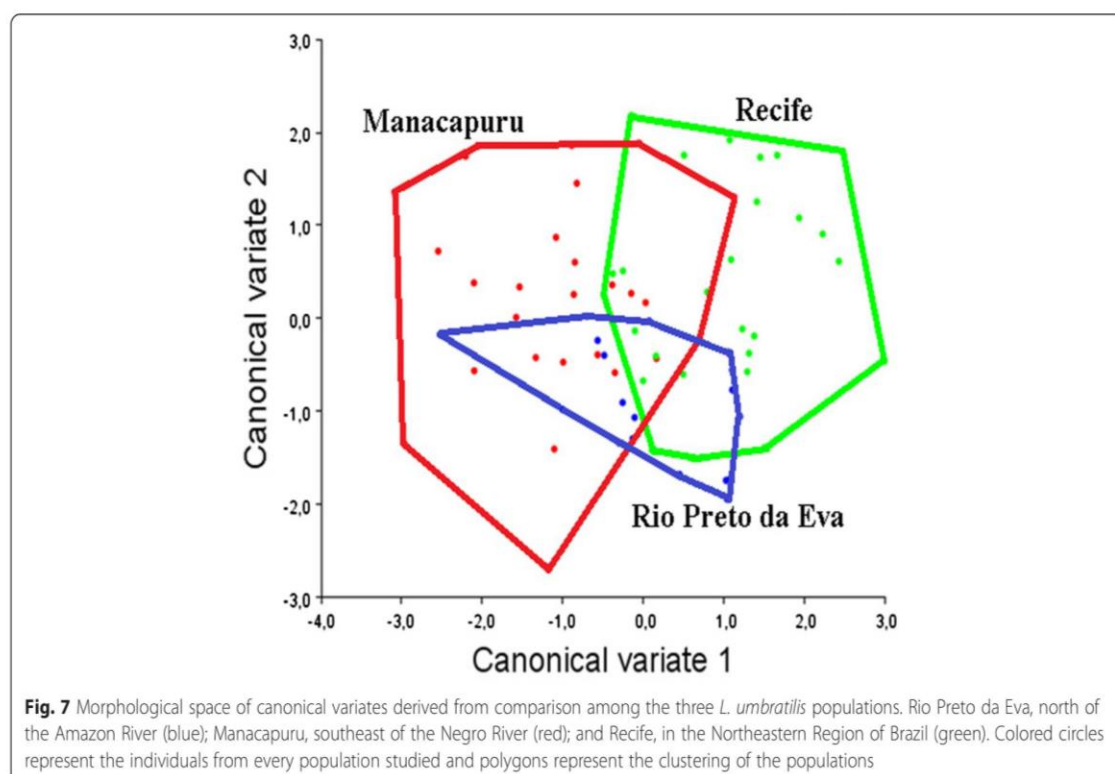
will be crucial for establishing a more reliable divergence time estimate.

As with molecular data, GM analysis indicated two distinct groups between the studied populations, with some homogeneity among them. Also, the canonical variate analysis of wing shape indicated that Rio Preto da Eva population is significantly closer to Recife population, and otherwise Manacapuru and Recife populations were more distant. These results indicate divergence between *L. umbratilis* inhabiting Manacapuru and Recife/Rio Preto da Eva populations. Similar studies using GM and molecular analysis using *Lutzomyia*

shannoni individuals showed divergence between Mexico and USA populations [46, 47].

Conclusion

The markers used in this study (phenotypic and genotypic) allowed the two clades to be differentiated: Manacapuru (Clade I), and Rio Preto da Eva and Recife (Clade II). The genetic similarities shared by the Recife and Rio Preto da Eva populations suggest that Recife individuals could have a vector capacity similar to individuals found north of the Amazon River. However, we cannot be certain that the Recife



population possesses vector competence for the transmission of ATL etiological agents. Our evolutionary analysis highlights the necessity for novel studies and for constant surveillance of the *L. umbratilis* population found in the Atlantic Forest remnant in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil.

Ethical approval

Ethical approval was not required for the current study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VQB, FACP and MTSF designed and supervised the study; MTSF, CASFJ, NCA, LGS, CMRV, TCLB performed the bioinformatics and molecular analyses; FACP, CMRV, VQB revised the manuscript; VQB, FACP and MTSF designed and supervised the study and revised the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (APQ-0651-2.02/10), and Universidade Federal de Pernambuco. FACP was supported by PAPES V Program of FIOCRUZ/CNPq, Grant Number 403572/2008-8.

Author details

¹Departament of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50732-970, Brazil. ²Departament of Microbiology, Research Center Aggeu Magalhães, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50732-970, Brazil. ³Laboratory of Infectious Disease Ecology in the Amazon, Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas 69.057-070, Brazil. ⁴Department of Biology, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n - Rosa Elze, São Cristóvão, Aracaju, Sergipe 49100-000, Brazil.

Received: 18 June 2015 Accepted: 17 August 2015

Published online: 04 September 2015

References

- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976;70:171–2.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979;73:239–42.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Miles M, Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sand flies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. brasiliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75:530–6.
- Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst.* 1994;54:881.
- Burgos AM, Hudson JE. Annotated list of the Phlebotominae (Diptera) of Suriname. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89:171–8.
- Balbino VQ, Marcondes CB, Alexander B, Luna LKS, Lucena MMM, Mendes ACS, et al. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977 outside of Amazonian region, in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:315–7.
- Ministério da Saúde: Sistema Nacional de Agravos de notificações. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. (2013) accessed 12 April 2015.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniases of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89:435–43.
- Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36:587–90.
- Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, Barbosa MGV, Paes GP. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2006;22:2319–27.
- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48:839–47.
- Alexander B, Mutebi JP, Hearne D, Lanzaro GC, Ward RD, Hamilton JGC. Current status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:31–3.
- Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres AG, Ferro C, Munstermann LE. Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group *verrucarum* (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia). *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:913–22.
- Justiniano SCB, Chagas AC, Pessoa FAC, Queiroz RG. Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Braz J Biol.* 2004;64:227–35.
- Scarpas VM and Alencar. *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of *Leishmania guyanensis*, represents a novel species complex? *PLoS One.* 2012; DOI: 10.1371/journal.pone.0037341.
- Costa-Junior CRL, Freitas MTS, Figueiredo-Junior CAS, Aragao NC, Silva LG, Marcondes CB, Dias Neto RV, Leal-Balbino TC, Souza MBR, Ramalho-Ortigao, M, Balbino VQ. Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasit Vectors.* 2015; doi:10.1186/s13071-015-0785-6.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook PC. Evolution weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am.* 1994;87:651–700.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403–10.
- Edgar RC. Local homology recognition and distance measures in linear time using compressed amino acid alphabets. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:380–5.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731–9.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59:307–2.
- Posada D. jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008;25:1253–6.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7.5. *Mol Biol Evol.* 2012;29:1969–73.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguier X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics.* 2003;19:2496–7.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564–7.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999;16:37–48.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Gen.* 2000;155:945–59.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.* 2005;14:2611–20.
- Bookstein FL. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
- Rohlf FJ, Loy A, Corti M. Morphometric analysis of Old World Talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial warp scores. *Syst Biol.* 1996;45:344–62.
- Arias JR, Freitas RA. Sobre os vectores da leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebotomíneos selváticos. *Acta Amaz.* 1978;8:387–96.
- Shephard GE, Müller RD, Liu L, Gurnis M. Miocene drainage reversal of the Amazon River driven by plate–mantle interaction. *Nat Geosci.* 2010;3:870–5.
- Haffer J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz J Biol.* 2008;68:917–47.
- Gascon C, Williamson GB, Fonseca GAB. Receding forest edges and vanishing reserves. *Science.* 2000;288:1356–8.

35. Ready PD, de Souza AA, Macario Rebelo JM, Day JC, Silveira FT, Campbell-Lendrum D, et al. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the southeast boundary of Amazonian Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;92:159–60.
36. Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Marques SW, Marcondes CB. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic forest in Recife, Pernambuco state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005;99:683–93.
37. Dantas-Torres F, Andrade AJ, Tenório KER, Andrade Filho JD, Balbino VQ, Brandão-Filho SP. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:733–6.
38. Haffer J, Prance GT. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. *Estud av.* 2002;16:175–206.
39. Ishikawa EAY, Ready PD, de Souza AA, Day JC, Rangel EF, Davies CR, et al. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazonia and Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:339–45.
40. Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araújo IB, et al. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; doi: 10.1371/journal.pntd.0000365
41. Avise JC. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall; 1994.
42. Gomez G, Jaramillo L, Correa MM. Wing Geometric morphometry and molecular assessment of members in the Albitarsis Complex from Colombia. *Mol Ecol Resour.* 2013;13:1082–92.
43. Scarpas VM, Alencar RB. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors.* 2013;6:258.
44. Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Inf Genet Evol.* 2002;2:83–95.
45. Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;32:46–56.
46. Florin DA, Davies SJ, Olsen C, Lawryer P, Lipnick R, Schultz G, et al. Morphometric and molecular analyses of the sand fly species *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected from seven different geographical areas in the southeastern United States. *J Med Entomol.* 2011;46:154–66.
47. Florin DA, Rebollar-Téllez EA. Divergence of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) is Indicated by Morphometric and Molecular Analyses when Examined between Taxa from the Southeastern United States and Southern Mexico. *J Med Entomol.* 2013; doi:10.1603/ME13085.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.2 CAPÍTULO II

Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the *period* clock geneMoises Thiago de Souza Freitas^aClaudia Maria Ríos-Velasquez^cLidiane Gomes da Silva^aCésar Raimundo Lima Costa Jr^aAbigail Marcelino^aTereza Cristina Leal-Balbino^bValdir de Queiroz Balbino^{a#,*}Felipe Arley Costa Pessoa^{c#,*}Valdir de Queiroz Balbino^{a*}

* Corresponding author

Email: vqbalbino@gmail.com

Felipe Arley Costa Pessoa^{c*}

* Corresponding author

Email: facpessoa@gmail.com

^a Departament of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Departament of Microbiology, Research Center Aggeu Magalhaes, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Laboratory of Infectious Disease Ecology in the Amazon, Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69.057-070 Manaus, Amazonas, Brazil.



Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the *period* clock gene



Moises Thiago de Souza Freitas^a, Claudia Maria Ríos-Velasquez^c, Lidiane Gomes da Silva^a, César Raimundo Lima Costa Jr.^a, Abigail Marcelino^a, Tereza Cristina Leal-Balbino^b, Valdir de Queiroz Balbino^{a,*,1}, Felipe Arley Costa Pessoa^{c,*,1}

^a Department of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Microbiology, Research Center Aggeu Magalhães, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil

^c Laboratory of Infectious Disease Ecology in the Amazon, Instituto Leônidas e Maria Deane—Fiocruz Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69.057-070 Manaus, Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2015

Received in revised form

23 November 2015

Accepted 27 November 2015

Available online 2 December 2015

Keywords:

Lutzomyia umbratilis

Genetic structure

Species complex

Period gene

ABSTRACT

In South America, *Lutzomyia umbratilis* is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the species involved in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. In Brazil, *L. umbratilis* has been recorded in the Amazon region, and an isolated population has been identified in the state of Pernambuco, Northeastern region. This study assessed the phylogeographic structure of three allopatric Brazilian populations of *L. umbratilis*. Samples of *L. umbratilis* were collected from Rio Preto da Eva (north of the Amazon River, Amazonas), from Manacapuru (south of the Amazon River), and from the isolated population in Recife, Pernambuco state. These samples were processed to obtain sequences of the *period* gene. Phylogenetic analysis revealed the presence of two distinct monophyletic clades: one clade comprised of the Recife and Rio Preto da Eva samples, and one clade comprised of the Manacapuru samples. Comparing the Manacapuru population with the Recife and Rio Preto da Eva populations revealed high indices of interpopulational divergence. Phylogenetic analysis indicated that geographical distance and environmental differences have not modified the ancestral relationship shared by the Recife and Rio Preto da Eva populations. Genetic similarities suggest that, in evolutionary terms, these populations are more closely related to each other than to the Manacapuru population. These results confirm the existence of an *L. umbratilis* species complex composed of at least two incipient species.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Cryptic species are species with discrete morphological differences that remain undetected when assessed by classical taxonomy. Therefore, several insect species have been differentiated by assessing the following factors: genetic, ecological, and behavioral characteristics, susceptibility to infection, and eating habits (Mazzoni et al., 2008). Cryptic species are a common occurrence among insect vectors of disease; instances have been identified in the Anophelinae, Culicidae, Triatominae, and Phle-

botominae subfamilies (Anderson et al., 2000; Monteiro et al., 2013; Costa-Junior et al., 2015). In the Phlebotominae subfamily, low flight capacity and geographic isolation have significantly contributed to the emergence of cryptic species (Soto et al., 2001).

Lutzomyia umbratilis (Diptera: Psychodidae) is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the pathogenic agents of American tegumentary leishmaniasis (ATL) (Lainson et al., 1976, 1979, 1981). This species is found in Brazil, Bolivia, Colombia, French Guyana, Guyana, Peru, Suriname, and Venezuela (Young and Duncan, 1994; Burgos and Hudson, 1994). In Brazil, *L. umbratilis* is widely distributed in the Amazon basin and there is an isolated population in remnants of the Brazilian Atlantic rain forest, in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil (Young and Duncan, 1994; Balbino et al., 2001).

On the other side of Brazil, in the Amazon region, the presence of *L. umbratilis* naturally infected with *L. guyanensis* has been

* Corresponding authors.

E-mail addresses: vqbalbino@gmail.com (V.d.Q. Balbino), fapessoa@gmail.com, fapessoa@amazonia.fiocruz.br (F.A.C. Pessoa).

¹ These authors contributed equally.

recorded on the east side of the Negro River and on the north side of the Amazon River, but not on the south side of the Amazon River (Lainson et al., 1994). It has been shown that bionomical (e.g., longevity, fertility and larval development) differences between *L. umbratilis* populations on the north and south sides of the Amazon River have been influenced by the geographic isolation created by the geographic barrier of the river (Justiniano et al., 2004). Recently, *L. umbratilis* populations in the North and Northeast regions were evaluated using the mitochondrial gene *Cytochrome Oxidase I* (COI) and geometric morphometry of the wing; genetic and morphometric differences were identified, which indicates that these populations represent a species complex (De Souza Freitas et al., 2015).

Molecular markers are considered useful tools for differentiating between cryptic species and identifying genetic variation among populations (Bauzer et al., 2002; Waycott et al., 2002; Uchimura et al., 2006). In *Drosophila melanogaster*, genes that control reproductive behavior were isolated and cloned; these molecular markers have enormous potential for intra and inter population analysis. Among these, the *period* gene is particularly interesting because it controls the rhythms of locomotor activity (Konopka and Benzer, 1971), and it controls a feature of the “lovesongs” that males produce during courtship (Kyriacou and Hall, 1980). Both of these behavioral characteristics have been implicated in maintaining sexual isolation between species (Kyriacou and Hall, 1980, 1982, 1986; Ritchie et al., 1999; Sakai and Ishida, 2001). Therefore, the *period* gene has been called a “speciation gene,” because it controls differences in lovesongs rhythms that may contribute to reproductive isolation (Coyne, 1992). In sand flies, the *period* gene has also been utilized in studies of population genetics in order to identify possible members of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil (Bauzer et al., 2002, 2007). In a recent study, the *period* gene revealed moderate geographical structuring between the *L. longipalpis* populations of Ceará State, and revealed significant variability among the 1S and 2S phenotypes (Costa-Junior et al., 2015).

In the current study, we have analyzed the presence of polymorphism in the *period* gene of three Brazilian populations of *L. umbratilis*. Our goal was to investigate genetic differentiation and the speciation process in this putative species complex.

2. Material and methods

2.1. Field collection and identification of phlebotomine sandflies

Field collections were done in Rio Preto da Eva (2°50'50"S/59°56'28"W) and Manacapuru (3°12'41"S/60°26'20") municipalities, located in the Amazonas State, North Region of Brazil, and in the Atlantic Forest Ecological Reserve of Dois Irmãos (8°03'14"S/34°52'52"W) in Pernambuco State, Recife Municipality, Northeast Region of Brazil.

Adult specimens were collected from tree trunks by suction using CDC light traps. The samples were conserved in 95% alcohol, at −20°C. Sandflies were identified using the keys of Young and Duncan (1994).

2.2. DNA extraction, PCR, and sequencing

For molecular analysis of the *period* nuclear marker, 73 specimens of *L. umbratilis* were used: 36 from Manacapuru; 23 from Rio Preto da Eva; and 14 from Recife. Genomic DNA extraction was carried out using Chelex®100 (BioRad, Berkeley, California, USA), according to Costa-Junior et al. (2015).

For each DNA sample isolated, a segment of 489 bp of *per* (Mazzoni et al., 2002) was amplified by PCR using the Master

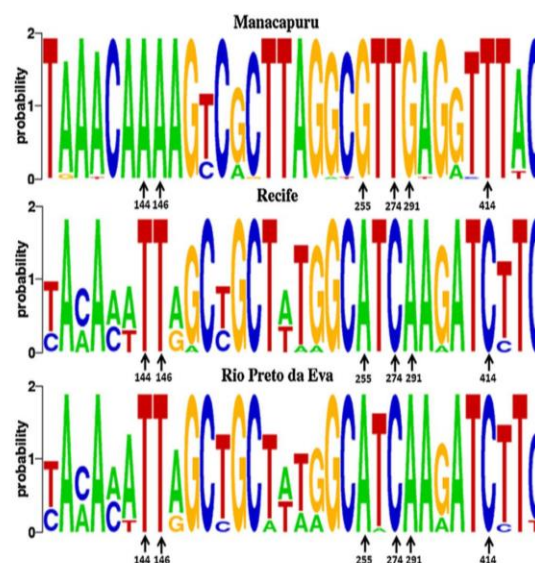


Fig. 1. Schematic representation of polymorphisms in a fragment of 489 bp from the *Period* gene using WebLogo.

The sequences shown were obtained from *L. umbratilis* collected in Recife, State of Pernambuco, Rio Preto da Eva and Manacapuru, State of Amazonas, Brazil. Font size is indicative of the frequency of a nucleotide at any given site. Fixed (black arrows).

Mix kit (Promega, Fitchburg, WI). PCR products were visualized in 1% agarose gel under UV light, and they were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). Sequencing was carried out in an ABI 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA).

Only sequences with a PHRED score above 30 were used in the analysis. Contig assembly was carried out using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Local alignments were done using BLAST (Altschul et al., 1990). All new sequences produced in this study have been deposited in GenBank under accession numbers: KT722623–KT722695.

2.3. Phylogenetic analysis

Nucleotide sequences were aligned using Muscle (Edgar, 2004), incorporated with MEGA v. 5.0 (Tamura et al., 2011). Phylogenetic relationships among the sequences were inferred by Bayesian Inference (BI) analysis, which was implemented with MR. BAYES (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) using the evolutionary model (TPM2uf) that best fit the *period* data sets; the best fit model was determined using the jMODELTEST (Posada, 2008). BI analysis included two simultaneous independent runs of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) for 100 million generations, sampling every 1000 generations with a burn-in of 25%. *Lutzomyia whitmani* and *Phlebotomus dubosqui* were selected as outgroups in the phylogenetic analysis.

2.4. Genetic diversity

Intra-population genetic diversity was assessed in terms of haplotype and nucleotide diversity, *K* value (number of genetic groups), number of polymorphic sites, and number of transitions and transversions; diversity was measured using DnaSP v. 4.0 (Rozas et al., 2003) and Arlequin v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). The frequencies of polymorphic sites were also assessed using the WebLogo tool (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Tajima's *D* neutrality test was performed using Arlequin v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). Genetic differentiation was assessed

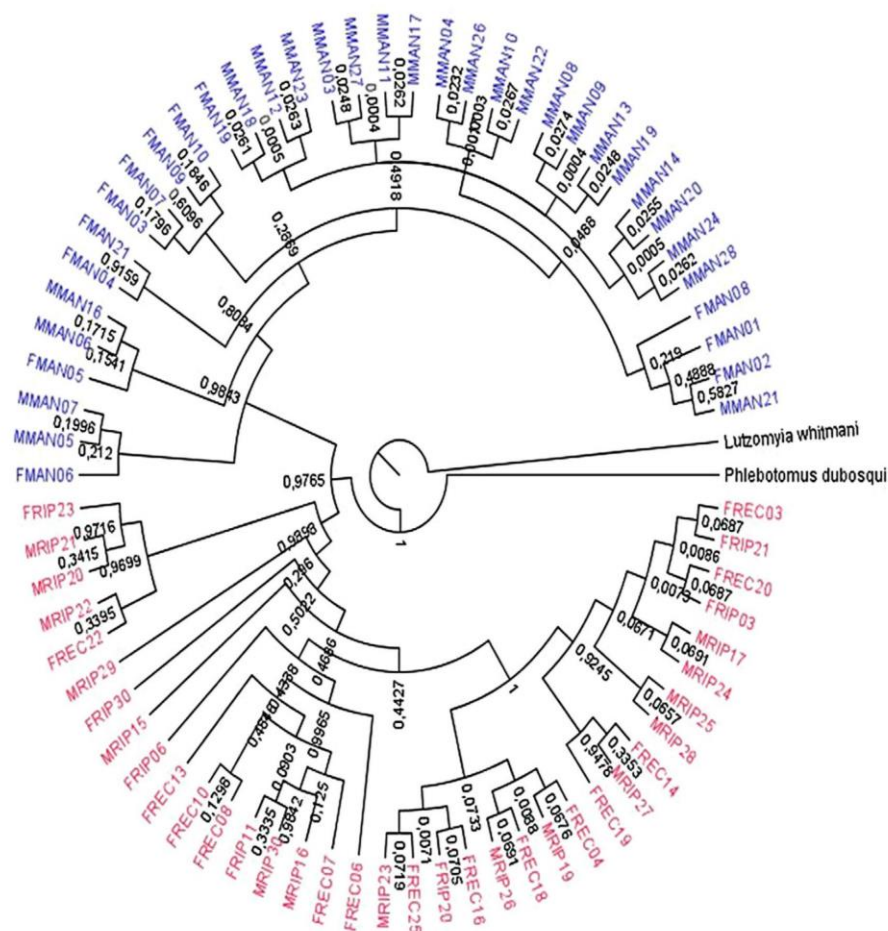


Fig. 2. Bayesian Inference (BI) topology tree of the 73 sequences of *Lutzomyia umbratilis* inferred under the TIM1+I model. Numbers on each branch (above branch) represent posterior probabilities obtained in the BI. *Lutzomyia whitmani* and *Phlebotomus dubosqui* were used as outgroups.

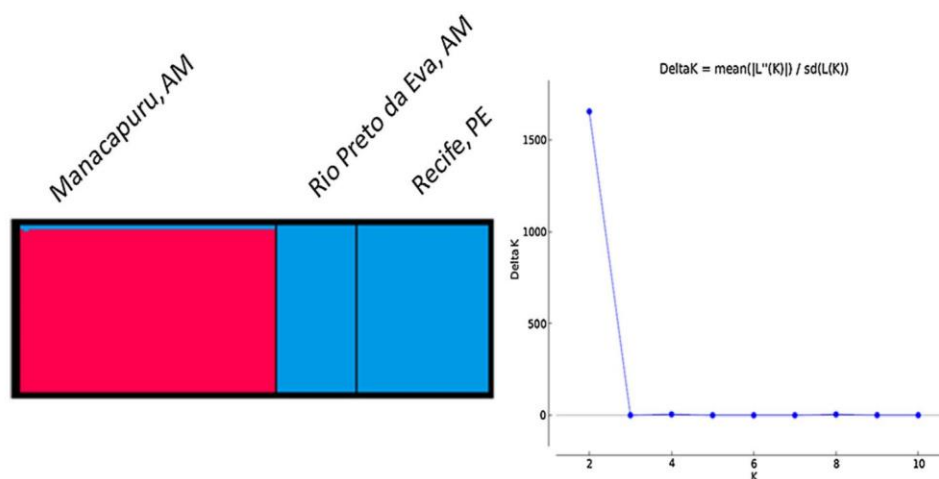


Fig. 3. Bar plots and ΔK values ranging from 1 to 10 by the STRUCTURE software, inferring the genetic structure of *L. umbratilis*. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) The Manacapuru specimens were assigned to the red group, and the Rio Preto da Eva and Recife specimens were assigned to the blue group. The Evanno method predicted that the most likely number of populations was two.

with the pairwise fixation index F_{st} using Arlequin v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010).

The average number of substitutions per site among populations (D_{xy}), the total number of substitutions per site among populations (D_a), the number of shared polymorphisms among populations (S_s),

and the number of fixed differences among populations (S_f) were calculated using DnaSP v. 4.0 (Rozas et al., 2003).

The haplotype network was created with NETWORK v. 4.6 (www.fluxus-engineering.com) using the median-joining method

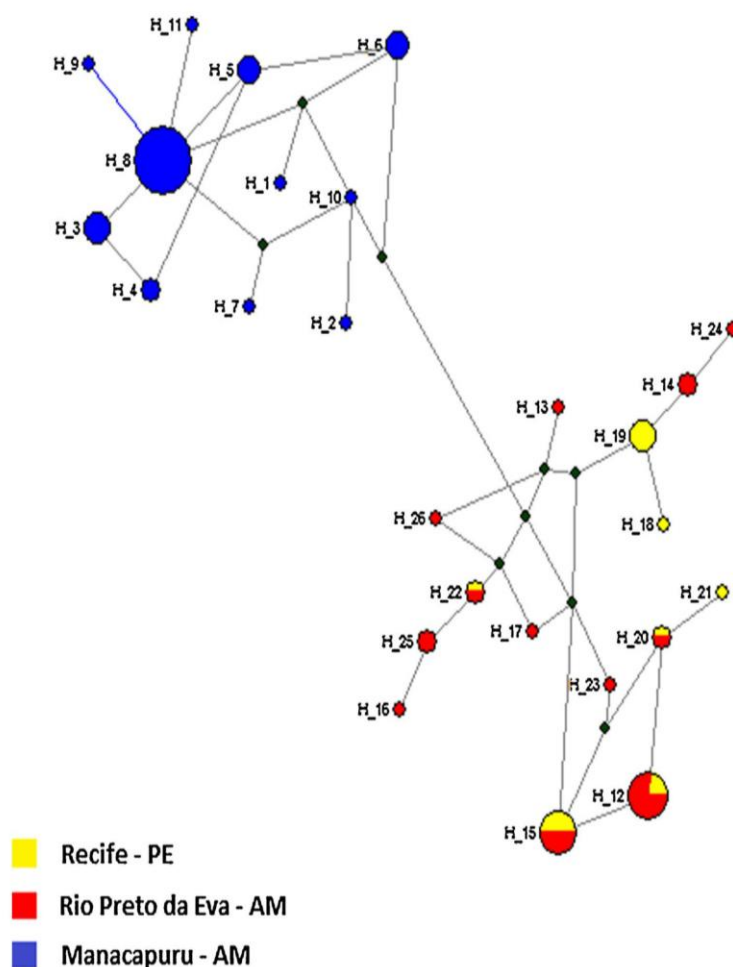


Fig. 4. Haplotype network of *L. umbratilis* showing 51 interconnected haplotypes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The size of the circles are proportional to the number of individuals observed for each haplotype. The small circles (green) represent mutational events lost during the evolutionary process.

(Bandelt et al., 1999) to verify the level of haplotype sharing and the frequency distribution among populations.

2.5. Population structure

Genetic structure analysis was performed using Structure v. 2.3 (Pritchard et al., 2000). Simulations were carried out with 20,000 interactions of burn-in, followed by 200,000 generations of Markov Chain Monte Carlo, adjusted 1–10 for each “K” population. Ad hoc quantity ΔK (Evanno et al., 2005) was used to determine the most accurate number of “K” groups.

3. Results

Altogether, 73 specimens of *L. umbratilis* were analyzed. The analyzed sequence region (489 bp) exhibited 35 (7.1%) polymorphic sites; these were comprised of 27 (~77.1%) parsimony-informative sites and 8 (~22.9%) singletons. Among the polymorphic sites, 54.2% of the nucleotide substitutions were transitions and 45.8% were transversions. Analysis of the parsimony informative sites identified six fixed single nucleotide polymorphisms (SNP) within the 489 bp fragment of *per* that was used in our analysis (Fig. 1). No non-synonymous nucleotide substitutions

were found within the exonic region. Five indels were observed in the intronic region.

The Bayesian Inference analysis indicated difference, revealing two distinct clades; both clades were well-supported with probability values of 0.98 or 98% (Fig. 2). This result indicates that the Recife and Rio Preto da Eva populations are more closely related evolutionarily, which reinforces the possibility that Recife individuals are ancestrally linked to individuals from Rio Preto da Eva.

Genetic-structure analysis indicated that the populations studied divide into two main subgroups, with the *ad hoc* quantity supporting the number $K=2$. Cluster analysis corroborated the separation of the samples into two clades (Fig. 3).

Twenty-six alleles were observed across the three populations. The most frequent haplotypes were: H8, shared by 18 Manacapuru individuals; and H12, shared by 9 Recife and Rio Preto da Eva individuals (Fig. 4). The greatest number of haplotypes (15) was observed in the Recife and Rio Preto da Eva populations, which shows that these populations possess a higher level of genetic diversity than the Manacapuru population.

Intrapopulation analysis of *L. umbratilis* specimens revealed a higher level of nucleotide and haplotype diversity in specimens from Rio Preto da Eva and Recife, than in specimens from Manacapuru (Table 1). In addition, the Rio Preto da Eva and Recife populations exhibited a higher level of differentiation than the

Table 1

Neutrality tests and intra-population genetic diversity measures for each sample.

Samples	Tajima's D	N	Hd	$\pi \pm SE$	NS	H	K
Manacapuru	−1.31653	36	0.737	0.00315 ± 0.00058	11	11	1.525
Rio Preto da Eva	0.79751	23	0.885	0.01392 ± 0.00121	18	12	6.735
Recife	0.56387	14	0.857	0.01326 ± 0.00157	16	7	6.418
Total	0.01495	73	0.909	0.01984 ± 0.00071	35	26	9.908

Tajima's D (* $p < 0.05$); N : sample size; Hd: haplotypic diversity; $\pi \pm SE$: nucleotide diversity and standard errors (SE); NS: number of polymorphic sites; H : haplotype; K : average number of nucleotide difference.

Table 2

Genetic differentiation among samples.

Populations	F_{st}	D_{xy}	D_a	S_s	S_f
Rio Preto da Eva Recife	0.00000	0.01335	−0.00024	15	0
Rio Preto da Eva Manacapuru	0.76062	0.03076	0.02223	1	6
Recife Manacapuru	0.80522	0.03105	0.02284	1	6

F_{st} : pair-wise genetic differentiation; D_{xy} : average number of nucleotide substitutions per site between populations; D_a : number of net nucleotide substitutions per site between populations; S_s : number of shared polymorphisms between pairs of population; S_f : number of fixed differences between pairs of populations.

**Fig. 5.** AMOVA UPGMA tree for populations of *L. umbratilis*.

UPGMA tree constructed from the F_{st} values for each phenotype and their respective localities. The populations of Rio Preto da Eva (RIP) and Recife (REC) are separate from the Manacapuru (MAN) population.

Manacapuru population; this reflects the high level of genetic divergence that exists between the two clades (Table 2).

Tajima's D test was not significant ($P > 0.05$) for the populations studied. The haplotype fixation index (F_{st}) was significant (0.76062–0.80522) when comparing the Rio Preto da Eva and Recife populations with the Manacapuru population (Table 2)—this reflects the high level of genetic divergence between these two groups (Fig. 5).

4. Discussion

In this study, we compared individuals from Recife and Rio Preto da Eva with individuals from Manacapuru, and we observed the presence of five indels in the intron of the *period* gene. Mutations found in the intron can be neutral or they can alter gene regulations (Hoy, 2013). According to Chong et al. (2013) in several species of *Drosophila* sp. the emergence of deletions may relate primarily to fitness by creating greater adaptability among individuals. This highlights the need for studies that seek to determine the relationship between these indels and the regulation of the *period* gene, and thus to determine the role that the *period* gene has played in generating bionomic differences between populations on the north and south margins of the Amazon River.

The fixed polymorphisms observed in the *period* gene will be particularly useful for the differentiation of these three populations, as was the case for *L. longipalpis* (Costa-Junior et al., 2015; Araki et al., 2009; Bauzer et al., 2002) (Fig. 1). De Souza Freitas et al., (2015) used the mitochondrial gene *Cytochrome oxidase I* to identify 13 fixed polymorphisms in individuals from Rio Preto da Eva and Recife, thereby indicating that these population are ancestrally related.

Analysis indicated the presence of two distinct clades in *L. umbratilis*: Manacapuru (Clade I), and Rio Preto da Eva and Recife (Clade II). De Souza Freitas et al., (2015) observed similar results

when they evaluated these same populations using the mitochondrial marker *Cytochrome Oxidase I* and geometric morphometrics of the wing. The presence of a clade formed by Rio Preto da Eva and Recife individuals suggests that there was a continuum of intercrossing between the North and Northeast populations, as suggested by Ready et al. (1998). However, ecological vicariance could have contributed to the segregation of these populations, primarily via geological and climatic changes—a phenomena that has been observed among other organisms in the Amazon region (Haffer, 2008).

Highly significant F_{st} values (0.76062–0.80522) were observed when comparing the Rio Preto da Eva and Recife populations with the Manacapuru population (Table 2)—this reflects a high level of genetic divergence between these two groups. In the species *Lutzomyia intermedia* and *L. whitmani* significant F_{st} values were not observed in analyses using the *period* gene (Mazzoni et al., 2006). The high genetic divergence observed between Amazonian populations of *L. umbratilis* suggests that a long period of isolation along opposite margins of the river has contributed to the fact that the Rio Preto da Eva and Recife populations have a more closely related evolutionary history. According to Ting et al. (2000); genes involved in reproductive isolation, such as the *period* gene, may record the phylogenetic history of closely related groups more consistently.

In the taxonomic analysis of the *L. umbratilis* complex, phylogenetic analysis showed that the utilized *period* marker had a high discriminatory capacity; thereby demonstrating the presence of two clades within the populations from the Central Amazon and the Northeast Region. Genes controlling the production of acoustic signals during courtship are useful molecular markers for studying the speciation process, because these "lovesongs" are an important indicator of sexual behavior and reproductive isolation in many insect species (Lins et al., 2008). Genes controlling acoustic signals were used previously to study *L. longipalpis*, *L. whitmani*, *L. intermedia* with considerable efficiency (Costa-Junior et al., 2015; Mazzoni et al., 2006). The applicability of this nuclear marker was bolstered by statistical support from the maximum likelihood tree, which detected the presence of two clades for *N. umbratilis*.

5. Conclusions

Our results indicate the presence of two distinct clades in *L. umbratilis*: Manacapuru (Clade I), and Rio Preto da Eva and Recife (Clade II). Genetic analysis suggests that the Recife and Rio Preto da Eva populations are ancestrally linked. The genetic differentiation detected in this study using the *period* gene was also observed in studies using morphological, genetic and biologic analysis (De Souza Freitas et al., 2015; Justiniano et al., 2004). These results contribute to knowledge of the *L. umbratilis* complex in Brazil, and they further the understanding of the phylogenetic relationships that exist between populations in the Northern and Northeastern regions.

Acknowledgments

This study was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (APQ-0651-2.02/10), and the Universidade Federal de Pernambuco. FACP was supported by the CNPq, Grant 401262/2014-6

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Anderson, T.J.C., Haubold, B., Williams, J.T., Estrada-Franco, J.G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I.D., Brockman, A.H., Nosten, F., Ferreira, M.U., Day, K.P., 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1467–1482.
- Balbino, V.Q., Marcondes, C.B., Alexander, B., Luna, L.K.S., Lucena, M.M.M., Mendes, A.C.S., Andrade, P.P., 2001. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward & Frahi, 1977 outside of Amazonian region, in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 315–317.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Bauzer, L.G., Gestó, J.S., Souza, N.A., Ward, R.D., Hamilton, J.G., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2002. Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1624–1627.
- Bauzer, L.G.S.R., Souza, N.A., Maigón, R.D.C., Peixoto, A.A., 2007. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 1–12.
- Burgos, A.M., Hudson, J.E., 1994. Annotated list of the Phlebotominae (Diptera) of Suriname. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 171–178.
- Chong, Z., Zhai, W., Li, C., Gao, M., Gong, Q., Ruan, J., Li, J., Jiang, L., Lv, X., Hungate, E., Wu, C.I., 2013. The evolution of small insertions and deletions in the coding genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2699–2708.
- Costa-Junior, C.R.L., Freitas, M.T.S., Figueiredo-Junior, C.A.S., Aragao, N.C., Silva, L.G., Marcondes, C.B., Dias Neto, R.V., Leal-Balbino, T.C., Souza, M.B.R., Ramalho-Ortigao, M., Balbino, V.Q., 2015. Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites Vectors*, <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0785-6>.
- Coyne, J.A., 1992. Genetics and speciation. *Nature* 355, 511–515.
- De Souza Freitas, M.T., Rios-Velasquez, C.M., Costa, C.R.L., Figueirêdo, C.A.S., Aragão, N.C., Da Silva, L.G., De Aragão Batista, M.V., Balbino, T.C.L., Pessoa, F.A.C., De Queiroz Balbino, V., 2015. Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasites Vectors* 8, 448.
- Edgar, R.C., 2004. Local homology recognition and distance measures in linear time using compressed amino acid alphabets. *Nucleic Acids Res.* 32, 380–385.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Haffer, J., 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz. J. Biol.* 68, 917–947.
- Hoy, M.A., 2013. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*, third ed. Elsevier, Amsterdam.
- Justiniano, S.C.B., Chagas, A.C., Pessoa, F.A.C., Queiroz, R.G., 2004. Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Braz. J. Biol.* 64, 227–235.
- Konopka, R.J., Benzer, S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 2112–2116.
- Kyriacou, C.P., Hall, J.C., 1980. Circadian rhythm mutations in *Drosophila* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6729–6733.
- Kyriacou, C.P., Hall, J.C., 1982. The function of courtship song rhythms in *Drosophila*. *Anim. Behav.* 30, 784–801.
- Kyriacou, C.P., Hall, J.C., 1986. Interspecific genetic control of courtship song production and reception in *Drosophila*. *Science* 232, 494–497.
- Lainson, R., Ward, R.D., Shaw, J.J., 1976. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 171–172.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Ward, R.D., Ready, P.D., Naiff, R.D., 1979. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 239–242.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Ward, R.D., Ready, P.D., Miles, M., Naiff, R.D., 1981. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. brasiliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 530–536.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., Souza, A.A.A., Braga, R.R., Ishikawa, E.A.Y., 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 435–443.
- Lins, R.M.M.A., Souza, N.A., Peixoto, A.A., 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (7).
- Mazzoni, C.J., Gomes, C.A., Souza, N.A., De Queiroz, R.G., Justiniano, S.C.B., Ward, R.D., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2002. Molecular evolution of the period gene in sandflies. *J. Mol. Evol.* 55, 553–562.
- Mazzoni, C.J., Souza, N.A., Andrade-Coelho, C., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2006. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC Evol. Biol.* 6, 85.
- Mazzoni, C.J., Araki, A.S., Ferreira, G.E., Azevedo, R.V., Barbuji, G., Peixoto, A.A., 2008. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC Evol. Biol.* 8, 141.
- Monteiro, F., Peretolchina, T., Lazoski, C., Harris, K., Dotson, E., 2013. Phylogeographic pattern and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLoS One* 8, e70974.
- Posada, D., 2008. jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Ready, P.D., de Souza, A.A., Macario Rebelo, J.M., Day, J.C., Silveira, F.T., Campbell-Lendrum, D., Davies, C.R., Costa, J.M., 1998. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the southeast boundary of Amazonian Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 159–160.
- Ritchie, M.G., Halsey, E.J., Gleason, J.M., 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.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. Mr. Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Sakai, T., Ishida, N., 2001. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9221–9225.
- Soto, S.I., Lehmann, T., Rowton, E.D., Velez, B.I.D., Porter, C.H., 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 84–93.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Ting, C.T., Tsaur, S.C., Wu, C.I., 2000. The phylogeny of closely related species as revealed by the genealogy of a speciation gene, *Odysseus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5313–5316.
- Uchimura, M., Faye, E.J., Shimada, S., Arai, S., Inoue, T., Nakamura, Y., 2006. A re-evaluation of the taxonomic status of *Halophila euphlebia* Makino (Hydrocharitaceae) based on morphological features and ITS sequence data. *Bot. Mar.* 49, 111–121.
- Waycott, M., Freshwater, D., York, R., Calladine, A., Kenworthy, W., 2002. Evolutionary trends in the seagrass genus *Halophila* (Thouars): insights from molecular phylogeny. *Bull. Mar. Sci.* 71, 1299–1308.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 54, 881.

6 DISCUSSÃO GERAL

As análises filogenéticas indicaram a presença de dois clados distintos em *Lu. umbratilis*: Manacapuru (Clado I) e um outro formado por Rio Preto da Eva e Recife (Clado II). Populações naturalmente infectadas de *Lu. umbratilis* foram identificados em Rio Preto da Eva (Arias e Freitas, 1978). A elevada semelhança genética observada entre as populações Recife e Rio Preto da Eva sugerem que o parasito *Le. guyanensis* pode ser capaz de infectar a população de Recife. Sendo assim, o nosso resultado sugeri a necessidade de estudos que busquem verificar o capacidade vetorial da população de *Lu. umbratilis* de Recife.

Neste estudo, nós observamos também a presença de cinco indels na região intrônica do gene *period*. Algumas mutações encontradas dentro dos introns de determinados genes nucleares podem apresentar se como neutras ou ainda atuar na regulação gênica (Hoy, 2013). De acordo com Chong *et al.*, (2013) em várias espécies de *Drosophila* sp. o surgimento de deleções pode referir-se principalmente à aptidão ao criar uma maior adaptabilidade entre os indivíduos. Isso demonstra a necessidade de estudos que busquem determinar a relação entre esses indels e a regulação do gene *period*, e assim determinar o papel que o gene *period* desempenhou na geração de diferenças bionômicas entre as populações nas margens norte e sul do rio Amazonas.

Os sítios fixados nos genes *period* e *COX I* foram particularmente úteis para a diferenciação dessas três populações, como ocorreu em estudos realizados em populações de *Lutzomyia longipalpis* no Brasil (Araki *et al.*, 2009; Bauzer *et al.*, 2002; Costa-Junior *et al.*, 2015). Este elevado número de sitios fixados também sugerem que eventos de vicariância ecológica podem ter contribuído para a segregação dessas populações, principalmente através de mudanças geológicas e climáticas um fenômeno que foi observado entre outros organismos na região amazônica (Haffer, 2008).

Os valores de *Fst* foram altamente significativos (>0.75000) ao comparar as populações de Rio de Preto da Eva e Recife com a população de Manacapuru - isso reflete um alto nível de divergência genética entre esses dois grupos. As diferenças genéticas observadas entre as populações de Rio Preto da Eva (norte do rio Amazonas, Amazonas) e Manacapuru (sul do rio Amazonas) neste estudo

poderiam estar relacionada a mudanças no curso do rio Amazonas (Shephard *et al.*, 2008). As análises sugerem que as mudanças no curso do rio Amazonas isolaram inicialmente a população de *Lu. umbratilis* de Manacapuru por um longo período. De acordo com Haffer, (2008), a separação e um longo período de isolamento ao longo das margens opostas do rio devem ter tido um impacto crucial na especiação de vários grupos de organismos na região amazônica. Esse isolamento geográfico poderia ter causado mudanças genéticas e bionômicas na população de Manacapuru (sul do rio Amazonas) em comparação com a população de Rio Preto da Eva (norte do rio Amazonas) (Justiniano *et al.*, 2004; Scarpassa e Alencar, 2012).

Tal como aconteceu com os dados moleculares, a análise morfometria geométrica (MG) indicou dois grupos distintos entre as populações estudadas, com alguma homogeneidade entre eles. Além disso, a análise canônica variada da forma da asa indicou que população de Rio Preto da Eva está significativamente mais próxima da população de Recife, e de outra forma as populações de Manacapuru e Recife estão mais distantes. Estes resultados indicam divergência entre os *Lu. umbratilis* de Manacapuru em comparação com as populações de Recife/Rio Preto da Eva. Estudos semelhantes usando MG e análise molecular usando indivíduos de *Lutzomyia shannoni* mostraram divergência entre populações do México e dos Estados Unidos da América (Florin *et al.*, 2012; Florin e Rebollar-Téllez, 2013). Estes resultados ratificam a presença de um complexo de espécies dentro deste grupo, tendo ao menos duas espécies para o complexo *Lu. umbratilis*.

7 CONCLUSÕES

Os marcadores usados nestes estudos (fenotípico e molecular) permitiram separar as populações em dois clados: Manacapuru (Clado I) e Rio Preto da Eva e Recife (Clado II). A semelhança genética compartilhada entre as populações de Recife e Rio Preto da Eva sugerem que os indivíduos de Recife possa ser um competente vetor tão quanto os indivíduos encontrados ao norte do Rio Amazonas. No entanto, não podemos afirmar que a população de Recife possua tal competência como vetor do parasito causador da LTA, pois não foi realizado o estudo de competência vetorial.

Nossa análise evolutiva destaca a necessidade de novos estudos relacionados ao papel do rio Amazonas sobre populações deste importante vetor na região Amazônica. Todavia, neste estudo podemos constatar sua relevância na estruturação genética das populações do estado do Amazonas.

Por fim, concluímos que *Lu. umbratilis* apresenta características genéticas e morfológicas compatíveis com um complexo de espécies, sendo este complexo *Lu. umbratilis* composto por ao menos duas espécies.

REFERÊNCIAS

- Adamson RE, Ward RD, Feliciangeli MD e Maingon R (1993) The application of random amplified polymorphic DNA for sandfly species identification. *Med Vet Entomol* 7: 203-207.
- Aguar GM e Medeiros WM (2003). Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In *Flebotomíneos do Brasil*. EF Rangel, R Lainson (eds.), Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255.
- Alexander JB (1987) Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombia coffee plantation. *J Med Entomol* 24: 552-558.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araújo IB, Hamilton JG, Brazil RP, Peixoto AA (2009) Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis* 3: e365.
- Aransay A, Scoulica E, Chaniotis B e Tselentis Y (1999) Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene. *Insect Mol Biol* 8: 179-184.
- Aransay AM, Ready PD e Morillas-Marquez F (2003) Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity*. 90: 316-325.
- Arias JR e Freitas RA (1977) Flebotomíneos da Amazônia central do Brasil. 1. Resultados obtidos das capturas feitas em isca humana e equina. (Diptera: Psychodidae). *Acta Amaz* 7: 507-527.
- Arias JR e Freitas RA (1978) Sobre os vectores da leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebotomíneos selváticos. *Acta Amaz* 8: 387-396.
- Arias JR e Naiff RD (1981) The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban area of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 279-286.
- Arrivillaga J, Mutebi J, Piñango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD e 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, Norris DE, Feliciangeli MD e Lanzaro GC (2002) Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Inf Genet Evol* 2:83-95.
- Avice J, Arnold J, Ball M, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA e Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Avice JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, London, p. 551.
- Azevedo ACR, Costa SM, Pinto MCG, Souza JL, Cruz HC, Vidal J, Rangel EF (2008) Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 760-767.
- Azevedo ACR, Lainson R, Souza AA, Fé NF, Feliciangeli DM, Menezes CRV, Rangel EF (2002) Comparative studies of populations of *Lutzomyia*

- umbratilis* (Diptera: Psychodidae) in Brazil and Venezuela. J Med Entomol 39: 587–600.
- Balbino VQ, Marcondes CB, Alexander B, Luna LKS, Lucena MMM, Mendes AC, Andrade PP (2001) First report of *Lutzomyia* (Nyssomyia) *umbratilis* Ward & Frahia, 1977 outside of Amazonian region, in Recife, State of Pernambuco, Brazil, Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 315-317.
- Bates PA, Depaquit J, Galati EA, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, Picado A, Ready PD, Salomón OD, Shaw JJ, Traub-Csekö YM, Warburg A (2015) Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. Parasit Vectors. 8:131.
- Bauzer LG, Gesto JS, Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP, Peixoto AA (2002) Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Mol Biol Evol 19: 1624–1627.
- Bauzer LGSR, Souza NA, Maigon RDC e Peixoto AA (2007) *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 1–12.
- Beati L, Cáceres A, Lee J e Munstermann L (2004) Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. Int J Parasitol 34: 225-234.
- Brasil (1997) Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. Leishmaniose tegumentar americana no Brasil (Ferida Brava). Brasília, 39 p.
- Brasil (2007) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: FUNASA, 13p.
- Brazil R P e Brazil B G (2003). Bionomia. In: Rangel, E. F.; Lainson, R. (org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: FioCruz, 368 p. 257-274.
- Calle DA, Quiñones ML, Erazo HJ e Jaramillo N (2008) Discriminación por morfometría geométrica de once espécies de *Anopheles* (Nyssorhynchus) presentes en Colombia. Biomédica 28: 371-385.
- Chong Z, Zhai W, Li C, Gao M, Gong Q, Ruan J, Li J, Jiang L, Lv X, Hungate E, Wu CI (2013) The evolution of small insertions and deletions in the coding genes of *Drosophila melanogaster*. Mol Biol Evol 30: 2699–2708.
- Costa-Junior CRL, Freitas MTS, Figueiredo-Junior CAS, Aragao NC, da Silva LG, Marcondes CB, Dias RV, Leal-Balbino TC, Souza MB, [Ramalho-Ortigão M](#) et al., (2015) Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. Parasites Vectors, <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0785-6>.
- Cox AJ e Hebert PDN (2001) Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. Mol Ecol 10: 371–386.
- Coyne JA (1992) Genetics and speciation. Nature 355: 511–515.
- Day J e Ready P (1999) Relative abundance, isolation and structure of phlebotomine microsatellites. Insect Mol Ecol 8: 575- 580.
- de Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. Pages 57–75 in Endless forms: Species and speciation (D. J. Howard, and S. H. Berlocher, eds.). Oxford University Press, New York.

- Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM e Marrelli MT (2014) Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. *Parasit Vectors* 7: 174.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305–318.
- Dujardin JP (2008) Morphometrics applied to medical entomology. *Inf Genet Evol* 8:875-890.
- Dujardin JP, Bermúdez H e Schofield CJ (1997) The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Trop* 66: 145-153.
- Dvorak V, Aytakin A, Alten B, Skarupova S, Votypka J e Volf P (2006) A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). *J Vector Ecol* 31: 229-238.
- Esseghir S, Ready P, Killick-Kendrick R e BenIsmaïl R (1997) Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol Biol* 6: 211-225.
- Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p.
- Florin DA e Rebollar-Téllez EA (2013) Divergence of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) is Indicated by Morphometric and Molecular Analyses when Examined between Taxa from the Southeastern United States and Southern Mexico. *J Med Entomol*. doi:org/10.1603/ME13085.
- Florin DA, Davies SJ, Olsen C, Lawyer P, Lipnick R, Schultz G, Rowton E, Wilkerson R, Keep L. (2011) Morphometric and molecular analyses of the sand fly species *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected from seven different geographical areas in the southeastern United States. *J Med Entomol* 46:154–166.
- Furtado T (1994). Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328.
- Genaro O (2004). Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. et al. Parasitologia humana. 10. ed. Rio de Janeiro: Atheneu,. p. 56-72.
- Gomez G, Jaramillo L e Correa MM (2013) Wing Geometric morphometry and molecular assessment of members in the Albitarsis Complex from Colombia. *Mol Ecol Resour* 13:1082–1092.
- Gontijo B e Carvalho MLR (2003) Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36:71–80.
- Grimaldi G, Tesh RB e McMahon-Pratt D (1989) A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41:687-725.
- Haffer J (2008) Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz J Biol* 68:917–947.
- Hamarsheh O, Presber W, Abdeen Z, Sawalha S, Al-Lahem A e Schoenian G (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Mol Ecol Notes* 6: 826-828.
- Hoy MA (2013) *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*, third ed. Elsevier, Amsterdam.

- Iglésias JDF (1997). Aspectos médicos das parasitoses humanas. Rio de Janeiro: Medsi, 483p.
- Jirakanjanakit N e Dujardin JP (2005) Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 858–861.
- Justiniano SCB, Chagas AC, Pessoa FAC e Queiroz RG (2004) Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Braz J Biol* 64: 227–235.
- Kambhampati S e Smith P (1995) PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Mol Biol* 4: 223-236.
- Knowlton N e Weigt, LA (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265:2257–2263.
- Konopka RJ e Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 2112–2116.
- Kyriacou CP e Hall JC (1980) Circadian rhythm mutations in *Drosophila* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6729–6733.
- Kyriacou CP e Hall JC (1982) The function of courtship song rhythms in *Drosophila*. *Anim Behav* 30: 784–801.
- Kyriacou CP e Hall JC (1986) Interspecific genetic control of courtship song production and reception in *Drosophila*. *Science* 232: 494–497.
- Lainson R (1988) Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Phil Trans R Soc B* 321: 389-404.
- Lainson R e Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of visceral leishmaniasis, with particular reference to Brasil – A Review. *Mem inst Oswaldo Cruz* 8: 811-827.
- Lainson R e Shaw JJ (2005) New World leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; Kreier J. P.; Wakelin, D. *Microbiology and Microbial Infections, Parasitology* 17:313-349.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD e Naiff RD (1979). Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 239–242.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Miles M e Póvoa M (1981) Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. brasiliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 530–536.
- Lainson R, Ward RD e Shaw JJ (1976). Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70: 171-172.
- Lainson R, Ward RD e Shaw JJ (1978) *Leishmania* in Phlebotominae sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc Roy Soc London* 199:309- 320.
- Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM e Suesdek L (2012) Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors* 5: 1–7.

- Lynch M e Jarrell FE (1993) A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135: 1197-1208.
- Lynne S, Garcia A e Bruckner DA (1997) Leishmaniasis. *Diagnostic Medical Parasitology*. (ed. D.C. Washington) p. 167-190. London, AS Press.
- Lyra ML, Hatadani LM, Azeredo-espin AML e Klaczko LB (2010) Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. *Bull Entomol Res* 100: 19-26.
- Maingon R, Feliciangeli MD, Ward R, Chance M, Adamson R, Rodriguez N, Convit J, Petralanda I, Hernandez A e Segovia M (1993) Molecular approaches applied to the epidemiology of leishmaniasis in Venezuela. *Arch Inst Pasteur Tunis* 70: 309-324.
- Maingon R, Ward R, Hamilton J, Noyes H, Souza N, Kemp SJ e Watts PC (2003) Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará state, Brazil. *Mol Ecol* 12: 1879-1894.
- Marcondes C D (2001) *Entomologia médica e veterinária*. São Paulo: Atheneu, 432. p.13-30.
- Marzochi M C A, Schubach A O, Marzochi K B F (1999) Leishmaniose tegumentar americana. In: Cimerman, B., Cimerman, S. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. São Paulo: Atheneu, 375p. p. 39-64.
- Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J (2004) Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32:46–56.
- Monteiro LR e Reis SF (1999) *Princípios de Morfometria Geométrica*. Ribeirão Preto, Holos Editora Ltda, p. 188.
- Moritz C, Dowling TE e Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 269-292.
- Navajas M, Gutierrez J, Bonato O, Bolland HR e Mapangou-Divassa S (1994) Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* Acari: Tetranychidae using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp Appl Acarol* 18: 351–360.
- Navajas M, Gutierrez M, Lagnel J e Boursot P (1996) Mitochondrial cytochrome oxidase I in a Tetranychidae mite: a comparison between molecular phylogeny and change of morphological and life history traits. *Bull Entomol Res* 86: 407–417.
- Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J e Boursot P (1998) Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 8: 742–752.
- Parker GD, Chalmers KJ, Rathjen AJ e Langride P (1998) Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 97:238-245.
- Prudhomme J, Gunay F, Rahola N, Ouanaïmi F, Boumezzough A, Bañuls AL, Sereno D e Alten B (2012) Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco . *J Vec Ecol* 37: 137–147.

- Rangel EF e Lainson R (2003) Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 367 p.
- Rey L (1992) Bases da parasitologia medica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 349 p.
- Rey L (2001) Dípteros nematóceros em geral: psicodídeos, simulídeos e ceratopogonídeos. In: Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 56:697-703.
- Ritchie MG, Halsey EJ e 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.
- Roderick GK e Gillespie RG (1998) Speciation and phylogeography of Hawaiian terrestrial arthropods. Mol Ecol 7: 519–532.
- Rohlf FJ e Marcus LF (1993) A revolution in morphometrics. Trends Ecol Evol 8: 129-132.
- Sakai T e Ishida N (2001) Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 98: 9221–9225.
- 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.
- Shephard GE, Müller RD, Liu L, Gurnis M (2010) Miocene drainage reversal of the Amazon River driven by plate–mantle interaction. Nat Geosci 3:870–875.
- Shimabukuro PHF, Andrade AJ e Galati EAB (2016) Phlebotominae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. (<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/3297>) (accessed 12 May 2016).
- Simmons RB e Weller SJ (2001) Utility and evolution of cytochrome *b* in insects. Mol Phyl Evol 20: 196-210.
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2016) Informações de Saúde (TABNET). <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203> (Accessed 8 April 2017).
- Soares-Bezerra RJ, Leon L e Genstra M (2004) Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Braz J Pharm Sci. 40:139-149.
- Togerson D, Lampo M, Velázquez Y e Woo P (2003) Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). Ann J Trop Med Hyg 69: 484- 493.
- Uchimura M, Faye EJ, Shimada S, Arai S, Inoue T, Nakamura Y (2006) Re-evaluation of the taxonomic status of *Halophila euphlebia* Makino (Hydrocharitaceae) based on morphological features and ITS sequence data. Bot Mar 49: 111–121.
- Ura S (2008). Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). In: Farhat, Calil Kairalla; Carvalho, Luiza Helena Falleiros Rodrigues; SUCCI, Regina Celia de Menezes. Infectologia Pediátrica. Sao Paulo: Atheneu 67: 871-888.
- Vidal PO, Carvalho E e Suesdek L (2012) Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 107: 1030-1034.
- Vivero R, Contreras-Gutiérrez M e Bejarano E (2007) Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. Biomédica. 27: 429-438.
- Walker J e Rapley R (2000) Molecular biology and biotechnology. Royal Society of Chemistry.

- Wares JP e Cunningham CW (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 12: 2455–2469.
- Watts PC, Hamilton JG, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R e Maingon RD (2005). Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 73: 734-43.
- Waycott M, Freshwater D, York R, Calladine A e Kenworthy WJ (2002) Evolutionary trends in the seagrass genus *Halophila* (Thouars): insights from molecular phylogeny. *Bull Mar Sci* 71: 1299–1308.
- WHO - World Health Organization 2016. Leishmaniasis [acession 2017 Out 12]. Available from: <http://www.who.int>.
- Wilson AC, Cann RL, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD e Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc* 26: 375-400.
- Young DC e Duncan NA (1994) Guide to the identification and geographic distribution os *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem An Entomol Institut* 54: 1-88.

ANEXO A - CURRICULUM VITAE (LATTES)**Moises Thiago de Souza Freitas****Dados pessoais****Nome** Moises Thiago de Souza Freitas**Nascimento** 18/05/1986 - recife/PE - Brasil**CPF** 059.257.644-20

Formação acadêmica/titulação

2014 Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino
Co-orientador: Felipe Arley Costa Pessoa
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior

2012 - 2014 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Estrutura genética de três populações alopátricas de
Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis, Ano de obtenção: 2014

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Co-orientador: Felipe Arley Costa Pessoa

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

2008 - 2012 Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Diferenciação Genética entre Duas Populações
Simpátricas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae:
Phlebotominae) do Município de Sobral - CE, Brasil
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Formação complementar

2016 - 2016 Curso de curta duração em Análises Filogenéticas e Identificação
Molecular de Espécies. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife,
Brasil

2015 - 2015 Estabelecimento de colônia de flebotomíneos. .
Instituto Leônidas e Maria Deane, ILMD/ FIOCRUZ AM, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em Genética Forense e Identificação

Humana. (Carga horária: 8h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Basic Course for Travel Medicine.
SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE MEDICINA DEL VIAJERO,
SLAMVI, Argentina
- 2011 - 2011** Dissecção e identificação de flebotomíneos. . (Carga horária:
64h).
Instituto Leônidas e Maria Deane, ILMD/ FIOCRUZ AM, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Análise Proteômica. (Carga horária:
4h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Genética e Biologia molecular de
Insetos Vetores. (Carga horária: 75h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Enzimas de organismos aquáticos e
suas aplicações. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2009 - 2009** Extensão universitária em Avanços no diagnóstico molecular e
genética humana. (Carga horária: 44h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2009 - 2009 Extensão universitária em biologia molecular do gene. (Carga horária: 62h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2012 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGB/RENORBIO

Vínculo institucional

2016 - 2016 Vínculo: Ensino , Enquadramento funcional: Disciplina ministrada de Bioinformática , Carga horária: 45, Regime: Integral

Outras informações:

ICSD25 Bioinformática

Revisor de projeto de agência de fomento

1. Pró-Reitoria de Extensão e Cultura - UFPE

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

Outras informações:

Edital PIBEX TEMÁTICO 2016

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. FERREIRA, E. C. B.; **FREITAS, M. T. S.**; Sombra, K.D.S.; SIQUEIRA, H. A. A.; ARAUJO, E. L.; BALBINO, V. Q. MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Liriomyza* SPECIES IN THE NORTHEAST AND SOUTHEAST REGIONS OF BRAZIL. Revista Caatinga. , v.30, p.892 - 900, 2017.

2. **DE SOUZA FREITAS, MOISES THIAGO**; DOS SANTOS, CARLOS

FERNANDO ROCHA; DE ANDRADE, EDILBERTO MARINHO; MARCONDES, CARLOS BRISOLA; DE QUEIROZ BALBINO, VALDIR; ARLEY COSTA PESSOA, FELIPE New Records of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From the State of Alagoas, Northeast of Brazil. JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY. , v.xx, p.1 - 6, 2017.

3. **FREITAS, M. T. S.**; COSTA-JUNIOR, C. R. L.; SILVA, L. G.; Leal-Balbino, T.C.; BALBINO, V. Q.

Cytochrome Oxidase I as Tool to Evaluate the *Lutzomyia longipalpis* Complex: Useful Molecular Marker or Not?. Vector Biology Journal. , v.3, p.1 - 4, 2016.

4. LIMA, LEONARDO H. G. DE M.; MESQUITA, MARCELO R.; SKRIP, LAURA; **DE SOUZA FREITAS, MOISÉS T.**; SILVA, VLADIMIR C.; KIRSTEIN, OSCAR D.; ABASSI, IBRAHIM; WARBURG, ALON; BALBINO, VALDIR DE Q.; COSTA, CARLOS H. N. DNA barcode for the identification of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* plant feeding preferences in a tropical urban environment. Scientific Reports. , v.6, p.29742 - , 2016.

5. **DE SOUZA FREITAS, MOISES THIAGO**; RÍOS-VELASQUEZ, CLAUDIA MARIA; DA SILVA, LIDIANE GOMES; LIMA COSTA, CÉSAR RAIMUNDO; MARCELINO, ABIGAIL; LEAL-BALBINO, TEREZA CRISTINA; BALBINO, VALDIR DE QUEIROZ; PESSOA, FELIPE ARLEY COSTA Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the period clock gene. Acta Tropica. , v.154, p.149 - 154, 2016.

6. LIMA COSTA, CÉSAR RAIMUNDO; **FREITAS, MOISES THIAGO DE SOUZA**; SANTIAGO FIGUEIRÊDO, CARLOS ALBERTO; ARAGÃO, NÁDIA CONSUELO; DA SILVA, LIDIANE GOMES; MARCONDES, CARLOS BRISOLA; DIAS, RAIMUNDO VIEIRA; LEAL-BALBINO, TEREZA CRISTINA; SOUZA, MANUELA BARBOSA RODRIGUES; RAMALHO-ORTIGÃO, MARCELO; BALBINO, VALDIR DE QUEIROZ Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites & Vectors*. , v.8, p.193 - , 2015.

7. SILVA, M. B. A.; MENEZES, K. R.; SIQUEIRA, A. M.; BALBINO, V. Q.; LOROSA, E. S.; FARIAS, M. C. G.; **FREITAS, M.T.S.**; SILVA, A.; PORTELA, V. M. C.; JURBERG, J.

IMPORTÂNCIA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS EM PERNAMBUCO, BRASIL, EM 2012. *Revista de Patologia Tropical (Impresso)*. , v.44, p.195 - 206, 2015.

8. **DE SOUZA FREITAS, MOISES THIAGO**; RÍOS-VELASQUEZ, CLAUDIA MARIA; COSTA, CÉSAR RAIMUNDO LIMA; FIGUEIRÊDO, CARLOS ALBERTO SANTIAGO; ARAGÃO, NÁDIA CONSUELO; DA SILVA, LIDIANE GOMES; DE ARAGÃO BATISTA, MARCUS VINICIUS; BALBINO, TERESA CRISTINA LEAL; PESSOA, FELIPE ARLEY COSTA; DE QUEIROZ BALBINO, VALDIR Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasites & Vectors*. , v.8, p.448 - , 2015.

9. **FREITAS, M.T.S.**; GOMES-JÚNIOR, P.P.; BATISTA, M.V.A.; Leal-Balbino, T.C.; ARAUJO, A.L.; BALBINO, V.Q. Novel DNA extraction assay for molecular identification of *Aedes* spp eggs. *Genetics and Molecular Research*. , v.13, p.8776 - 8782, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **FREITAS, M. T. S.**; RIOS-VELASQUEZ, C. M.; SILVA, L. G.; Leal-Balbino, T.C.; BALBINO, V. Q.; PESSOA, F. A. C.

ANALYSIS OF THE GENETIC STRUCTURE OF ALLOPATRIC POPULATIONS OF *Lutzomyia umbratilis* USING THE PERIOD CLOCK GENE In: VI Workshop on Genetics and Molecular Biology of Insect Vectors of Tropical Diseases, Meeting of the Society for Vector Ecology-Brazil (ENTOMOL 6 /SOVE-Brazil), 2016, Recife.

ENTOMOL6/SOVE-Brazil. , 2016.

2. **FREITAS, M. T. S.**; SOUSA-PAULA, L. C.; SILVA, L. G.; Leal-Balbino, T.C.; BALBINO, V. Q.

CYTOCHROME OXIDASE I AS TOOL TO EVALUATE THE *Lutzomyia longipalpis* COMPLEX: USEFUL MOLECULAR MARKER OR NOT? In: VI Workshop on Genetics and Molecular Biology of Insect Vectors of Tropical Diseases, Meeting of the Society for Vector Ecology-Brazil (ENTOMOL6 / SOVE-Brazil), 2016, Recife.

ENTOMOL6/SOVE-Brazil. , 2016.

3. LOPES, F. S. C.; OLIVEIRA, J. V.; **FREITAS, M.T.S.**; FERREIRA, E. C. B.;
BALBINO, V. Q.; OLIVEIRA, J. E. M.

Identificação molecular de cochonilhas-farinhentas (Pseudococcidae) associadas a videira no Submédio São Francisco In: XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2014, Goiania.

XXV Congresso Brasileiro de Entomologia. , 2014.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **FREITAS, M.T.S.**

XI Curso de Bioinformática: Análise de Dados Moleculares, 2016. (Outra produção técnica)