

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

CESAR RAIMUNDO LIMA COSTA JUNIOR

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E POLIMORFISMOS FIXADOS
NO GENE *PERIOD* ENTRE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Lutzomyia longipalpis no Brasil**

**Recife
2016**

CESAR RAIMUNDO LIMA COSTA JUNIOR

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E POLIMORFISMOS FIXADOS
NO GENE *PERIOD* ENTRE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Lutzomyia longipalpis no Brasil**

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: José Marcelo Ramalho Ortigão

Coorientador Valdir de Queiroz Balbino

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Costa Junior, Cesar Raimundo Lima

Estruturação genética e polimorfismos fixados no gene period entre populações naturais de *Lutzomyia longipalpis* no Brasil/ Cesar Raimundo Lima Costa Junior– Recife: O Autor, 2016.

74 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Marcelo Ramalho Ortigão

Coorientador: Valdir de Queiroz Balbino

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2016.

Inclui referências

- 1. Genes 2. Lutzomyia 3. Leishmaniose I. Ortigão, José Marcelo Ramalho (orientador) II. Balbino, Valdir de Queiroz Balbino (coorientador) III. Título**

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-173

CESAR RAIMUNDO LIMA COSTA JUNIOR

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E POLIMORFISMOS FIXADOS NO GENE *PERIOD*
ENTRE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Lutzomyia longipalpis* no Brasil**

Aprovado em 11/03/2016

Banca Examinadora:

**Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Vladimir Costa Silva
Universidade Federal do Piauí**

**Dra. Manuela Souza Rodrigues Barbosa
Universidade Católica de Pernambuco**

**Dr. Wellington Marques da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

Recife

2016

Dedico este trabalho a minha família, a todos que torcem pelo meu sucesso e aos grandes mestres que encontrei pela minha caminhada.

Agradecimentos

Aos meus pais, que sempre me deram incentivo e confiança para os propósitos que traço para minha vida, e por serem os alicerces do meu caráter.

Agradeço à minha irmã, pela companhia e carinho.

Aos meus tios Armando, Sinalva, Malaquias, Cleonice e Vera Lúcia que, depois de meus pais, são as minhas referências em minha família.

Aos meus primos Armando Júnior, Mônica, Davi, e Amanda, por sempre me tratarem como um irmão.

Aos que fazem parte de minha família escolhida, os irmãos do peito: Frederico, Tiago, Rudson, Fabrício, Marjorie, Aline e Flora, por tornarem minha vida mais divertida e fraternal.

Ao Pernambuco por me acolher e me dar a oportunidade de conhecer dois grandes mestres em minha vida até o momento: meu co-orientador Valdir Balbino - exemplo de como exercer esta profissão sempre batalhando pelos seus alunos - pela confiança, paciência, compreensão e principalmente amizade; e Nara Freitas - grande exemplo de humanidade e companheirismo - pela acolhida maternal durante esses anos.

Ao meu orientador Marcelo Ortigão, pela paciência por ter contribuído muito para o amadurecimento da minha escrita.

Aos meus colegas e amigos Carlos, Lidiane, Moises, Manuela e Klaudia, pelo apoio na realização dos trabalhos e pela história que compartilhamos que me trouxeram companhia e divertimento.

Aos meus amigos pernambucanos: Francisco, Viviane, Isabela, Raul, Janeide, Wagner e Glória, que dividiram comigo estes anos com alegria e carinho.

Agradeço em especial à família Abib por me acolher neste meu novo caminhar, em especial a Rodrigo e Janaína pela compreensão e companheirismo. Aos membros do LGMH, pelo apoio e amizade.

À FACEPE pela concessão de bolsa.

"Afinal que é o homem dentro da natureza? Nada, em relação ao infinito; tudo, em relação ao nada; um ponto intermediário entre o tudo e o nada. Infinitamente incapaz de compreender os extremos, tanto o fim das coisas quanto o seu princípio permanecem ocultos num segredo impenetrável, e é-lhe igualmente impossível ver o nada de onde saiu e o infinito que o envolve. Que poderá fazer, portanto, senão perceber alguma aparência das coisas num eterno desespero e não poder conhecer nem seu princípio nem seu fim?" (Pascal).

Resumo

O *status taxonômico* de espécie tem se mostrado essencial em relação a conservação de espécies como também para estudos eco-epidemiológicos. O *status taxonômico* em insetos vetores tem demonstrado que muitas espécies anteriormente ditas como únicas, compreendiam, na verdade, um complexo de espécies crípticas em que seus integrantes podem ter capacidades vetoriais diferenciadas, e.g. *Anopheles gambiae* *Lutzomyia longipalpis* *sl*, inseto vetor da *Leishmania infantum* (agente etiológico da leishmaniose visceral americana), possui *status taxonômico* ainda controverso e diversos estudos têm sido realizados à fim de esclarecer o real *status* deste vetor. Apesar de diversas populações apresentarem características exclusivas (e.g. feromônios, sons copulatórios, padrões de manchas abdominais e estrutura genética), a quase duas décadas apenas uma espécie do complexo foi descrita, a *L. pseudolongipalpis*. Foi avaliado três localidades do nordeste do Brasil, das quais duas possuem como barreira geográfica a Chapada do Araripe. Foram utilizadas metodologias robustas como Análise de Máxima Verossimilhança, Teste de atribuição e AMOVA. Este estudo utilizou um fragmento do gene *period*, sendo que o Teste de Atribuição, Fst e a Máxima Verossimilhança separaram agruparam os dados genéticos com as diferenças fenotípicas e pela primeira vez o AMOVA demonstrou que a maior variação genética estava na relação entre o número de manchas abdominais e a estrutura genética das populações, sendo o primeiro trabalho a evidenciar a ancestralidade do fenótipo que apresentava uma mancha abdominal (1S) em relação ao fenótipo com duas manchas (2S). O Fst encontrado evidenciou, pela primeira vez, as relações filogeográficas separando moderadamente as populações isoladas pela a chapada do Araripe.

Palavras-chave: Espécies crípticas, *Lutzomyia longipalpis*, gene *period*.

Abstract

The *taxonomic status* of species is essential for conservation and has also been of great importance in eco-epidemiological studies. The definition of the *taxonomic status* for insect vectors has demonstrated that several previously identified species are in fact comprised of a complex of cryptic species with different vectorial capacity (e.g. *Anopheles gambiae*). For the sand fly *Lutzomyia longipalpis* sl, principal vector of *Leishmania infantum*, the etiological agent of American visceral leishmaniasis, the *taxonomic status* remains controversial and several studies have been conducted to clarify the actual status of this vector. Although diverse populations present unique characteristics (e.g. pheromones, copulatory sounds, patterns of abdominal spots and genetic structure), for nearly two decades only one species of the complex was described, *L. pseudolongipalpis*. In this study, we evaluated three sites in Northeastern Brazil where two of them have as geographical barrier the plateau of Araripe. The study used robust methods such as Maximum Likelihood analysis, assigning test and AMOVA. The present study used a fragment of the period gene (525 base pairs), and has demonstrated for the first time a relationship between the number of abdominal spots and the genetic structure of the population, being first study to show the ancestry of the phenotype showed one abdominal spot (1S) compared to the phenotype with two spots (2S). As well as the F_{st} found separated populations isolated by the Araripe plateau.

Key words: Cryptic species, *Lutzomyia longipalpis*, period gene.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Exemplos de flebotomíneos	17
Figura 2: Fêmea ingurgitada de flebotomíneo	18
Figura 3: Ovos, larvas e pupas de flebotomíneos	20
Figura 4: Ciclo biológico de <i>Leishmania ssp</i>	21
Figura 5: Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo	22
Figura 6: Machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>, destacando os fenótipos com uma e duas manchas abdominais	26
Figura 7: Resumos das informações disponíveis para sons copulatórios e tipo de feromônio para as populações <i>L. longipalpis</i>	28
Figura 8: Regulação do gene <i>period</i>	33

Lista de Tabelas

Item

Tabela 1 (Anexo): Material suplementar do artigo; frequência haplotípica de <i>Lutzomyia longipalpis</i> das três localidades do Nordeste do Brasil	64
---	----

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
1S	Fenótipo de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com uma mancha no tergito abdominal
2S	Fenótipo de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com duas manchas no tergito abdominal
AMOVA	Análise de variância molecular
<i>Fst</i>	Índice de Fixação
<i>G</i>	Distribuição Gama
<i>TVM</i>	Modelo Evolutivo
<i>HKY</i>	Modelo Evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano
<i>I</i>	Proporção de sítios invariáveis
<i>K</i>	Número de populações utilizado no STRUCTURE
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
mm	Milímetros
<i>pb</i>	Pares de base
<i>per</i>	Gene <i>period</i>
Thr-Gly□	Região repetitiva dos aminoácidos treonina e glicina
TIM	Proteína Timeless
<i>TrN</i>	Modelo Evolutivo Tamura e Nei
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão da Literatura	16
2.1 Flebotomíneos	16
2.2 Leishmanioses	21
2.3 Espécies crípticas	23
2.4 Complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	26
2.5 Principais métodos de bioinformática que auxiliam no estudo do complexo de espécie	30
2.6 Gene <i>period</i>	33
3. Objetivos	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. Artigo	38
5. Discussão Geral	49
6. Conclusões Gerais	52
Referências	53
Anexo 1 - Árvore Filogenética de Neighbour-joining e Frequências haplotípicas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> das três localidades do Nordeste do Brasil	63
Anexo 2 - Curriculum Vitae	68

1. Introdução

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Pyschodidae: Flebotominae) principal vetor da *Leishmania infantum* na América Latina, possui o *status* taxonômico de complexo de espécie nesta região. O único integrante descrito para o complexo *L. longipalpis* é o *L. pseudolongipalpis*, restrito à Venezuela, também é vetor da *L. infantum*. A maior parte das fêmeas são “idênticas” para diversos grupos de flebotomíneos. Desse modo, a identificação das espécies é estritamente realizada através dos machos. Portanto, métodos genéticos são imprescindíveis para identificar as fêmeas monotípicas.

A baixa capacidade de vôo, associada aos vários biomas e às barreiras geográficas presentes no Brasil, fornecem um cenário propício ao surgimento de um complexo de espécies crípticas entre os flebotomíneos. Entretanto, para o Brasil, o complexo *L. longipalpis* ainda não possui nenhuma espécie descrita, apesar de suas populações possuírem características exclusivas (e.g. feromônios, sons copulatórios, estrutura genética). A característica morfológica que permite identificar as possíveis espécies de *L. longipalpis* que vivem em simpatria é o número de manchas abdominais presentes nos machos ditos 1S e 2S (uma mancha e duas manchas abdominais respectivamente). Entretanto, este fenótipo não é um caractere informativo para taxonomia e, portanto, não pode ser utilizado para separar as espécies do complexo *L. longipalpis* no Brasil.

O presente estudo utilizou um fragmento do gene *period* de 525 pares de bases (*pb*), ainda não utilizado em estudos de genética de populações destes flebotomíneos. Foram empregados algoritmos estatisticamente robustos como Máxima Verossimilhança, Teste de Atribuição e Análise de Variância Molecular (AMOVA). O trabalho avaliou as populações simpátricas 1S e 2S das localidades de

Caririaçu e Sobral (Ceará) e Bodocó (Pernambuco), em que a chapada do Araripe separa os dois estados brasileiros parece atuar como barreira geográfica com mais de 1000m de altitude. Nas três localidades foram encontradas as mesmas formas fenotípicas de *L. longipalpis*, e o teste de atribuição detectou duas populações estruturadas para cada localidade. Quando juntas, as três localidades também apresentaram apenas duas populações genéticas, evidenciando que cada fenótipo pertencia a uma população genética definida. A AMOVA pela primeira vez evidenciou que a maior parte da variação genética estava relacionada aos fenótipos, atribuindo um peso maior às manchas abdominais.

A análise filogenética demonstrou a posição derivada do fenótipo 2S em relação a 1S e os FSTs encontrados apresentaram a maior distância genética entre os fenótipos da localidade de Bodocó, enaltecendo a importância da chapada do Araripe como barreira geográfica. O marcador per de 525pb promoveu maiores conhecimentos acerca da distribuição do *L. longipalpis* no Nordeste do Brasil e exibiu polimorfismos mais consistentes em relação ao fragmento 266pb, geralmente utilizado na literatura deste complexo.

2. Revisão da Literatura

2.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros de pequeno porte pertencentes à subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, que surgiram no período Cretáceo Inferior. Esta subfamília é composta por seis gêneros, três dos quais são característicos do Velho Mundo (*Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*) e três são encontrados exclusivamente no Novo Mundo [*Warleyia*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia*] (Young e Duncan, 1994). Uma vez que ainda não foram identificados vestígios fósseis demonstrando a ocorrência simultânea de algum destes gêneros no Velho e no Novo Mundo, acredita-se que a divergência entre eles tenha ocorrido há dezenas de milhões de anos (Lewis, 1982).

A subfamília Phlebotominae engloba dípteros de importância no âmbito da saúde pública, pois é notória a presença de espécies vetoras de agentes etiológicos causadores de diversas patologias, tais como: arboviroses, bartonelose e leishmanioses (Forattini, 1973). Das cerca de 900 espécies descritas no mundo, estima-se que pelo menos 50 sejam possíveis vetores de patógenos relacionados à transmissão das leishmanioses (Rangel e Lainson, 2003, Kamhawi, 2006).

O ciclo biológico dos flebotomíneos tem duração de 30 a 90 dias, de acordo com as condições ambientais observadas (Brazil *et al.*, 2003). As formas adultas (Figura 1) apresentam dimensões reduzidas (2 a 3 mm), exibem o corpo e as asas densamente cobertos por cerdas e possuem antenas compostas por 16 segmentos (Marzochi, 1992). Os flebotomíneos apresentam vôos curtos e baixos, conferindo-lhes um comportamento peculiarmente saltitante dentro de um raio de dispersão não superior a 200 metros (Alexander e Young, 1992). Possuem hábitos crepusculares e

noturnos, apesar de algumas espécies também se alimentarem durante o dia, conforme já foi observado em *L. umbratilis* na região amazônica (Lainson *et al.* 1994).



Figura 1: Exemplos de flebotomíneos adultos.

Fonte (<http://image.slidesharecdn.com/9-150226064640-conversion-gate01/95/9-leishmaniose-9-638.jpg?cb=1424954853>). Acesso em 25/10/2015

Os flebotomíneos são encontrados em ecótopos naturais, tais como troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, frestas em rochas e em cavernas (Brazil *et al.*, 2003, Azevedo *et al.*, 1993). Algumas espécies são também encontradas em ambientes rurais e urbanos, que se caracterizam pela presença de abrigos de animais domésticos e habitações humanas, sugerindo que estes organismos se encontram em processo de adaptação às áreas antropicamente modificadas (Tolezano *et al.*, 2001).

Modificações abruptas nos ecossistemas têm selecionado características ecológicas de várias espécies de flebotomíneos e de reservatórios, interferindo diretamente na dinâmica de transmissão das leishmanioses. Este novo cenário emerge dos desmatamentos, a partir dos quais alguns hospedeiros do parasita

podem adentrar espaços habitados pelo homem, onde eventualmente são encontrados flebotomíneos adaptados ao ambiente domiciliar. De hábitos alimentares bastante diversificados, tornam-se aptos a transmitir o parasita entre humanos e mamíferos domésticos com relativa facilidade (Costa *et al.*, 2007).

Geralmente notívagos, somente as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas (Figura 2). Algumas espécies apresentam uma notável especificidade alimentar, no que se refere à obtenção de fontes de repastos sanguíneos, enquanto que outras são extremamente promíscuas, alimentando-se numa gama considerável de espécies de vertebrados (Morrison *et al.*, 1993).



Figura 2: Fêmea adulta ingurgitada *Phlebotomus* sp.

Fonte (<http://exame.abril.com.br/tecnologia/noticias/especie-do-parasita-e-decisiva-na-resposta-a-leishmaniose>). Acesso em 25/10/2015

A saliva constitui elemento crítico na hematofagia das fêmeas dos flebotomíneos, uma vez que afeta as respostas hemostáticas, inflamatórias e imunológicas dos hospedeiros. Em geral, sabe-se que a saliva dos insetos hematófagos apresenta pelo menos uma substância antiplaquetária, uma

anticoagulante e uma substância vasodilatadora que, em conjunto, propiciam um ambiente favorável à obtenção de sangue e ao parasitismo (Andrade *et al.*, 2005).

O sangue exerce importantes funções na maturação dos ovos e quando estes se tornam viáveis e são ovopositados entre três a oito dias após o repasto (Marcondes, 2001). Entretanto, em estudo realizado com *P. papatasi*, foi demonstrado que mesmo sem repasto sanguíneo, as fêmeas são capazes de ovopositar apenas com dieta alimentar baseada em carboidratos (Tesh e Guzman, 1996).

Existem ainda fatores intrínsecos à capacidade vetorial dos flebotomíneos, que se comportam como espécie-específicos e, desta forma, observa-se que a maioria das espécies de flebotomíneos parece ser refratária ao desenvolvimento de *Leishmania* (Sacks e Kamhawi, 2001). Andrade e colaboradores (2002) realizaram um estudo para investigar a transmissão vertical de leishmaniose visceral canina através de fêmeas gestantes, em que não foi possível identificar a presença do parasito nos seus descendentes, tornando-se inconclusivo demonstrar a possibilidade da transmissão vertical.

A ovoposição dos flebotomíneos geralmente ocorre em locais úmidos e sombreados, onde é encontrada grande quantidade de matéria orgânica em decomposição (Forattini, 1973). A eclosão ocorre cerca de 10 dias após a sua deposição, sendo que ovos (Figura 3A) de uma mesma postura podem apresentar períodos de incubação variáveis. Existem evidências mostrando que os ovos de algumas espécies podem atravessar longos períodos de quiescência, fenômeno geralmente observado nos casos em que as condições ambientais não se mostram favoráveis à eclosão (Young e Duncan, 1994).

As larvas são pequenas ($< 1,2$ mm) e vermiformes, caracterizando-se pela presença de uma cápsula cefálica esclerotizada e de pequenas cerdas ao longo de toda a sua extensão. As larvas (Figura 3B) de primeiro estágio exibem duas cerdas longas na parte posterior do corpo, enquanto que nos demais estágios, o número observado de cerdas é quatro (Marcondes, 2001). O desenvolvimento larval ocorre em microhabitats terrestres, situados em fendas de rochas, base de troncos de árvores e tocas de animais, ambientes onde se alimentam avidamente da matéria orgânica em decomposição ali encontrada (Ferro *et al.*, 1997). Antes de se transformarem em pupas (Figura 3C), as larvas param de se alimentar e procuram abrigos menos úmidos, onde se prendem a um objeto. A fase de pupa dura de sete a doze dias, havendo uma tendência para que a emergência dos machos ocorra mais precocemente (Young e Duncan, 1994).



Figura 3: 3A Ovos; 3B Larvas; 3C Pupas de flebotomíneos.

Fonte: (http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/flies/Lutzomyia_longipalpis.htm). Acesso em 25/10/2015

2.2 Leishmanioses

As Leishmanioses são zoonoses que resultam do parasitismo dos hospedeiros vertebrados por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), apresentando vasta distribuição geográfica nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (WHO, 2008).

As leishmanias apresentam fenótipos diversos durante o seu ciclo biológico relacionados ao desenvolvimento. Estas formas representam uma adaptação às mudanças nas condições ambientais encontradas pelos parasitas nos hospedeiros vertebrados e dos insetos vetores (Besteiro *et al.*, 2007). Nos flebotomíneos, as leishmanias são células flageladas móveis que se replicam no meio extracelular e residem no trato alimentar do inseto. Nos hospedeiros vertebrados, por sua vez, as leishmanias assumem uma forma aflagelada e passam a ser denominadas de amastigotas.

Ciclo Biológico

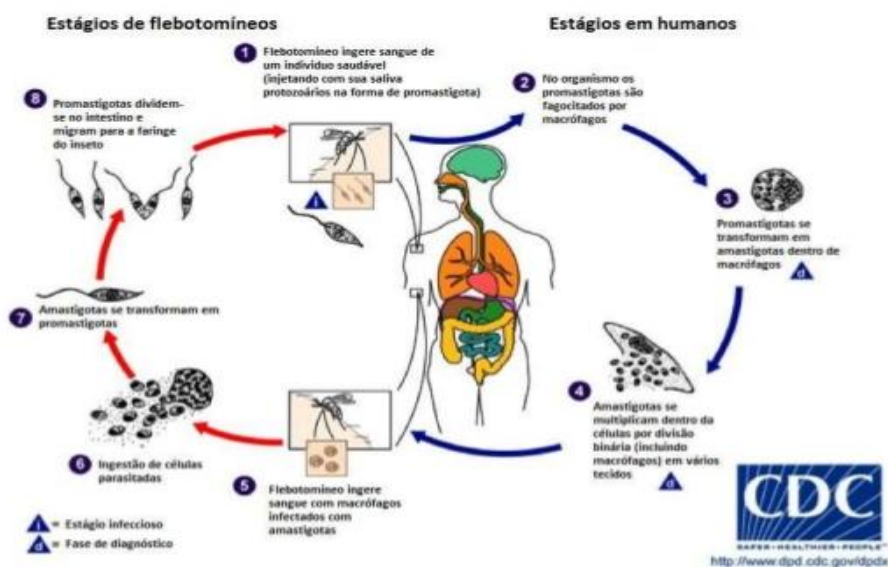


Figura 4: Ciclo biológico da *Leishmania* ssp.

Fonte: (<http://image.slidesharecdn.com/lva-150514025925-lva1-app6891/95/leishmaniose-visceral-americana-uncisal-4-638.jpg?cb=1431572522>). Acesso em 25/10/2015

As leishmanioses são endêmicas em pelo menos 88 países, nos quais acometem cerca de 12 milhões de pessoas estando distribuídas em todos os continentes exceto a Oceania e a Antártida. Decorrentes das manifestações clínicas, as leishmanioses dividem-se em dois tipos principais: tegumentar e visceral. A multiplicidade das espécies de *Leishmania*, as particularidades das situações epidemiológicas dos hospedeiros reservatórios e de vetores envolvidos, bem como a pluralidade das formas clínicas, e sua ampla distribuição, permitem distinguir vários tipos nosogeográficos de leishmanioses.

A leishmaniose visceral (LV) tem como principais agentes etiológicos a *Leishmania infantum* e a *L. donovani* no Velho Mundo e a *L. infantum chagasi*, no Novo Mundo (Lainson *et al.*, 1987). A LV constitui um sério problema de saúde pública em decorrência de sua alta incidência e letalidade nas Américas, Europa, África e Ásia. Especificamente no continente americano, estende-se desde o México até a Argentina, sendo que cerca de 90% dos casos diagnosticados em humanos são provenientes do Brasil (Monteiro *et al.*, 2005).

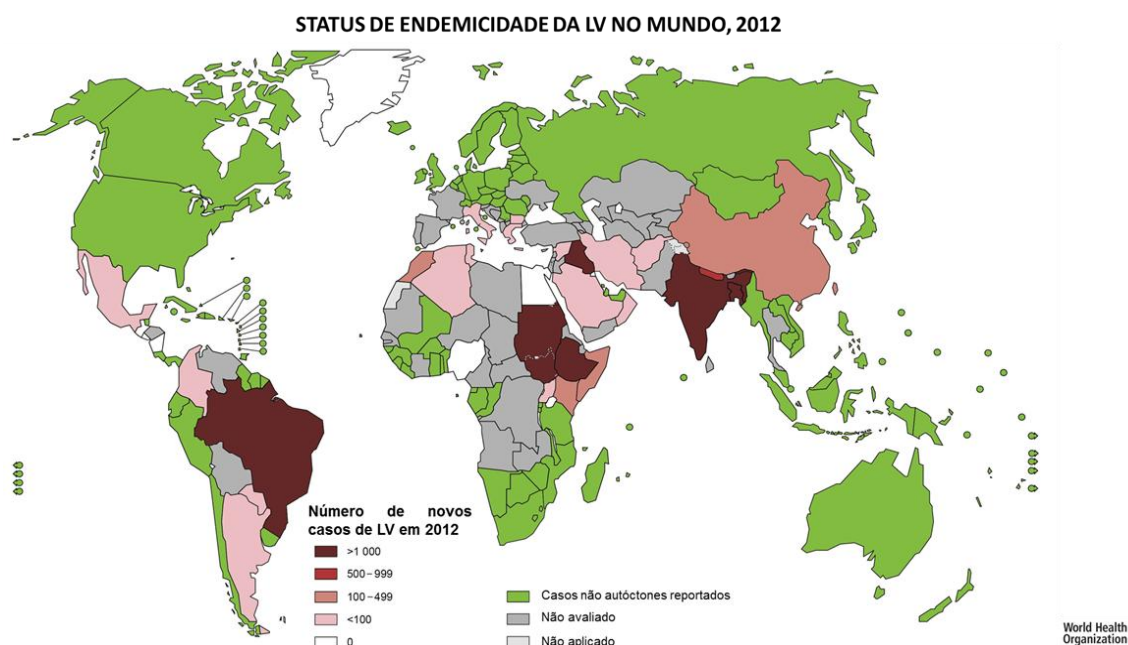


Figura 5: Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo.

Fonte : (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png) editada.
Acesso em 25/10/2015

2.3 Espécies Crípticas

Espécies crípticas são definidas como organismos que não são diferenciados através da taxonomia tradicional e podem ser dados por “idênticos” até mesmo por taxonomistas especializados (Araki *et al.*, 2009). O correto reconhecimento do *status* taxonômico das espécies que compõem um complexo tem implicações práticas para a conservação e o manejo na identificação de importantes espécies do ponto de vista econômico e medicinal (Bickford *et al.*, 2007).

Dados obtidos a partir do sequenciamento de DNA ganharam grande popularidade em estudos taxonômicos. Os trabalhos na área de taxonomia molecular são reconhecidos por fornecerem indícios importantes para a delimitação de espécies (Vogler e Monghan, 2007; Meier, 2008), uma vez que podem ser produzidos em um ritmo muito rápido e sem a necessidade de pesquisadores especializados em taxonomia (Lee, 2000; Scotland *et al.*, 2003; Vogler e Monaghan, 2007). No entanto, a utilização generalizada de dados obtidos a partir deste método tem gerado um grande problema: o desenfreado número de proposições de novas espécies crípticas, mesmo a partir de dados ainda incipientes (Tan *et al.*, 2009).

Em entomologia, a maioria das espécies é reconhecida com base em suas características morfológicas. Entretanto, a utilização exclusiva destes aspectos para algumas espécies pode gerar conflitos devido à notável variabilidade fenotípica observada em algumas famílias. No caso específico da família Sepsidae (Diptera), por exemplo, na qual a maior parte desta diversidade está relacionada a fatores ambientais (Meier, 1995), o uso de sequências de DNA se mostra particularmente útil no esclarecimento das fronteiras naturais entre as espécies (Tan *et al.*, 2009). Em outros casos, a variabilidade intraespecífica de membros desta família é, pelo

menos em parte, geneticamente determinada (Reusch e Blanckenhorn, 1998). Neste caso, sequências de DNA podem ainda ser utilizadas como provas adicionais, mesmo que se leve em consideração que a variabilidade observada em sequências de populações alopátricas pode se tornar de difícil interpretação (Petersen *et al.*, 2007; Ang *et al.*, 2008).

Espécies diferentes podem vir a compartilhar uma mesma assinatura genética específica, sendo erroneamente classificadas como uma única espécie (Meier *et al.*, 2006; 2008). Da mesma forma, populações alopátricas de espécies diferentes podem exibir padrões de sequências distintos e evidências de DNA podem, equivocadamente, sugerir que deveriam ser divididas em várias espécies (Meier, 2008; Meier *et al.*, 2008). Tem sido sugerido que a avaliação de espécies crípticas seja realizada de maneira multidisciplinar, em que dados morfológicos, etológicos e genéticos possam ser concatenados para o entendimento do *status* taxonômico de complexo de espécies (Tan *et al.*, 2009).

Resolver os conflitos taxonômicos de espécies de insetos vetores é importante para a compreensão de seu papel na transmissão de doenças. Assim, a correta identificação destes insetos evita possíveis confusões no reconhecimento das espécies vetoras e não vetoras (Marcondes, 1998). Um exemplo clássico de complexo de espécies em insetos vetores é representado pelo complexo *Anopheles gambiae*, constituído por sete espécies crípticas. Das espécies que o compõem, apenas *A. gambiae* s.s. e *A. arabiensis* são consideradas importantes vetores de *Plasmodium* no continente africano (White, 1974). Este aspecto correlaciona-se a diferenças na determinação de preferências por hospedeiros específicos e de outras características biológicas que, em conjunto, implicam diferentes capacidades vetorais (Ayala *et al.*, 2006). Em insetos vetores, a ocorrência de espécies crípticas

é um evento bastante comum e tem sido descrita para *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens*, e outros vetores (Krzywinski e Besansky, 2003; Adler *et al.*, 2010).

Em diversas espécies do gênero *Lutzomyia* as fêmeas apresentam um padrão morfológico bastante semelhante; a presença dos machos torna-se, portanto, imprescindível para a classificação taxonômica correta (figura). Este compartilhamento morfológico favorece eventos de introgressão genética e formação de híbridos – e.g *L. neivai* e *L. intermedia* (Galati *et al.*, 2010). A hipótese da introgressão também já foi detectada entre as espécies de *L. intermedia* e *L. whitmani* através de análises genéticas utilizando o gene *per* (Mazzoni *et al.*, 2006).

2.4 Complexo *Lutzomyia longipalpis*

Lutzomyia longipalpis sensu lato, o principal vetor da LV americana causada por *Leishmania infantum*, tem uma distribuição descontinuada em toda a região Neotropical (Lainson e Rangel, 2005), com diferentes populações que apresentam aspectos compatíveis com as de um complexo de espécies (Bauzer *et al.*, 2007).

Machos de *L. longipalpis* apresentam dois morfotipos atribuídos às manchas nos tergitos abdominais, denominado fenótipos de uma (1S) ou duas (2S) manchas tergitais (Figura 6). Exemplos coletados no município de Sobral, Ceará, com duas manchas abdominais no terceiro e quarto tergitos, e machos coletados no Pará, com uma mancha abdominal, foram as primeiras evidências que serviram para associar os padrões de manchas abdominais encontrados nos machos de *L. longipalpis* à possibilidade de o mesmo pertencer a um complexo de espécies crípticas (Mangabeira, 1969). Desde então, vários estudos foram realizados com o objetivo de elucidar o real *status* taxonômico de *L. longipalpis*.



Figura 6: Machos de *L. longipalpis* com uma mancha e duas manchas abdominais (1S e 2S, repectivamente).

Fonte: Aragão e Costa-Júnior. Laboratório de Bioinformatica e Biologia Evolutiva (LABBE).

Estudos de microscopia eletrônica revelaram que as manchas observadas por Mangabeira (1969) eram compostas por glândulas secretoras de feromônios sexuais (Lane e Ward, 1984). Neste contexto, foram determinados os perfis de feromônios de cinco populações brasileiras, uma da Colômbia e uma da Venezuela. Com base nestes resultados, Hamilton e Ward (1991) propuseram a existência de, no mínimo, seis populações geográficas de *L. longipalpis* na Região Neotropical, que secretam pelo menos três grupos quimicamente distintos de feromônios. Entretanto, não se observou uma relação direta entre o número de manchas tergital e o tipo de feromônio produzido (Soares e Turco, 2003).

O fenótipo de *L. longipalpis* com uma mancha abdominal (1S) é encontrado desde o México até o sul do Brasil (Ward *et al.*, 1985). A variação fenotípica com duas manchas (2S) está distribuída desde o Maranhão até Minas Gerais e também na região fronteira entre o Brasil e o Paraguai. A simpatria entre as duas formas ocorre, sobretudo, no leste do Brasil (e.g. Sobral-CE), porém, a alopatria de ambos morfotipos é observada em algumas localidades (e.g. 1S em Itaeté-BA e 2S em São

Luiz-MA). A presença de um complexo de espécies em *L. longipalpis* foi apoiada por estudos utilizando marcadores moleculares em populações das Américas Central e do Sul (revisado por Soares e Turco, 2003).

Estes estudos levaram à identificação de *L. pseudolongipalpis* (Arrivillaga e Feliciangeli, 2001), formalmente, a primeira de *L. longipalpis* táxon complexo. Mais recentemente, tem sido sugerido que o *L. cruzi*, primeiramente descrito por Mangabeira (1938), também deve ser incluído como uma das espécies crípticas do complexo de *L. longipalpis* (Vigoder *et al.*, 2010).

No Brasil, as análises de feromônios sexuais masculinos, dos sons copulatórios e de marcadores microssatélites e genes de especiação (por exemplo, *period* e *paralitic*) forneceu mais evidências para o *L. longipalpis* complexo de espécies (revisto por Bauzer *et al.*, 2007). Além disso, cinco diferentes quimiotipos de feromônios sexuais foram caracterizados em diferentes populações de *L. longipalpis* *sl* (Hamilton *et al.*, 2005). Três dos quimiotipos são os feromônios da família homosesquiterpeno (3-metil- α -himachaleno [3MaH], (S) -9-metil-germacreno-B [9MGB] e (S) -9-metil-germacreno-B + [+ 9MGB]. Dois outros quimiotipos são membros da família diterpeno: cembreno-1 e o cembreno-2. Diferentes quimiotipos podem ser associados com diferentes sons de cópula macho: 3MaH está associado ao som de cópula 1 ou songtype1; 9MGB está associado tanto ao pulso songtype2 e também ao songtype3; o cembreno-1 está associado a uma canção de cópula tipo explosão -Burst song (Bauzer *et al.*, 2007; Maigon *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2005).

A combinação de análises do gene *period*, com canções de acasalamento e tipos de feromônios sugere a existência de dois grandes grupos populacionais de *L. longipalpis* no Brasil (Araki *et al.* 2009). Um desses grupos seria representado por uma única espécie em que os machos produzem músicas tipo Burst e o feromônio

cembrene-1, estando distribuídos ao longo das regiões costeiras do Norte e Nordeste, atingindo partes da região Sudeste. O segundo grupo de espécies incipientes produzem diferentes tipos de sons copulatórios pulsados e feromônios que representam pelo menos cinco espécies com diferentes níveis de divergência genética entre elas (Figura 7). Novas evidências sugerem, que a identificação das espécies crípticas do complexo *L. longipalpis* no Brasil, está relacionada com sons durante a cópula e pela segregação do gene *paralitic* (Lins *et al.*, 2012).

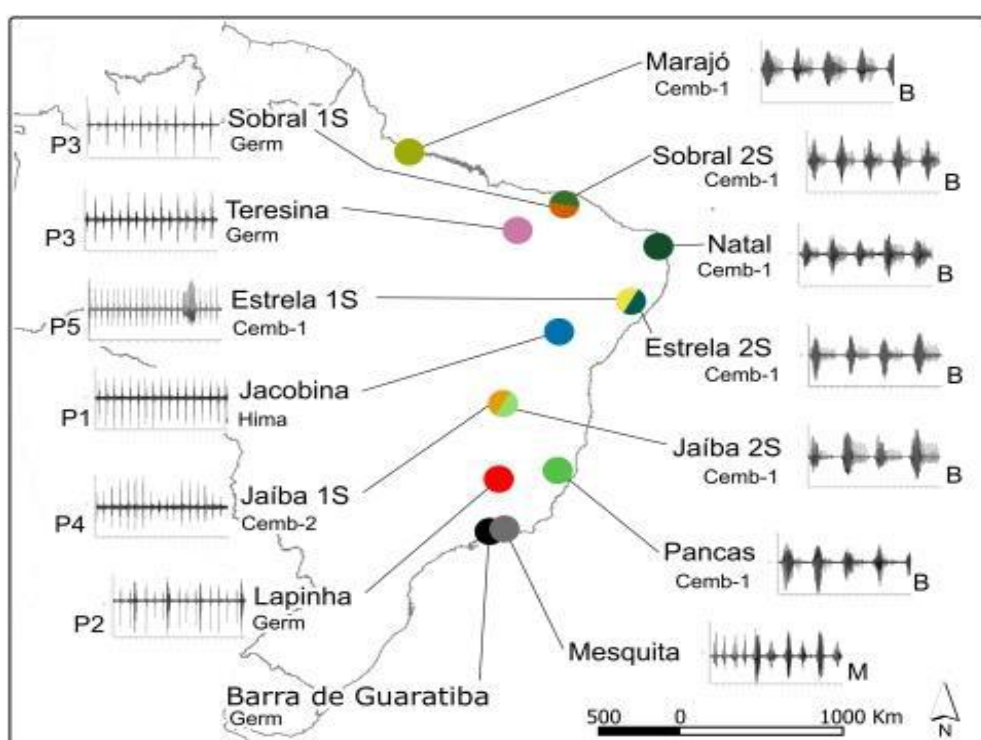


Figura 7. Resumo das informações disponíveis para os sons copulatórios e dos tipos de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* em diferentes populações do Brasil (Araki *et al.*, 2009).

Na região Nordeste, foi demonstrada a presença de pelo menos duas espécies irmãs do complexo *L. longipalpis* (Lins *et al.*, 2012). No município de Sobral, Estado do Ceará, as duas espécies ocorrem em simpatria e podem ser separadas pelo número de manchas abdominais presentes nos machos. Além da dicotomia fenotípica, a espécie 1S possui som copulatório, feromônio e estruturação genética populacional diferente da espécie 2S (Bauzer *et al.*, 2002).

Estudos de cruzamentos entre os morfotipos demonstraram a existência de um maior isolamento pré acasalamento entre populações simpátricas que nas populações alopátricas (Souza *et.al.*, 2008). O padrão de manchas abdominais tem sido amplamente utilizado como referência para populações simpátricas, no entanto, é um carácter válido apenas para triagem inicial das espécies pertencentes ao complexo *L. longipalpis* (Araki *et al.*, 2009). Entretanto, utilizando 525 pares de bases (*pb*) do gene *per* foi verificado pela primeira vez uma relação direta entre o número de manchas abdominais e o padrão genético, validando, portanto, o fenótipo com as espécies crípticas de *L. longipalpis* encontradas no Nordeste brasileiro (Costa-Júnior *et al.*, 2015).

2.5 principais métodos de bioinformática utilizados que auxiliam no estudo de complexo de espécies

A espécie é uma das unidades fundamentais da biologia, comparável em importância aos genes, células e organismos, deste modo, torna-se imprescindível sua delimitação. Mudanças morfológicas, entretanto, nem sempre são observadas como consequência do processo de especiação (Queiroz, 2006). Assim, metodologias alternativas à morfologia tradicional são frequentemente utilizadas e, neste contexto, os métodos de bioinformática baseados em marcadores moleculares destacam-se dentre os demais, devido ao número exacerbado de marcadores disponíveis.

O método da Máxima Verossimilhança (Maximum-likelihood – ML), elaborado por Felsenstein (1981), é baseado em modelos probabilísticos de evolução, podendo levar em consideração parâmetros obtidos através de um modelo evolutivo, tais como a taxa de mutação entre sequências de DNA e a sua frequência de pares de bases (Nei e Kumar, 2000). Esta metodologia já foi utilizada em estudos

que visavam a determinação do *status* taxonômico de insetos vetores, como no caso do complexo de *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Lehr, 2005). Outros estudos também se valeram das topologias de máxima verossimilhança na tentativa de elucidar o caráter ambíguo das espécies crípticas (Wilkerson *et al.*, 2005; Passamonti *et al.*, 2004).

Em *Lutzomyia*, a ML tem sido pouco empregada no que se refere a elucidações dos complexos de espécies. O primeiro trabalho utilizou o marcador per contendo 266pb e concluiu que este mesmo marcador não se mostrou eficiente para a filogenia do complexo *L. longipalpis* (Golczer e Arrivillaga, 2010). Por outro lado, um estudo recente utilizou 525pb do mesmo marcador e demonstra a monofilia de duas espécies do complexo *L. longipalpis*, evidenciando a condição derivada do fenótipo 2S (Costa-Júnior *et al.*, 20015). A ML também foi empregada em populações alopátricas de *L. umbratilis* evidenciando a existência de um complexo de espécies em *L. umbratilis* (Freitas *et al.*, 2015).

Os algoritmos de agrupamento de dados genéticos tornaram-se uma ferramenta importante em campos da biologia, incluindo a conservação e a genética populacional (Dawson e Belkhir, 2001; Corander e Marttinen, 2003; Purcell e Sham 2004; 2006; Francois *et al.*, 2006; Patterson *et al.*, 2006). Estes métodos são muitas vezes utilizados para compreender a estrutura das populações, bem como para identificar indivíduos migrantes ou híbridos, como também são usados para detectar a estrutura populacional críptica (Hubisz *et al.*, 2009).

O STRUCTURE é um algoritmo bayesiano fundamentado em um modelo amplamente utilizado para o agrupamento de dados genéticos (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003; Falush *et al.*, 2007). Dado o número de clusters (K), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a articulação do equilíbrio dentro de

grupos, este algoritmo estima as frequências dos alelos em cada grupo e as associações das populações para cada indivíduo. O STRUCTURE utiliza o método Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) para integrar um conjunto de parâmetros e fazer atribuições de agrupamento. Embora o valor de K tenha que ser fornecido para o algoritmo, um método heurístico de seleção K é frequentemente utilizado, baseando-se na comparação de probabilidades (Hubisz *et al.*, 2009).

O STRUCTURE é largamente utilizado com o objetivo de esclarecer a problemática taxonômica em espécies crípticas. Boyd (2007) aplicou esta metodologia com o intuito de determinar a composição dos membros do complexo de *Anopheles annulipes* em populações de Townsville, Nordeste da Austrália, revelando a existência de quatro grupos populacionais vivendo em simpatria; outro exemplo consistiu no emprego do Δk (ad hoc) na estruturação do complexo *Culex pipiens*, que apontou a existência de três grupos definidos (Fonseca *et al.*, 2004). Este algoritmo foi empregado para avaliar a estruturação genética das populações do complexo *L. longipalpis* da região Centro-Oeste, em que foi realizado um estudo com oito marcadores microsatélites e o algoritmo agrupou as populações como uma única população genética incluindo *L. cruzi* dentro do complexo (Santos *et al.*, 2013).

O Algoritmo também foi empregado em populações simpátricas do complexo *L. longipalpis* do Nordeste brasileiro e foi observado que as duas populações genéticas presentes em cada localidade eram corretas aos dois fenótipos distintos encontrados em machos de *L. longipalpis* (Costa-Júnior *et al.*, 2015). Já em *L. umbratilis* a análise de agrupamento genético das três localidades estudadas evidenciou a presença de apenas duas populações genéticas sendo que uma delas era composta por populações de Pernambuco e Amazônia (região Nordeste e Norte do Brasil) e a outra localidade separada pelo rio Amazonas (Freitas *et al.*, 2015).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) é um método para estimar a diferenciação populacional a partir de dados moleculares e teste de hipóteses sobre a mesma diferenciação (Excoffier *et al.*, 1992). Tradicionalmente, metodologias como AMOVA e índice de fixação (*F_{st}*) pareados têm se mostrado eficientes no estudo da diversidade entre populações a partir de dados moleculares (Holsinger e Weir, 2009). Através destes testes foi sugerida a hipótese de introgressão entre *L. intermedia* e *L. whitmani* (Mazzoni *et al.*, 2006). No complexo *L. longipalpis* a AMOVA sugeriu que as variações genéticas encontradas no fragmento do gene *per* de 266pb estavam relacionadas com os tipos de sons copulatórios (Araki *et al.*, 2009), entretanto, a AMOVA realizada com o fragmento de 525pb do mesmo marcador revelou pela primeira vez, que as variações genéticas também estavam relacionadas aos fenótipos 1S e 2S (Costa-Júnior *et al.*, 2015).

Os valores de *F_{st}* obtidos em diversos trabalhos para as populações de *L. longipalpis* *sl* no Brasil revelaram grandes variações genéticas entre as populações simpátricas e alopátricas evidenciando a presença de um complexo de espécie para o grupo (Bauzer *et al.*, 2002b; Maingon *et al.*, 2003; Araki *et al.*, 2009; Costa-Júnior *et al.*, 2015). Por sua vez, análises de *F_{st}* foram também utilizadas para comparação entre *L. cruzi* e *L. longipalpis* com o intuito de observar o grau de diferenciação entre essas espécies, entretanto, os valores de *F_{st}* observados eram compatíveis como sendo uma única espécie, sugerindo a inclusão de *L. cruzi* ao complexo *L. longipalpis* (Vigoder *et al.*, 2010 e Santos *et al.*, 2013).

2.6 Gene *period*

O gene *per* em *Drosophila* controla uma série de ritmos biológicos (Hall, 2003), sendo que o mais proeminente e mais bem estudado é o ciclo circadiano do comportamento que condiciona o organismo para as diferentes mudanças

fisiológicas, mediante a modulação de reações enzimáticas específicas (Shirasu *et al.*, 2003). Este gene, inicialmente descrito por Konopka e Benzer (1971), teve a sua expressão detectada na maioria dos tecidos e em todos os estágios do desenvolvimento em *D. melanogaster* (Liu *et al.*, 1988).

Per codifica uma proteína autorreguladora do seu próprio gene, além de regular o gene *timeless* (*tim*), estando ambas associadas ao ciclo de *feedback* negativo (Figura 8), que é central para a determinação da ritmicidade circadiana (Hall, 2003). A proteína *per* contém aproximadamente 1200 aminoácidos (Citri *et al.*, 1987), apresentando duas regiões de grande importância: o domínio PAS, que corresponde ao domínio de dimerização localizado em uma região conservada (Hoffman *et al.*, 1991 e Colot *et al.*, 1988) e uma região não conservada, que apresenta repetições dos aminoácidos treonina e glicina, conhecida como região Thr-Gly (Colot *et al.*, 1988).

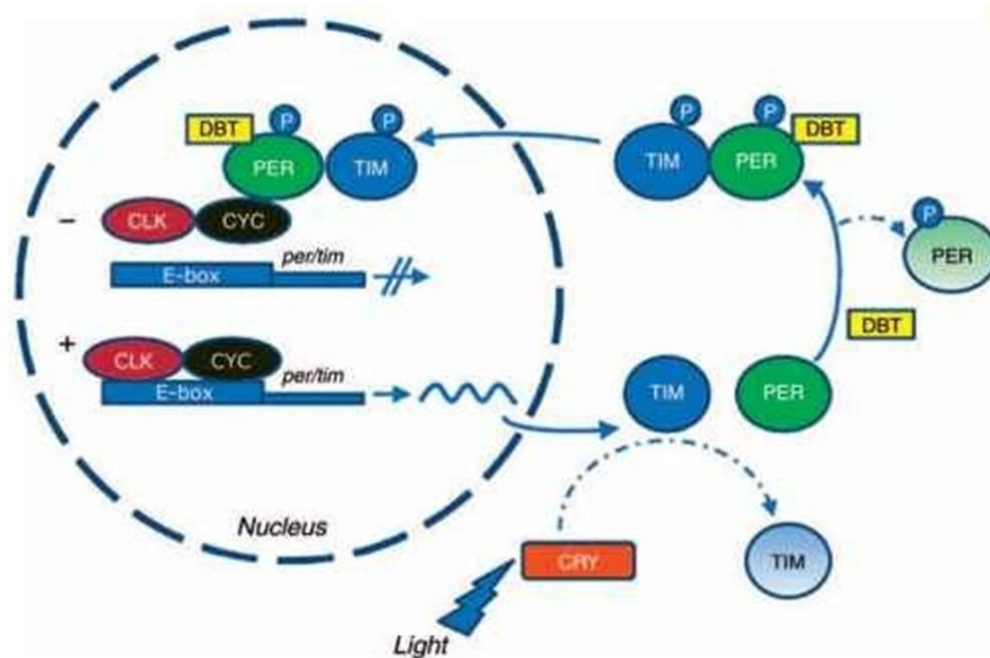


Figura 8: Regulação do gene *period*.

Fonte: (http://lh5.ggpht.com/_X6JnoLOU4BY/S8Fi9WvektI/AAAAAAAAAXpl/Wb1J9uKwiF0/s1600-h/tmp204_thumb3.jpg) editada. Acesso em 25/10/2015

A repetição Thr-Gly forneceu um sistema modelo útil para estudar as propriedades de mutação do minissatélite subjacente a esta região e, como geralmente observado em regiões repetitivas, é altamente polimórfica em termos tanto de variação nucleotídica quanto do tamanho da sequência (Costa *et al.*, 1991). Acredita-se que esta repetição de aminoácidos esteja envolvida na termoestabilidade do fenótipo circadiano, uma vez que mutantes em que *per* foi retirado, se tornaram arrítmicos e sensíveis à variação de temperatura (Peixoto *et al.*, 1993).

As taxas de mutação e comprimento da repetição de *per* em *D. melanogaster* foram estimadas experimentalmente e, como esperado, foram várias ordens de grandeza maior do que a taxa de substituição de nucleotídeos da maioria dos genes nucleares (Rosato *et al.*, 1996, 1997). Observa-se também uma enorme variação interespecífica na extensão desta sequência entre diferentes espécies de dípteros. Nos drosofilídeos, por exemplo, existe uma expansão que ocorreu com *D. pseudoobscura*, que consiste de um motivo repetitivo modificado em pentapeptídeo que tem mais de 30 cópias em comparação a *D. virilis* (Peixoto *et al.*, 1992, 1993; Nielsen *et al.*, 1994). Em *D. melanogaster*, essas repetições possuem tamanho intermediário e codificam entre 14 e 24 pares de dipeptídeos Thr-Gly ininterruptos (Sawyer *et al.*, 1997).

Estudos funcionais da região Thr-Gly revelaram que a repetição e o seu entorno codificam padrões específicos do comportamento rítmico e em alguns elementos do padrão circadiano de atividade locomotora, bem como no ciclo de música de corte do macho entre as espécies *D. melanogaster* e *D. simulans* (Wheeler *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 2004). A compensação de temperatura relacionada ao ciclo circadiano (Sawyer *et al.*, 1997), ou seja, a forma como o

período de 24 horas é protegida contra mudanças de temperatura, é diferente entre as variantes Thr-Gly.

Em 1997, Sun e colaboradores isolaram o gene *rigui* em roedores, que apresentou cerca de 40% de similaridade ao *per* de *D. melanogaster*, sendo este o primeiro registro deste homólogo em mamíferos. Estudos posteriores revelaram a existência de uma família de genes *period* em vertebrados, constituída por mais dois genes parálogos e um pseudogene (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997; Takumi *et al.*, 1998a; Takumi *et al.*, 1998b; Zylka *et al.*, 1998; Clayton *et al.*, 2001; Gotter e Reppert 2001). Desde a identificação da família de genes *period* em cordados, várias hipóteses foram deflagradas a respeito da genealogia deste gene nos vertebrados. A mais recente admite que a ocorrência de duas duplicações genômicas que dirigiram a emergência dos primeiros vertebrados dos agnatas (Schantz *et al.*, 2005).

Trabalhos de filogenia envolvendo *per* em vários níveis taxonômicos (populações, espécies, gêneros, subgêneros e famílias) foram realizados e atestaram a sua eficiência como marcador para estudos evolutivos (Nielsen *et al.*, 1994; Regeir *et al.*, 1998; Gotter *et al.*, 1999; Barr *et al.*, 2005). Entretanto, Zheng e colaboradores (1999) questionaram a utilidade deste marcador em *D. nasuta* utilizando algoritmos baseados em distância genética, sugerindo cautela na escolha dos algoritmos que serão empregados nos trabalhos com *per*.

Para o gênero *Lutzomyia*, este marcador tem sido amplamente utilizado desde a sua identificação (Peixoto *et al.*, 1992). Porém, nos trabalhos em que são apresentadas inferências evolutivas baseadas no marcador *per*, métodos de distância foram utilizados para reconstrução filogenética. Estes trabalhos abordaram

processos evolutivos como introgressão gênica e especiação críptica (Mazzoni *et al.*, 2006; Bauzer *et al.*, 2002a, 2002b; Araki *et al.*, 2009).

Nos trabalhos envolvendo genética de populações e filogenia de *L. longipalpis* baseados em *per*, apenas uma região com 266 pares de bases deste marcador foi utilizada. Este fragmento, que inclui um íntron de 54 pares de bases, localiza-se entre o domínio PAS e a região Thr-Gly, englobando quase que completamente o domínio de localização citoplasmática (CLD) do gene *period* (Bauzer *et al.*, 2002a). Em uma análise multilocus envolvendo 21 marcadores empregados para populações simpátricas e alopátricas do complexo *L. longipalpis* foi observado que apenas quatro marcadores (*sec22*, *paralitic*, *up* e *per*) se mostraram eficientes para separar as espécies do complexo (Araki *et al.*, 2013).

3. Objetivo Geral

A delimitação do status taxonômico de insetos vetores é de grande importância na epidemiologia de diversas patologias. Para o Brasil os membros do complexo *Lutzomyia longipalpis* ainda não foram descritos apesar de vários estudos descreverem populações com características exclusivas. O presente trabalho objetiva fornecer maiores conhecimentos acerca da estrutura genética de populações simpátricas de *L. longipalpis* utilizando o marcador molecular *period* em três localidades do Nordeste do Brasil.

3.1 Objetivos Específicos

1. Compreender a distribuição dos fenótipos 1S e 2S em três localidades do Nordeste brasileiro.
2. Analisar a estrutura genética das três localidades (Caririaçu, Sobral-CE e Bodocó-PE) para cada fenótipo.
3. Reconhecer o impacto das manchas tergitais presente nos machos como um identificador taxonômico para populações simpátricas de *L. longipalpis*.
4. Compreender o papel da chapada do Araripe como barreira geográfica.
5. Propor uma relação filogenética entre os fenótipos 1S e 2S de *L. longipalpis*.

4. Artigo

Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene *period* among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil

César Raimundo Lima Costa Júnior¹
Email: cjrs@ig.com.br

Moises Thiago de Souza Freitas¹
Email: moisestsf@hotmail.com

Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior¹
Email: cjsantifigo@hotmail.com

Nádia Consuelo Aragão¹
Email: nadibr2@yahoo.com.br

Lidiane Gomes da Silva¹
Email: lidianegomesp@hotmail.com

Carlos Brisola Marcondes²
Email: cbrisolamarcondes@gmail.com

Raimundo Vieira Dias³
Email: netovet1@hotmail.com

Teresa Cristina Leal Balbino⁴
Email: cristina@cpqam.fiocruz.br

Manuela Barbosa Rodrigues Souza¹
Email: manubrsouza@gmail.com

Marcelo Ramalho Ortigão⁵
Email: mortigao@k-state.edu

*Valdir de Queiroz Balbino¹
Email: vgbalbino@gmail.com

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina; Brasil

³Centro de Controle de Zoonoses, Rua Finlândia S/N, Parque Silvana II, 62010-970, Sobral, Ceará, Brazil;

⁴Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitaria, 50732-970, Recife, Pernambuco, Brasil;

⁵Department of Entomology, Kansas State University, W. Waters Hall 123, 66506-400, Manhattan, Kansas, United States of America.

*Corresponding author. Departamento de Genetica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitaria, 50732-970, Recife, Pernambuco, Brasil;

RESEARCH

Open Access

Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene *period* among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil

César Raimundo Lima Costa Jr¹, Moises Thiago de Souza Freitas¹, Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Jr¹, Nádia Consuelo Aragão¹, Lidiane Gomes da Silva¹, Carlos Brisola Marcondes², Raimundo Vieira Dias³, Tereza Cristina Leal-Balbino⁴, Manuela Barbosa Rodrigues Souza¹, Marcelo Ramalho-Ortigão⁵ and Valdir de Queiroz Balbino^{1*}

Abstract

Background: Even one hundred years after being originally identified, aspects of the taxonomy of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, the principal vector of *Leishmania infantum* in the Americas, remain unresolved for Brazilian populations of this vector. The diversity of morphological, behavioral, biochemical, and ethological characters, as well as the genetic variability detected by molecular markers are indicative of the presence of a complex of species.

Methods: In this study, a 525 bp fragment of the *period* gene was used to evaluate sympatric populations of *L. longipalpis*. A combination of probabilistic methods such as maximum likelihood and genetic assignment approach to investigate sympatric species of *L. longipalpis* were applied in three populations of Northeast Brazil.

Results: Fixed polymorphisms in geographically isolated populations of *L. longipalpis* from two localities in the state of Ceará and one in the state of Pernambuco, Brazil, was identified in a 525 bp fragment of the gene *period* (*per*). Our results suggest a direct relationship between the number of spots found in males' tergites and the genetic variation in cryptic species of *L. longipalpis*. The fragment used in this study revealed the nature of the ancestral morphotype 1S.

Conclusion: New polymorphisms were identified in the gene *per* which can be used as a genetic barcode to sympatric taxonomy of *L. longipalpis*. The *per* gene fragment confirmed the presence of two sibling species of *L. longipalpis* in Sobral and showed that these same species are present in two other localities, representing an expansion within the *L. longipalpis* species complex with regards to the states of Ceará and Pernambuco.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis* complex, *Period* gene, Fixed polymorphism

Background

A species complex is generally defined as a group of morphologically similar species that differ with regards to genetic and ethological aspects [1]. Low flight range and geographic isolation between populations are major drivers of allopatric speciation, contributing to constitution of cryptic species in Phlebotomine sand flies [2-4]. The occurrence of cryptic species is a fairly common

event in other disease vectors and have been described in *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens*, *Triatoma dimidiata* and phlebotomines [5-8].

Lutzomyia longipalpis, the principal vector of *Leishmania infantum*, the etiologic agent of American visceral leishmaniasis, has a discontinued distribution throughout the Neotropical region with different populations displaying aspects compatible with those of a species complex [9,10]. The existence of cryptic species in the *Lutzomyia longipalpis* complex was supported by studies using morphological and molecular markers in populations from Central and South America leading to the identification of *L. pseudolongipalpis* [11], formally recognized

* Correspondence: vqbalbino@gmail.com

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia S/N, Cidade Universitária, 50.740-600 Recife, Pernambuco, Brazil

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



© 2015 Lima Costa et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. 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.

as the first taxon of the *L. longipalpis* complex (reviewed by [12]). Later, it was also suggested that *L. cruzi* should be regarded as a cryptic species within the *L. longipalpis* complex [13].

In Brazil, the presence of a *Lutzomyia longipalpis* complex was first proposed by Mangabeira [14] and was based on the number of abdominal pale spots, one (1S) or two (2S), visible on abdominal tergites. Analyses of male sexual pheromones and courtship (mating) sounds, as well as microsatellite markers and speciation genes, have provided further evidence of a *L. longipalpis* species complex [10].

The gene *period* (*per*) controls biological rhythms and plays a central role in eclosion and insect locomotion activity [15,16]. *Per* has been used in studies of fruit flies (*Drosophilidae*) population genetics and has been shown to be a useful marker, especially when it comes to identifying cryptic species [17,18]. In sand flies, *per* has also been utilized in studies of population genetics to identify possible members of the *L. longipalpis* complex in Brazil. Combined with certain behavioral markers (e.g. male mating songs and the types of sexual pheromones produced), analysis of the variability of *per* suggested the existence of two major population groups of *L. longipalpis* in Brazil. One group, with at least five species, is found in most localities where *L. longipalpis* has been reported. This group displays a single spot (1S) on the abdominal tergites, but different pheromones and patterns of pulsating songs. The second group, with two spots (2S), is represented by a single species present in the North, Northeast and Southeast regions of Brazil. Males in this group produce Burst-type songs and the pheromone cembrene-1 [19].

The NE region in Brazil is the region with the highest index of visceral leishmaniasis [20], and studies demonstrated the presence of at least two sister species within *L. longipalpis* complex [19,21,22]. In Sobral, State of Ceará, these species occur in sympatry and can be separated based either on their abdominal spots 1S or 2S, the different mating songs, the types of pheromones, or the genetic composition of males [23]. Hence, genetic markers related to the abdominal spots may indeed be an important tool for molecular taxonomy of the *L. longipalpis* complex, especially concerning eco-epidemiological studies to assess potential vectorial capacity between distinct populations.

Here, we investigated the presence of polymorphisms in the gene *per* and their relatedness to the number of abdominal spots in *L. longipalpis* males. Sand flies from three localities in the NE of Brazil, separated by distances ranging from 108 km to as much as 457 km from each other, were used for our analyses. Four novel fixed single nucleotide polymorphisms (SNP) were identified, some able to separate between the 1S and 2S flies. In addition,

our results point to an ancestral origin of the morphotype 1S. This study contributes to the understanding of the natural history of *L. longipalpis* populations and provides new insights about the biogeography of this sand fly.

Methods

Field collection and identification of phlebotomine sand flies

Sand fly trappings were carried out in Sobral (3°41'15"S; 40°21'5"W) and Caririçu (07°02'31"S; 39°17'02"W) in the State of Ceará, and in Bodocó (07°46'42"S, 39°56'28"W) in the State of Pernambuco, Brazil. All locations included in this study have a BSw'h climate in accordance to the Köppen climate classification [24], with temperatures ranging from 23°C to 36°C and low annual rainfall (936 mm to 1100 mm). The localities included in this study are fully inserted in Caatinga biome, with vegetation composed mainly of ligneous and herbaceous species with high degree of xerophily [25].

Sand flies were trapped in the surrounding houses and domestic animal shelters using five CDC-type miniature light traps positioned at approximately 0.6 m from the ground. Sand flies were identified according to Young and Duncan [26], and *L. longipalpis* males were separated based on the number of abdominal spots into 1S and 2S.

DNA extraction, PCR and sequencing

Genomic DNA was extracted from each specimen using 100 µl of Chelex® resin (Bio-Rad, Hercules, CA) based on the protocol described by Solano et al. [27] with modifications. Briefly, each sand fly was homogenized using a hand held homogenizer and pestle in 10% Chelex solution followed by incubation at 56°C for an hour. Sample lysates were incubated at 95°C for 30 min, centrifuged for 6 min at 13,000 × g, and each supernatant was removed and stored at -4°C.

For each DNA sample isolated, a segment of 525 bp of *per* [28] was amplified by PCR using the Master Mix kit (Promega, Fitchburg, WI). PCRs were carried out using a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Ramsey, MN) as follows: 5 min at 95°C, and 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. A 5 µl aliquot from each PCR product was separated on 0.5% agarose and the remainder was purified using the Genomic DNA Purification Wizard kit (Promega, Fitchburg).

Bi-directional sequencing reactions were performed on each purified PCR product using the BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed using an ABI3100 Sequence Analyzer (Applied Biosystems, Foster City). Each sample was sequenced in duplicate and the sequences obtained were

Table 1 Neutrality tests and intra-population genetic diversity measures for each sample

Samples	Tajima's <i>D</i>	N	Hd	$\pi \pm SE$	NS	h	k
Bodocó 1S	-1.00443	30	0.959	0.00684 $\pm$ 0.00094	20	20	3.593
Bodocó 2S	-0.48148	24	0.986	0.00885 $\pm$ 0.00089	20	21	4.649
Caririáçu 1S	-0.30235	28	0.997	0.01392 $\pm$ 0.00108	31	27	7.310
Caririáçu 2S	0.37792	31	0.994	0.01058 $\pm$ 0.00056	20	28	5.553
Sobral 1S	0.17037	35	1.000	0.01648 $\pm$ 0.00108	34	35	8.652
Sobral 2S	0.46447	23	0.996	0.01162 $\pm$ 0.00089	20	22	6.103
Total	-0.05022	171	0.997	0.01901 $\pm$ 0.01901	55	149	9.980

Tajima's *D*; Tajima test of neutrality; N: sample size; Hd: Haplotype diversity; $\pi \pm SE$: nucleotide diversity and standard errors (SE); NS, Number of polymorphic sites; h, Haplotypes; K, average number of nucleotide differences. *p,0.05.

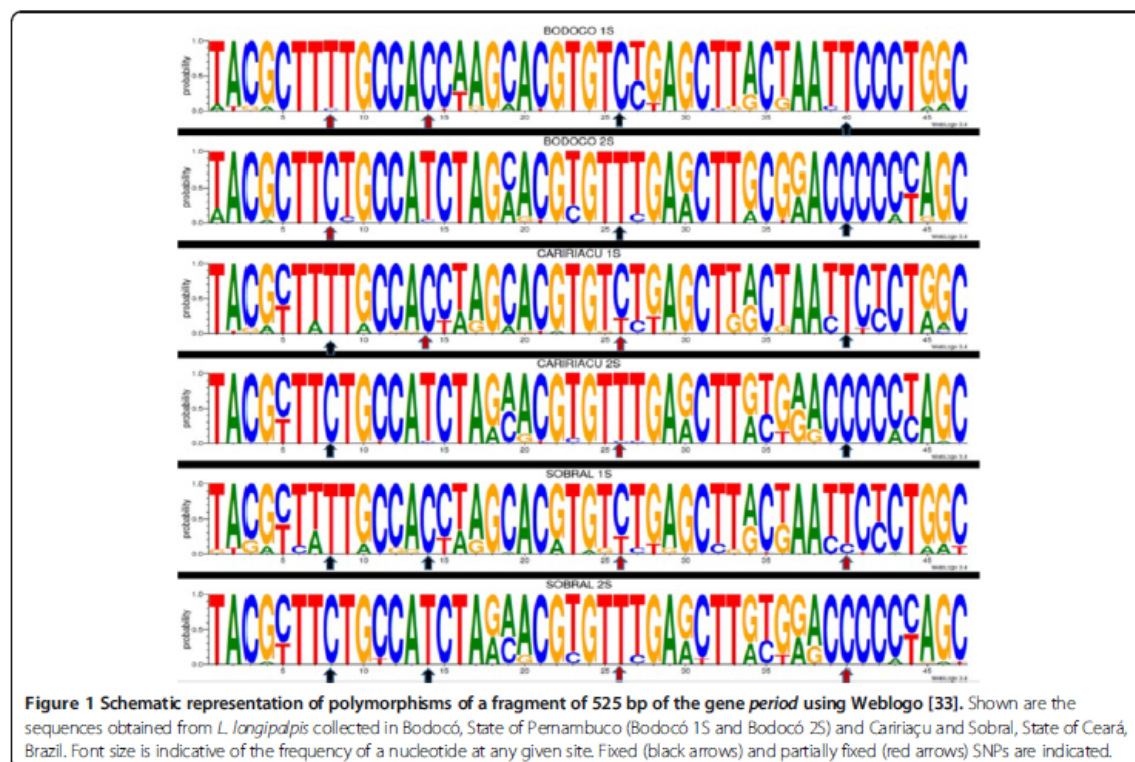
assembled and analyzed with the Staden package [29] based on the values of *Phred* 40 [30]. The high-quality sequences obtained were deposited in GenBank (accession numbers KF479047-KF479163 and KP013849-KP013902).

Population genetics

Sequence alignment was performed using the program ClustalW (MEGA v.5.1), and the conserved and variable sites (parsimony informative and singletons sites) also were verified using MEGA v.5.1 [31]. The analyses of polymorphisms and the neutrality tests were performed using DnaSP 5.10.1 [32]. For optimal viewing of polymorphisms, parsimony-informative sites

were exported to compose sequence logos obtained by Weblogo v. 3.2 [33].

The genetic structuring of the *L. longipalpis* populations was verified using sequences alignment throughout STRUCTURE v.2.3 [34], with model-based approach. This algorithm clusters individuals into populations. The assigned proportion of each individual belonging to each population (membership coefficient *Q*) was estimated using Bayesian statistics and Markov Chain Monte Carlo simulations (MCMC). MCMC simulations were performed with 100,000 interactions of burn-in period and followed by one million steps. For each value of *K* (1 to 10), 10 interactions were performed



in order to estimate the K values, and the most likely population (or cluster) number was determined by the ΔK analysis [35]. Matched Fst and MN values [36] were obtained through the Arlequin v.3.1 software

[37], using 1000 random permutations. Population structure was verified by the utilization of AMOVA [37], based on the evaluation of different hierarchical groups.

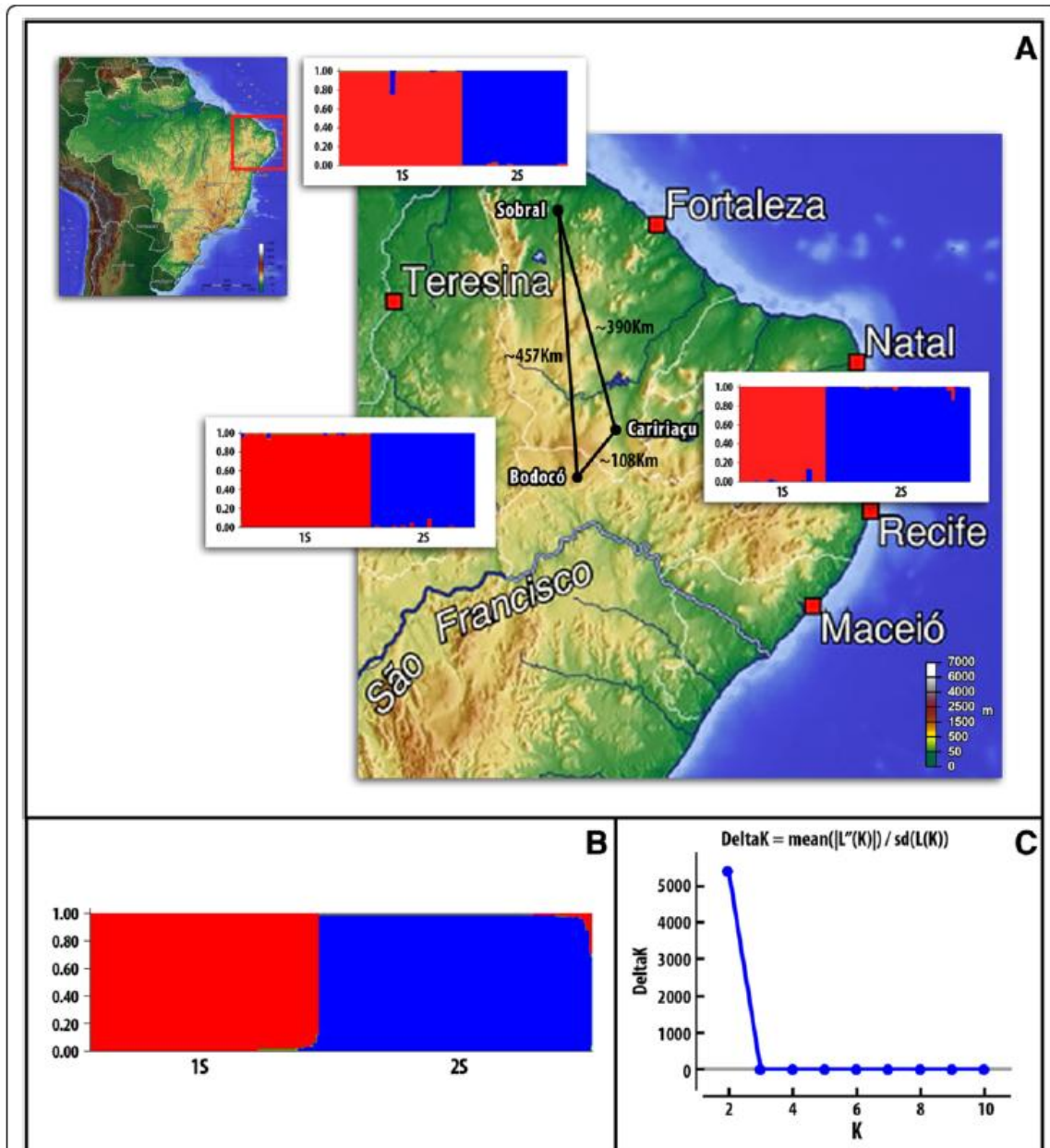


Figure 2 Elevation map and genetic assignment analysis. **A:** Relief map of Brazil (inset) and the distance between localities of Bodocó, Caririagu and Sobral, which exhibits a very rugged topography ranging from 63 m to 900 m of altitude. The bar plots generated by the software STRUCTURE inferred the genetic structure of populations of *L. longipalpis* from each places studied. **B:** Genetic assignment from all localities, specimens 1S phenotype were assigned to the red group, and 2S specimens were assigned to the blue group. **C:** Delta K method [35] indicating the presence of two genetic populations.

Phylogenetic analysis

For the UPGMA tree, the F_{st} values were imported into MEGA V. 5.1 software. The jModeltest v.0.1.1 software was used to select the best-fit DNA substitution model for ML analysis based on the Akaike information criterion (AIC) algorithm [38]. The best-fit model for the *per* sequence analyzed was the $TVM + I + G$. The maximum likelihood (ML) tree for *per* sequences was calculated using PhyML v. 3.0 [39].

Results

Following identification and sequencing of the sand flies collected, we obtained a total of 171 sequences of the gene *per* from *L. longipalpis* males, being 58 (35 1S and 23 2S) from Sobral, 59 (28 1S and 31 2S) from Caririáçu, and 54 (30 1S and 24 2S) from Bodocó. Tests such as Tajima's neutrality, haplotype diversity, nucleotide diversity, and average number of nucleotide differences for each population studied are summarized in Table 1. Analysis of the parsimony informational sites identified four fixed single nucleotide polymorphisms (SNP) within the 525 bp fragment of *per* used in our analyses. All SNPs can be utilized to separate phenotypes. The SNP identified on nucleotide position T124C (the first and second nucleotides occur in 1S and 2S phenotypes, respectively) located within exon 1, is fixed in *L. longipalpis* from both localities in Ceará. The SNP identified in position C424T (within exon 2) is fixed in the *L. longipalpis* from Bodocó and Caririáçu. The SNP at position C171T also separates the two phenotypic forms (1S and 2S) and is fixed in *L. longipalpis* from Sobral only. In contrast, the SNP at position T256C, which also separates 1S from 2S, is present in the *L. longipalpis* from Bodocó only (Figure 1).

In the genetic assignment analyses of *L. longipalpis*, with each population assessed separately, two distinct genetic groups associated with abdominal spots were observed and each sequence possessing a probability (Q) greater than 80% to belong to each genetic group (Figure 2A). When sequences from all three places were combined, the genetic assignment test indicated the presence of two genetic groups associated with 1S and 2S morphotypes, as suggested by the peak of Δk indicating the presence of two genetically distinct populations (Figure 2B and 2C, respectively).

Similarly, when F_{st} was used to verify the genetic structuring in the three localities (Bodocó, Caririáçu and Sobral), the presence of two morphotypes related to 1S and 2S were again observed. The *L. longipalpis* 1S populations of Bodocó, Caririáçu and Sobral display low F_{st} values when compared to each other, forming a genetically similar group (Group 1S). A similar pattern was observed when comparing the 2S populations amongst themselves. However, the F_{st} value were the

highest when comparing different phenotypes, even from the same location (Table 2). The tree of distances obtained from F_{st} values exhibited a phylogeographic profile with Bodocó population more distant from Ceará populations, when comparing pairs of phenotypes (Figure 3). Utilizing these groups, AMOVA showed significantly the highest percentage of variation between 1S and 2S groups (Table 3).

The maximum likelihood tree showed a geographical separation between taxons. Although, the phenotypic groups were separated, indicating an ancestral nature of the 1S clade, supported by the monophyly nature of the 2S group with 55% bootstrap value (Figure 4).

Discussion

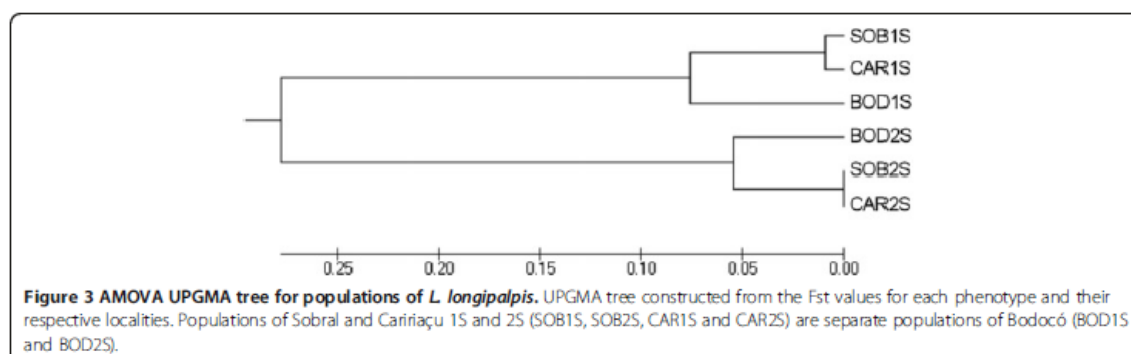
The composition of the *L. longipalpis* complex is still a rather controversial topic even though the distribution of this sand fly in Brazil strongly suggests the presence of at least five species as part of this complex [10,19].

Our assessment of polymorphism frequency in the *per* gene in different populations of *L. longipalpis* revealed for the first time the presence of two fixed polymorphisms (124 and 424) that can reliably be used to separate 1S and 2S phenotypes. The SNP at position T124C was previously reported in *L. longipalpis* populations collected in the town of Jaíba, Minas Gerais, located 1,347 km from Sobral and 1,040 km from Caririáçu [19]. The SNP at position C424T was identified

Table 2 Genetic differentiation among samples

Populations	F_{st}	Nm	Dxy	Da	Ss	Sf
Sobral 1S Caririáçu 1S	0.01892	2.86330	0.01549	0.00029	26	0
Sobral 1S Sobral 2S	0.50016	2.73255	0.02787	0.01382	11	2
Sobral 1S Caririáçu 2S	0.48584	0.25225	0.02611	0.01258	9	1
Caririáçu 1S Sobral 2S	0.53515	0.27071	0.02723	0.01445	9	3
Caririáçu 1S Caririáçu 2S	0.52220	0.28603	0.02542	0.01317	9	2
Sobral 2S Caririáçu 2S	0.00000	27.22473	0.01097	0.00000	16	0
Bodocó 1S Sobral 1S	0.15423	0.51128	0.01379	0.00213	16	0
Bodocó 1S Caririáçu 1S	0.15249	0.52877	0.01225	0.00187	16	0
Bodocó 1S Bodocó 2S	0.66122	0.54558	0.02317	0.01532	8	2
Bodocó 1S Sobral 2S	0.64012	0.41809	0.02566	0.01642	7	3
Bodocó 1S Caririáçu 2S	0.63698	0.44627	0.02399	0.01528	6	1
Bodocó 2S Sobral 1S	0.50950	0.46142	0.02583	0.01316	7	1
Bodocó 2S Caririáçu 1S	0.54926	4.08197	0.02527	0.01388	8	2
Bodocó 2S Sobral 2S	0.10863	4.21053	0.01149	0.00125	12	0
Bodocó 2S Caririáçu 2S	0.10793	inf	0.01089	0.00118	12	0

F_{st} : pair-wise genetic differentiation; Nm: number of migrants per generation; 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 population; Sf: number of fixed differences between pairs of populations.



in *L. longipalpis* populations from Bodocó and Caririçu. Two additional SNPs, at positions C171T and T256C can be used as coadjuncts to separate between the 1S and 2S *L. longipalpis* morphotypes from Sobral and Bodocó, respectively. Although all polymorphisms are synonymous, the combined SNPs can be used as markers for cryptic species in *L. longipalpis*.

The importance of the ML method for the detection of recent speciation events also was previously shown [40–42]. The Bayesian and ML approaches for *L. longipalpis* collected in Bodocó, Caririçu and Sobral indicate the presence of two genetically separated populations, and that each collected sample belongs to either 1S or 2S morphotype. Our analyses also indicated that these two genetically distinct populations are related to abdominal spots, as previously suggested for sympatric populations of *L. longipalpis* [21–23].

Analysis the 525 bp fragment of *per* in sand flies from Sobral showed greater separation between the two morphotypes, even when genetic distance methodology was used (Additional file 1: Figure S1). A Neighbor-joining tree added to the population genetic structure analyses confirmed the presence of cryptic species occurring in sympatry in Sobral, as noted by Bauzer et al. [23]. In that case, the presence of a haplotype shared by distinct

morphotypes was observed. In contrast, our analyses using a greater number of polymorphisms revealed patterns of total association between phenotypes and genotypes [22,43].

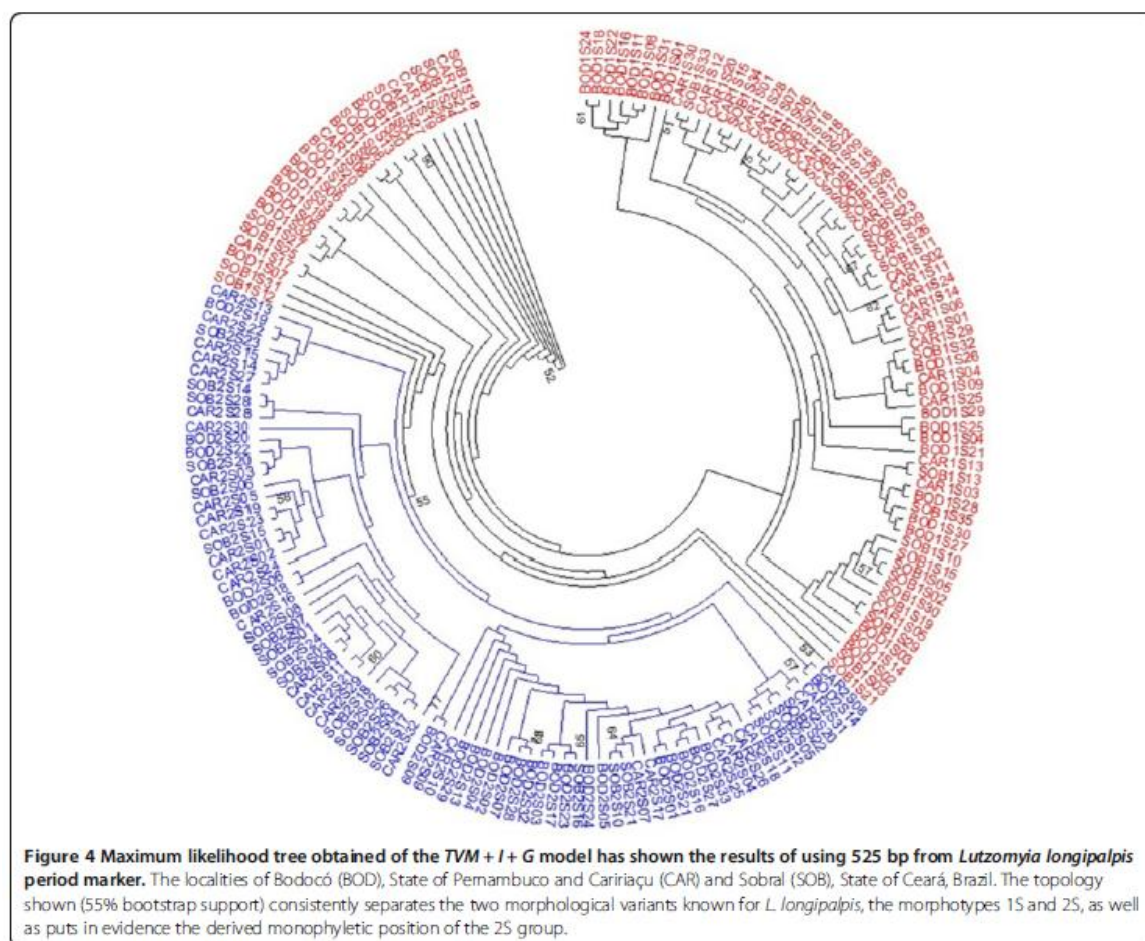
As the number of shared haplotypes observed was lower in the 525 bp fragment of *per* in comparison to the 266 bp fragment (15 shared haplotypes versus 26, Additional file 2: Table S1), it was suggestive of the ability of the 525 bp *per* to detect greater genetic variation in *L. longipalpis* populations. Analyses by AMOVA of the results obtained with the 525 bp fragment confirmed a greater variation between phenotypically distinct groups characterized by the association of a pattern of abdominal spots and the genetic marker not previously reported for *L. longipalpis* populations.

In Sobral, *L. longipalpis* is described as distinct populations of two sympatric species, and commonly separated by the 1S and 2S phenotypes. Genetic markers, copulatory sounds, and sex pheromones have been characterized for each of the *L. longipalpis* populations found in Sobral and have been used to confirm the separation conferred by the 1S/2S phenotypes [19,23,44,45]. Conversely, *L. longipalpis* collected in the localities of Bodocó and Caririçu are, according to our data, two genetically distinct populations, and the results observed, match the pattern of abdominal spots described in the sympatric populations [22,23,43]. Thus, as *L. longipalpis* from Bodocó and Caririçu exhibit the same phenotypic and genetic patterns of populations found in Sobral, it is likely that these two populations also share chemical and behavioral characteristics similar to what was previously described for the *L. longipalpis* found in Sobral.

Our group previously reported on a secondary contact between *L. longipalpis* populations that were separated by the original course of the São Francisco River [46]. This secondary contact between the 1S populations of the Brazilian SE and NE may have promoted the genetic diversity of 1S. It also further reinforced the hypothesis that 2S actually derives from 1S, in accordance to the maximum likelihood tree.

Table 3 AMOVA results for *L. longipalpis* populations

Source of variation	d.f.	Percentage of variation
Among groups	1	50.69
Among populations within groups	4	4.28
Within populations	165	45.04
Total	170	
F_{SC} (haplotypes/populations within groups)		0.08672
F_{ST} (haplotypes/populations/groups)		0.54963
F_{CT} (populations/groups)		0.50687
Phenotype Groups: 1S (Bodocó 1S, Caririçu 1S and Sobral 1S), and 2S (Bodocó 2S, Caririçu 2S and Sobral 2S).		



Conclusion

Understanding the complex population genetics of *L. longipalpis* and its pattern of distribution is critical in areas with high endemicity for the transmission of visceral leishmaniasis, such as the current situation in the state of Ceará in Brazil. The genetic analyses using the 525 bp fragment of the *per* gene revealed for the first time a moderate geographical structuring between the *L. longipalpis* populations, and a significant variability with regards to the 1S and 2S phenotypes. The results presented here also underscore the importance of the abdominal spots for the diagnosis of cryptic species of sympatric populations of the *L. longipalpis* complex in Brazil, and the use of *per* as an important barcode marker to populations of *L. longipalpis*. Further confirmation of the fixed SNPs identified in *per* and its application as taxonomic markers to differentiate sympatric *L. longipalpis* populations across Brazil is warranted.

Ethical approval

Ethical approval was not required for the current study.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Neighbor-joining phylogenetic tree of the *L. longipalpis*. Tree was constructed using the 525 bp fragment of the gene *period* obtained by PCR amplification of DNA extracted from *L. longipalpis* collected in Sobral, State of Ceará, Brazil. The tree shows the two phenotypic forms (1S and 2S) with bootstrap value of 67%. The parameters used for the reconstruction of the cladogram were the same as in Bauzer et al. [23].

Additional file 2: Table S1. Haplotypes frequency. Frequency of haplotypes generated with the fragment of 266 and 525 base pairs.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VQB and CRLCJ designed and supervised the study; MTSF, CASFJ, NCA, LGS, RVD, TCLB performed the bioinformatics and molecular analyses; CBM, MBRS,

MRO revised the manuscript; VQB, CRLCJ revised the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (APQ-0651-2.02/10), and Ministério da Saúde, Brazil (TC 300/2013). VQB was supported by CNPq, Grant Number 309124/2012-3. We are also grateful to the Secretaria de Saúde do Município de Sobral for assistance and logistic support.

Author details

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia S/N, Cidade Universitária, 50.740-600 Recife, Pernambuco, Brazil. ²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. ³Centro de Controle de Zoonoses, Rua Finlândia S/N, Parque Silvana II, 62010-970 Sobral, Ceará, Brazil. ⁴Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50740-465 Recife, Pernambuco, Brazil. ⁵Department of Entomology, Kansas State University, W. Waters Hall 123, 66506-400 Manhattan, KS, USA.

Received: 31 October 2014 Accepted: 5 March 2015

Published online: 01 April 2015

References

- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol*. 2007;22:148–55. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Alexander JB. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *J Med Entomol*. 1987;24:552–58.
- Morrison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of american visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49:68–75.
- 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.
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*. 2000;17:1467–82.
- Krzywinski J, Besansky NJ. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annu Rev Entomol*. 2003;48:111–39.
- Adler PH, Cheke RA, Post RJ. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infect Genet Evol*. 2010;10:46–65. doi:10.1016/j.meegid.2010.07.003.
- Monteiro F, Peretichina T, Lazoski C, Harris K, Dotson E. Phylogeographic pattern and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLoS One*. 2013;8:e70974.
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:811–27.
- Bauzer LG, Souza NA, Malignon RDC, Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:1–12.
- Arrivillaga JC, Feliciangeli MD. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *J Med Entomol*. 2001;38:783–90.
- Soares RP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc*. 2003;75:301–30.
- Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LG, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect Gen Evol*. 2010;10:734–39. doi:10.1016/j.meegid.2010.05.004.
- Mangabeira O. Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Rev Bras Malar Doenc Trop*. 1969;21:3–26.
- Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 1990;343(6258):536–40.
- Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999;96(2):271–90. doi:10.1016/S0092-8674(00)80566-8.
- Rosato E, Peixoto AA, Barbujani G, Costa R, Kyriacou CP. Molecular evolution of the period gene in *Drosophila simulans*. *Genetics*. 1994;138:693–707.
- Sawyer LA, Sandrelli F, Pasetto C, Peixoto AA, Rosato E, Costa R, et al. The period gene Thr-Gly polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: implications for selection. *Genetics*. 2006;174:465–80.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GEM, Souza NA, Araújo IB, et al. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:1–12.
- Ministério da Saúde. 2013. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>.
- Lins RM, Souza NA, Brazil RP, Malignon RD, Peixoto AA. Fixed differences in the paralytic gene define two lineages within the *Lutzomyia longipalpis* complex producing different types of courtship songs. *PLoS One*. 2012;7:e44323.
- Silva MH, Nascimento MDSB, Leonardo FS, Rebêlo JMM, Pereira SRF. Genetic differentiation in natural populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) with different phenotypic spot patterns on tergites in males. *Neotrop Entomol*. 2011;40:501–6.
- Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Mol Biol*. 2002;11:315–23.
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. Updated world map of the Köppen Geiger climate classification. *Hydrol Earth Syst Sci*. 2007;11:1633–44.
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *J Biogeogr*. 2000;27(2):261–73.
- 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). *Memoirs of the Am Entom Inst*. 1994;54:1–881.
- Solano P, Duvallet G, Dumas V, Cuisance D, Cuny G. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Trop*. 1997;65:175–80.
- Mazzoni CJ, Gomes CA, Souza NA, De Queiroz RG, Justiniano SCB, Ward RD, et al. Molecular evolution of the period gene in sandflies. *J Mol Evol*. 2002;55:553–62.
- Standen R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*. 1996;5:233–41.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error? Probabilities. *Genome Res*. 1998;8:186–94.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28:2731–39. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*. 1999;15:174–75.
- Crooks GE, Hon G, Ouchandla JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. 2004;14:1188–90.
- Pritchard JK, Stephens P, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 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.
- Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F statistics under isolation by distance. *Genetics*. 1997;145:1219–28.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *EvolBioinform Online*. 2005;1:47–50.
- Posada D. JModel test: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253–56.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003;52:696–704.
- Passamonti M, Mantovani B, Scali V. Phylogeny and karyotype evolution of the Iberian *Leptynia laetevata* species complex (Insecta: Phasmatodea). *Mol Phylogenet Evol*. 2004;30:87–96.

41. Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn E. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between random amplified polymorphic dna-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Ann Entomol Soc Am.* 2005;98:908–17.
42. Wilkerson RC, Foster PG, Li C, Sallum MAM. Molecular phylogeny of neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* species complex (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 2005;98:918–25.
43. Lins RMMA, Souza NA, Peixoto AA. Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and love song production. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:736–40.
44. Hamilton JGC, Maignon R, Alexander B, Ward R, Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol.* 2005;19:480–88.
45. Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto A. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *J Med Entomol.* 2004;41:906–13.
46. Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MA, Balbino VQ. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *Parasit Vectors.* 2008;1:16.

**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



5. Discussão geral

A composição do complexo de *Lutzomyia longipalpis* no Brasil ainda é um tema bastante controverso (Bauzer, 2007), mas a distribuição desta díptero no Brasil indica fortemente a presença de pelo menos cinco espécies brasileiras deste complexo (Araki *et al.*, 2009; Vigoder *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010 e Lins *et al.*, 2012).

A observação de frequências de polimorfismos encontrados na população de sequências revelou, pela primeira vez, polimorfismos fixados (SNPs) no gene *period* que separam os fenótipos 1S e 2S. A fixação de polimorfismo separando os dois fenótipos de *L. longipalpis* também foi detectada no fragmento do gene *paralitic* sendo observada uma mutação a nível de aminoácidos (Lins *et al.*, 2008, 2012). Em nosso trabalho foi verificada mutações sinônimas e estes SNPs em conjunto podem ser utilizados como marcadores de espécies crípticas, bem como nos estudos de Turner *et al.* (2009) e Salazar *et al.* (2010).

Neste estudo, optamos pelo método de atribuição de genética baseada em inferência bayesiana, porque, apesar de ser amplamente utilizado para esclarecer problemas taxonômicos de espécies crípticas (Ross *et al.*, 2009; Anderwald *et al.*, 2011; Lumley e Sperling, 2011; Latch *et al.*, 2011 e Pringle *et al.*, 2012), tem sido pouco empregado para as populações de *L. longipalpis*. Este método também forneceu mais esclarecimentos sobre as espécies dos complexos *Anopheles annulipes* (Boyd, 2007) e *Culex pipiens* (Fonseca *et al.*, 2004). O método da população genética caracteriza cada atribuição de um conjunto de frequências de alelos em cada locus, e cada indivíduo é atribuído probabilisticamente de uma população (Pritchard *et al.*, 2000). Neste estudo, a análise do método de atribuição genética, para a localidade de Sobral, mostrou a presença de duas populações

genéticas relacionadas com manchas abdominais, assim como sugerido por outros trabalhos com populações simpátricas do complexo *L. longipalpis* em outros trabalhos (Bauzer *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2010 e Lins *et al.*, 2012).

Aqui, a ML foi utilizada pela primeira vez para avaliar somente populações simpátricas de *L. longipalpis*. Curiosamente, em um estudo anterior, em que ML foi utilizada para avaliar flebotomíneos na América do Sul, a presença de espécies crípticas em *L. longipalpis* não foi detectada (Golczer e Arrivillaga 2010), provavelmente, devido à análise de um fragmento de 266pb do gene *per* combinado com populações simpátricas e parapátricas ao mesmo tempo. Neste estudo, utilizando um fragmento de 525pb a ML, indicou a presença de dois clados associados a fenótipos 1S e 2S. A ML já foi utilizada diversas vezes em estudos de espécies crípticas fornecendo respostas filogeográficas e filogenéticas dos clados estudados Lehr, 2005; Passamonti *et al.*, 2004 e Wilkerson *et al.*, 2005). Nossos resultados também sugerem, pela primeira vez a posição derivada de 2S.

Bauzer *et al.* (2002a) utilizaram uma árvore de Evolução Mínima baseada no marcador de 266pb do gene *per*, confirmando a presença de espécies crípticas em populações simpátricas da localidade de Sobral, observando discrepâncias entre os genótipos e fenótipos. De acordo com os dados encontrados com os 525pb do gene *per*, cada fenótipo possui um genótipo correspondente sem incongruências observadas.

Em Bodocó e Caririaçu, foi observado em cada localidade duas populações genéticas distintas de *L. longipalpis*, também relacionadas com manchas abdominais, e exibem o mesmo padrão de variação genética encontrada por outros estudos que investigam populações simpátricas de *L. longipalpis* (Bauzer *et al.*, 2002a; Lins *et al.*, 2008 e Silva *et al.*, 2010). Os padrões genéticos encontrados em

Bodocó e Caririaçu são equivalentes aos padrões descritos para Sobral, utilizando as três metodologias (FST, Máxima Verossimilhança, e de Atribuição Genética). Embora distantes de Sobral, as populações simpátricas encontradas em Bodocó e Caririaçu provavelmente compartilham as mesmas características bioquímicas e comportamentais descritas para a *L. longipalpis* populações de Sobral (Hamilton *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos pelas análises de AMOVA com o fragmento de 525pb confirmou uma maior variação entre os grupos fenotipicamente distintos, caracterizada pela associação de padrão de manchas abdominais, e o marcador genético, não relatado anteriormente para populações de *L. longipalpis*. Embora moderada, este foi o primeiro estudo que se detectou um sinal fitogeográfico entre as populações estudadas baseadas no gene *per*. Os FSTs obtidos exibiram maior distância genética entre as populações fenotípicas de Bodocó-PE, que estão separada de Sobral e Caririaçu (CE) pela chapada do Araripe.

6. Conclusões gerais

Compreender a genética de população do complexo *L. longipalpis* e seu padrão de distribuição é fundamental em áreas com alta endemicidade para a transmissão da leishmaniose visceral. Identificar como as populações de vetores estão distribuídas e as diferenças na capacidade vetorial constituirão subsídios importantes para as autoridades de saúde com relação à epidemiologia da doença e ajudar na implementação de medidas de controle de vetores.

A confirmação das SNPs fixados identificados no gene *per* e sua aplicação como marcadores taxonômicos para diferenciar populações simpátricas de *L. longipalpis* de todo o Brasil. Os dados levantados neste estudo, demonstrou pela primeira vez a posição derivada do grupo 2S ratificando o baixo grau de polimorfismos encontrados em suas sequencias. As análises genéticas, usando o fragmento de 525pb do gene *per* revelou pela primeira vez que uma estruturação geográfica moderada entre o *L. longipalpis* populações, e uma variabilidade significativa em relação aos 1S e 2S fenótipos. Neste estudo, as análises de AMOVA demonstraram pela primeira vez, que a maior variabilidade genética estava relacionada aos fenótipos, ressaltando a importância das manchas abdominais para o diagnóstico de espécies crípticas de populações simpátricas do complexo *L. longipalpis* no Brasil, e o papel de *per* como um importante marcador *barcode* para as populações de *L. longipalpis*.

Referências

- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G and Lee CC (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91: 1055–1064.
- Alexander B and Young DG (1992) Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87: 397-403.
- Andrade BB, Teixeira CR, Barral A and Barral-Netto M (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciência* 77: 665–693.
- Andrade HM, de Toledo VDE P and Marques MJ (2002) *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Veterinary Parasitology* 103:71–81.
- Ang YN, Puniamoorth AND and Meier R (2008). Secondly reduced foreleg armature in *Perochaeta dikowi* sp. n. (Diptera: Cyclorrhapha: Sepsidae) due to a novel mounting technique. *Systematic Entomology* 33: 552-559.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LGSR, Ferreira GEM, Souza NA, Araujo IB, Hamilton JGC, Brazil RP and Peixoto AA (2009) Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Neglected Tropical Disease* 3:1-12.
- Arrivillaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD and Lanzaro GC (2003) The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *Journal of Medical Entomology* 40: 615-627.
- Arrivillaga JC and Feliciangeli MD (2001) *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *Journal of Medical Entomology* 38: 783-790.
- Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD and Lanzaro GC (2002) Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 2: 83-95.
- Awyer LAJM, Peixoto AA, Rosato E, PARKINSON H (1997) Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Science* 278: 2117–2120.
- Ayala D, Goff GL, Robert V and de Jong P (2006) Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in Madagascar and Comoros. *Acta Tropica* 97: 292-300.
- Azevedo AC, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NA, Rosa-Freitas MG and Rangel EF (2000) Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 305-322.
- Azevedo ACR, Luz SLB, Vieira ML and Rangel EF (1993) Studies on the sandfly fauna of Samuel Ecological Station Porto Velho municipality, Rondônia state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88: 509-512.
- Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, de Andrade PP, de Castro JA, Rebelo JM, Carvalho SM and Ramalho-Ortigao M (2006) Genetic structure of

- natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Tropica* 98: 15-24.
- Barr NBL, Liwang CUI, and Mcpherson BA (2005) Molecular systematics of nuclear period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 98: 173-180.
- Bauzer LG, Gesto JS, Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP and Peixoto AA (2002a) Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1624-1627.
- Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP and Peixoto AA (2002b) The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Molecular Biology* 11: 315-323.
- Bauzer LGS, Souza NA, Maigon RDC and Peixoto AA (2007) *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 1-12.
- Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH and Mottram JC (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal of Parasitology* 37: 1063-1075.
- Bickford D, Lohman DJ and Sodhi NS (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- Bottecchia M, Oliveira SG, Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, Kyriacou CP and Peixoto AA (2004) Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Molecular Evolution* 58: 754-761.
- Boyd AM and Foley DH (2007) Distribution of sibling species of the *Anopheles annulipes* complex (Diptera: Culicidae) in the Townsville region of Australia. *Australian Journal of Entomology* 46: 133–139.
- Brazil RP, Rangel EF and Lainson R (2003) *Flebotomíneos do Brasil*. Editora da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro p.257-274.
- Citri Y, Colot HV, Jacquier AC, Yu Q, Hall JC, Baltimore D and Rosbash MA (1987) Family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. *Nature* 326: 42–47.
- Civetta A and Singh RS (1998). Sex-Related Genes, Directional Sexual Selection, and Speciation. *Molecular Biology Evolution* 15: 901–909.
- Clayton JD, Kyriacou CP and Reppert SM (2001) Keeping time with the human genome. *Nature* 409: 829–831.
- Colot HV, Hall JC and ROSBA SH (1988) Interspecific comparison of the period gene of *Drosophila* reveals large blocks of non-conserved coding DNA. *Embo Journal* 7: 3929-3937.
- Corander J, Waldmann P and Sillanpää MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367–374.
- Costa Júnior CRL, Freitas MTS, Santiago Figueirêdo CA, Aragão NC, da Silva, LG, Marcondes CB, Dias RV, Balbino TCL, Souza MBR, Ortigão MR and Balbino VQ (2015) Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites & Vectors* 8:193.
- Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R and Rangel EF (2007) *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the

- Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:149-53.
- Costa R, Peixoto AA, Thackeray JR, Dalglish R and Kyriacou CP (1991) Length polymorphism in the threonine-glycine-encoding repeat region of the period gene in *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* 32:238–246.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM and Brenner SE (2004) WebLogo: A sequence logo generator, *Genome Research* 14:1188-1190.
- Dawson KJ, Belkhir KA (2001) Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genetics Research* 78: 59–77.
- Dujardin JP, Torrez EM, Le PONT F, Hervas D and Sossa D (1997) Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 394-400.
- Esler D (2000) Applying metapopulation theory to conservation of migratory birds. *Conservation Biology* 14: 366-372.
- Evanno G, Regnaut S and Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611 – 2620.
- Excoffier L, Laval G and SCHNEIDER S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier L, Smouse P and Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Falush D, Stephens M and Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
- Falush D, Stephens M and Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and nullalleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.
- Fausto AM, Feliciangeli MD, Maroli M and Mazzini M (1998). Morphological study of the larval spiracular system in eight *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 71-79.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J (1981) Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. *Evolution* 35:1229-1242.
- Ferro C, Pardo R, Torres M and Morrison AC (1997) Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology* 34: 719-728.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcon CA, Mehmet C, Scaffner F, Mogi M, Fleischer RC and Wilkerson RC (2004) Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science* 303: 1535-1538.
- Forattini OP (1973) *Entomologia médica (Psychodidae. Phlebotominae. Leishmaniose. Bartonelose)*. Ed Edgar Blucher Ltda, São Paulo.
- Francois O, Ancelet S and Guillot G (2006) Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics* 174: 805–816.
- Freitas MTS, Ríos-Velasquez CM, Costa Junior CRL, Figueirêdo CAS, Aragão NC, da Silva LG, de Aragão BMV, Balbino TCL, Pessoa, FAC and de Queiroz VB (2015) Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations

- of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasites & Vectors* 8:448.
- Galati EAB (1995) Phylogenetic systematics of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 35: 133-142.
- Gomes BB, Sousa CA, Novo MT, Freitas FB, Alves R, Côrte-Real AR, Salgueiro P, Donnelly MJ, Almeida APG and Pinto J (2009) Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evolutionary Biology* 9: 262.
- Gotter AL, Reppert SM (2001). Analysis of human Per4. *Molecular Brain Research* 15:19-26.
- Gotter AL, Levine JD and Reppert SM (1999) Sex-linked period genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*: implications for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes. *Neuron* 24: 953-65.
- Hall JD and Hal L (2003) *Genetics and Molecular Biology of Rhythms in Drosophila and Other Insects*, Academic Press, Amsterdam p.286.
- Hamarsheh O, Presper W, Yaghoobi-Ershadir MR, Amro A, Aljawabreh A, Sawalha S, Al-Lahem A, Das ML, Guernaoui S, Seridi N and Dhiman RC (2009) Population structure and geographical subdivision of the *Leishmania* major vector *Phlebotomus papatasi* as revealed by microsatellite variation. *Medical and veterinary entomology* 23: 69–77
- Hamilton JG, Brazil RP and Maingon R (2004) A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibás, Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 41: 1021-1026.
- Hamilton JGC, Dawson GW and Pickett JÁ (1996) 3-Methyl- Himachalene: proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *Journal of Chemical Ecology* 22: 2331-2340.
- Hoffman EC, Reyes H, Chu F, Sander F, Conley LH, Brooks BA and Hankinson O (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252:954-958.
- Holsinger KE and Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*, 10: 639-650.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M and Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Collect Research* 9: 1322-1332
- Hudson RR, Slatkin M and Maddison WP (1992) Estimation of level of gene flow from sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
- kamhawi S (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitology* 22:439-445.
- Konopka J and BENZER S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*, *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 68: 2112–2116.
- Lainson R and Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100:811-27
- Lainson R and Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. London: Academic Press p.120.

- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR and Ishikawa EAY (1994) The dermal leishmaniasis in Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 435-443.
- Lane RP and Andward RD (1984) The morphology and possible function of abdominais patches in males of two forms of the Leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). *Entomology Medical Parasitology* 22: 245-249.
- Lanzaro GC, Alexander B, Mutebi JP, Montoya-Lerma J and Warburg (1998) A Genetic variation among natural and laboratory colony populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 65-69.
- Lanzaro GC, Lopes AH, Ribeiro JM, Shoemaker CB, Warburg A, Soares M and Titus RG (1999) Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Molecular Biology* 8: 267-275.
- Lanzaro GC, Ostrovska K, Lawyer PG and Warburg (1993) A *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48: 839-847.
- Lee SD, Kang SO, and Hah, YC (2000) *Hongia* gen. nov, a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:191–199.
- Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC and Conn E (2005) Cryptic Species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) Complex: Incongruence Between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Identification and Analysis of Mitochondrial DNA COI Gene Sequences. *Annals of the Entomological Society of America* 98: 908-917.
- Lewis DJ (1982) A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of British Museum (Natural History) (Entomology)* 45: 121-209.
- Liu X, Lorenz L, Yu QN, Hall JC and Rosbash M (1988) Spatial and temporal expression of the period gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 2:228-238.
- Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ and 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. *Molecular Ecology* 12: 1879-1894.
- Manel S and Gaggiotti OE (2005) Waples RS. Assignment methods: matchingbiological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 136-142.
- Marcondes CB (2001) *Entomologia médica e veterinária*. São Paulo, Ed. Atheneu.
- Marcondes MC (1998) Seria a taxonomia insignificante para a ecologia de vetores? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31:492-493.
- Marzochi MCA (1992) Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104.
- Mazzoni CJ, Gomes CA, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SCB, Ward RD, Kyriacou CP and Peixoto AA (2002) Molecular Evolution of the period gene in sandflies. *Journal of Molecular Evolution* 55: 553-562.
- Mazzoni CJ, Souza NA, Andrade-Coelho C, Kyriacou CP and Peixoto AA (2006) Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene

- between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. BMC Evolutionary Biology 6:85
- Meier R (1995) Cladistic analysis of the Sepsidae (Cyclorrhapha: Diptera) based on a comparative scanning electron microscopic study of larvae. Systematic Entomology 20:99–128.
- Meier R., Zhang GY and Ali F (2008). The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. Systematic Biology 57:809–813.
- Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL and Dias ES (2005) Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38: 147-152.
- Morrison AC, Ferro C and Tesh RB (1993) Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of american visceral leishmaniasis in Colombia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 49: 68-75.
- Morrison, CA, Munstermann LE, Ferro C, Pardo R and Torres M. 248 (1995) Ecological and genetic studies of *Lutzomyia longipalpis* in a central Colombian focus of visceral leishmaniasis. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental 35: 235
- Mukhopadhyay J, Ghosh K, Azevedo AC, Rangel EF and Munstermann LE (1998) Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Journal of the American Mosquito Control Association 14: 277-282.
- Mutebi JP, Alexander B, Sherlock I, Wellington J, Souza AA, Shaw J, Rangel EF and Lanzaro GC (1999) Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) in Brazil. American Journal of Tropical Medicine Hygiene 61: 149-157.
- Nei and Kumar (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press p. 333.
- Nielsen JA, Peixoto AA, Piccin R, Costa C and Kyriacou P (1994) Big flies, small repeats: the "Thr-Gly" region of the period gene in Diptera. Molecular Biology Evolution. 11: 839–853.
- Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA and Proietti FA (2001) Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. Cadernos de Saúde Pública 17:1231-1239.
- Oliveira SG, Bottecchia M, Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP and Peixoto AA (2001) Courtship Song Genes and Speciation in Sand Flies. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96: 403-406
- Passamonti M, Mantovan I and Scali V (2004) Phylogeny and karyotype evolution of the Iberian *Leptomyia attenuata* species complex (Insecta Phasmatodea). Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 87–96.
- Patterson N, Price AL and Reich D (2006) Population structure and eigen analysis. Public Library of Science, Genetics 2:190.
- Peixoto AA, Costa RDA, Wheeler JC, Hall and Kyriacou CP (1992) Evolution of the threonine-glycine repeat region of the period gene in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. Journal of Molecular Evolution 35: 411–419
- Peixoto AA, Campesan S, Costa R and Kyriacou CP (1993) Molecular evolution of a repetitive region within the per gene of *Drosophila*. Molecular Biology Evolution. 10: 127–139.

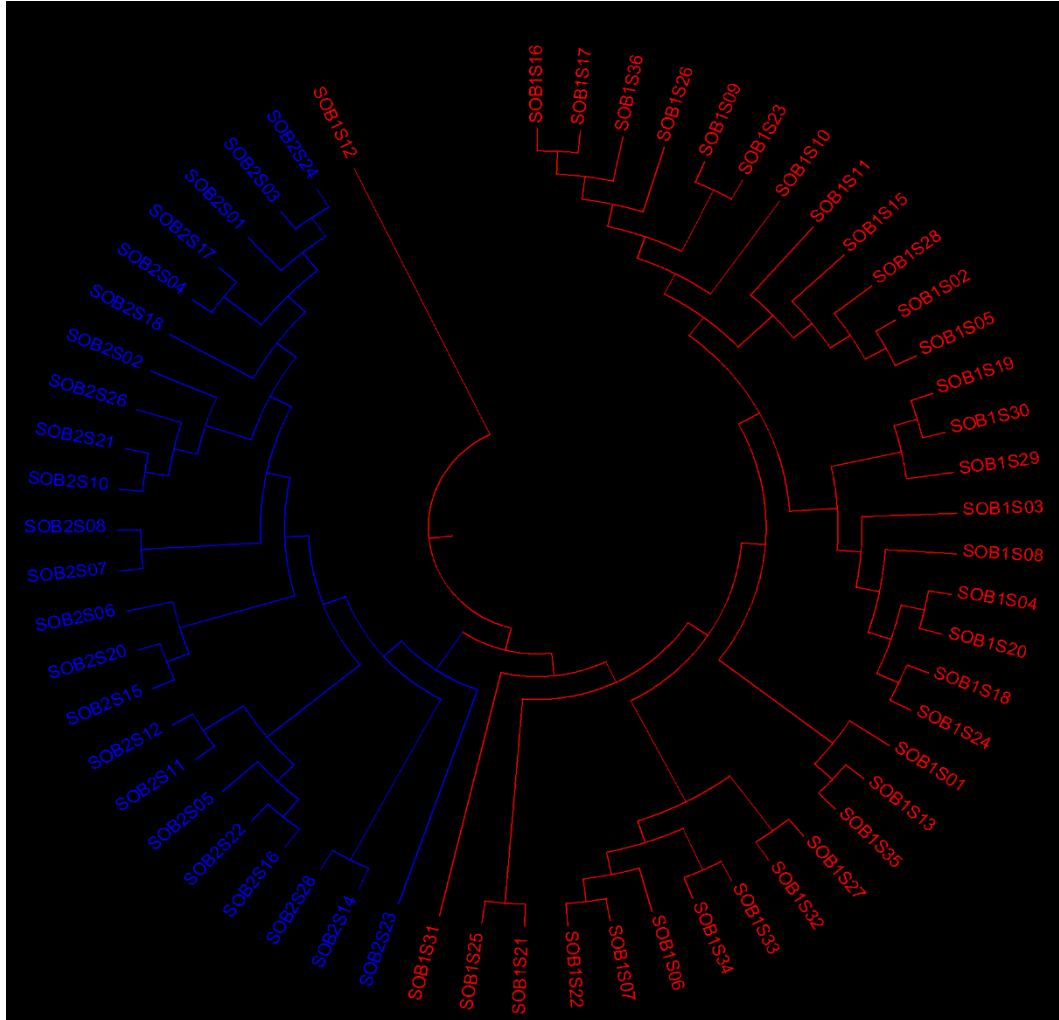
- Pessoa FA, de Queiroz R and Ward RD (2001) External morphology of sensory structures of fourth instar larvae of neotropical species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) under scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 1103-1108.
- Petersen FT, Damgaard J, and Meier R (2007) DNA Taxonomy: How many DNA sequences are needed for solving a taxonomic problem? The case of two parapatric species of louse Flies (Diptera: Hippoboscidae: *Ornithomya* (Latreille, 1802). *Arthropod Systematics & Phylogeny* 65: 111-117.
- Piscopo TV, Mallia AC (2006) Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal* 82: 649-657.
- Pritchard JK, Stephens P and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Purcell S and Sham P (2004) Properties of structured association approaches to detecting population stratification. *Human Heredity* 58:93-107
- Randi E and Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analysis of microsatellite variation. *Conservation Genetics* 3: 31-45
- Regier JC, Fang QQ, Mitter C, Peigler RS, Friedlander, TP and Solis MA (1998) Evolution and phylogenetic utility of the period gene in Lepidoptera. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1172-1182
- Reusch T and Blanckenhorn WU (2003) Quantitative genetics of the dung y *Sepsis cynipsea*: Cheverud's conjecture revisited. *Heredity* 81: 111-119.
- Rocha LS, Falqueto A, Santos CB, Grimaldi JR and Cupolillo GE (2007) Genetic structure of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* population from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* reflects distinct eco-epidemiologic. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 76: 559-565.
- Rogers AS, Rosato E, Costa R and Kyriacou CP (2004) Molecular analysis of circadian clocks in *Drosophila simulans*. *Genetica* 120: 213-222.
- Rosato E, Peixoto AA, Gallippi A, Kyriacou CP and Costa R (1996) Mutational mechanisms, phylogeny, and evolution of a repetitive region within a clock gene of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Evolution* 42: 392-408.
- Rosato E, Peixoto AA, Costa R and Kyriacou CP (1997) Linkage disequilibrium, mutational analysis and natural selection in the repetitive region of the clock gene, period, in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Research* 69: 89-99.
- Sacks DL and Kamhawi S (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vectorhost interactions in Leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* 55: 453-483.
- Salazar C, Baxter SW, Pardo-Diaz C, Wu G and Surridge A (2010) Genetic Evidence for Hybrid Trait Speciation in *Heliconius* Butterflies. *PLoS Genet* 6: e1000930. doi:10.1371/journal.pgen.1000930.
- Schantz MV, Jenkins A and Archer SN (2006) Evolutionary History of the Vertebrate Period Genes. *Journal of Molecular Evolution* 62: 701-707.
- Schneider S and Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079-1089.
- Scotland RW, Hughes C, Bailey D and Wortley A (2003) The Big Machine and the Much-Maligned Taxonomist. *Systematics and Biodiversity* 2: 139 -143.

- Shaw KL and Parsons YM (2002) Divergence of Mate Recognition Behavior and Its Consequences for Genetic Architectures of Speciation. *The American Naturalist* 159: 61-75
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF JR, and Reppert SM (1997) Two period homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19:1261-1269
- Shirasu N, Shimohigashi Y, Tominaga Y and Shimohigashi M (2003) Molecular cogs of the insect circadian clock. *Zoology Science* 20: 947–955.
- Slotman MA, Torre AD, Calzetta M and Powell JR (2005) Differential introgression of chromosomal regions between *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73: 326-335
- Soares RP and Turco SJ (2003) *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais Academia Brasileira de Ciências* 75: 301-330.
- Soto SI, Lehmann T, Rowton ED, Velez B and Porter CH (2001) Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Molecular Phylogeny and Evolution* 18: 84-93.
- Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP and Peixoto AA (2004) Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *Journal of Medical Entomology* 41: 906-913.
- Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP and Peixoto AA (2002) Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 102-103.
- Stump AD, Fitzpatrick MC, Lobo NF, Traore S, Sagnon N, Costantini C, Collins FH and Besansky NJ (2005) Centromere proximal differentiation and speciation in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102: 15930-15935.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G and Lee CG (1997) Rigi, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90:1003-1011.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Takumi T (1998) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 3:167–176
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tan DSH, Ang Y, Lim GS, Bin Ismail MR, Meier R (2010) From „cryptic species” to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). *Zoologica Scripta* 39: 51–61.
- Tesh RB and Guzman H (1996) Sand flies and the agents they transmit. In: Beaty BJ, Marquadt WC. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado. 117-127.
- Tolezano JE, Taniguchi HH, Elias CR, Larosa R (2001) Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 60:47-51.
- Turner TL, Hahn MW and Nuzhdin SV (2005) Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *Public Library of Science Biology* 3: 285.

- Ueyama M, Chertemps T, Labeur C and Wicker-Tomas C (2005) Mutations in the *desat1* gene reduces the production of courtship stimulatory pheromones through a marked effect on fatty acids in *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 8:911-920.
- Uribe S (1999) The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 729-734.
- Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LGSR, Souza, NA, Brazil RP and Peixoto AA (2010). Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 734–739.
- Vogler AP and Monaghan MT (2007) Recent advances in DNA taxonomy. *Journal Zoology Systematic* 45:1-10,.
- Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG and Neva F (1994) Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal society B: Biological Sciences* 29: 223-230
- Ward RD, Phillips A, Burnet B and Marcondes CB (1988) The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In MW Service, *Biosystematics of Haematophagous Insects*, Oxford University Press, Oxford p.258-269..
- Ward RD, Ribeiro AL, Ryan L, Falcão AL and Rangel EF (1985) The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 145-148
- Watts PC, Hamilton JGC, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R and Maingon RDC (2005). Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73:734-743.
- Wheeler DA, Kyriacou CP, Greenacre ML, YU Q and Rutila JE (1991) Molecular transfer of a species-specific behavior from *Drosophila simulans* to *Drosophila melanogaster*. *Science* 251: 1082–1085
- White GB (1974) *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68: 278-301.
- Wilkerson RC, Foster PG, LI C And Sallum MAM (2005) Molecular Phylogeny of Neotropical *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Species Complex (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 98: 918-925.
- Yin H, Mutebi JP, Marriott S and Lanzaro GC (1999) Metaphase karyotypes and G-banding in sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 72-77.
- Young DC and Duncan NA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54: 1-881.
- Zheng XZ, Zhang YP, Zhu DL, Geng ZC (1999) The period Gene: High Conservation of the Region Coding for Thr–Gly Dipeptides in the *Drosophila nasuta* Species Subgroup. *Journal of Molecular Evolution* 149:406–410.
- Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, and Reppert SM (1998). Three Period homologs in mammals: Differential light responses in the suprachiasmatic

circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. Neuron 20:1103-1110.

Anexo 1 - Árvore Filogenética e Frequencia Haplotípica



Additional file 1: Figure S1.:

Neighbor-joining phylogenetic tree of the *L. longipalpis*. Tree was constructed using the 525 bp fragment of the gene *period* obtained by PCR amplification of DNA extracted from *L. longipalpis* collected in Sobral, State of Ceara, Brazil. The tree shows the two phenotypic forms (1S and 2S) with bootstrap value of 67%. The parameters used for the reconstruction of the cladogram were the same as in Bauzer *et al.* [23].

Additional file 2: Table S1: Haplotype frequency of *Lutzomyia longipalpis* from three localities Ceará State, Brazil.

Haplotype		Frequency	Sequences							
Hap_2:	1S	8	BOD1S02	BOD1S08	BOD1S11	BOD1S16	BOD1S18	BOD1S22	BOD1S24	BOD1S31
Hap_4:	1S	7	BOD1S04	BOD1S25	BOD1S29	SOB1S21	SOB1S25	SOB1S33	CAR1S30	
Hap_5:	1S	7	BOD1S05	BOD1S06	BOD1S15	BOD1S19	BOD1S20	BOD1S32	CAR1S08	
Hap_7:	1S	5	BOD1S09	SOB1S06	SOB1S27	CAR1S04	CAR1S12			
Hap_10:	1S	3	BOD1S21	SOB1S22	CAR1S25					
Hap_13:	1S	3	BOD1S28	BOD1S30	CAR1S03					
Hap_45:	1S	3	SOB1S19	CAR1S05	CAR1S15					
Hap_1:	1S	2	BOD1S01	BOD1S26						
Hap_31:	1S	2	SOB1S02	SOB1S05						
Hap_40:	1S	2	SOB1S13	SOB1S35						
Hap_53:	1S	2	SOB1S31	CAR1S11						
Hap_64:	1S	2	CAR1S14	CAR1S24						
Hap_68:	1S	2	CAR1S20	CAR1S28						
Hap_3:	1S	1	BOD1S03							
Hap_6:	1S	1	BOD1S07							
Hap_8:	1S	1	BOD1S13							
Hap_9:	1S	1	BOD1S14							
Hap_11:	1S	1	BOD1S23							
Hap_12:	1S	1	BOD1S27							
Hap_14:	1S	1	BOD1S33							
Hap_30:	1S	1	SOB1S01							
Hap_32:	1S	1	SOB1S03							
Hap_33:	1S	1	SOB1S04							
Hap_34:	1S	1	SOB1S07							
Hap_35:	1S	1	SOB1S08							
Hap_36:	1S	1	SOB1S09							
Hap_37:	1S	1	SOB1S10							

Hap_38:	1S	1	SOB1S11
Hap_39:	1S	1	SOB1S12
Hap_41:	1S	1	SOB1S15
Hap_42:	1S	1	SOB1S16
Hap_43:	1S	1	SOB1S17
Hap_44:	1S	1	SOB1S18
Hap_46:	1S	1	SOB1S20
Hap_47:	1S	1	SOB1S23
Hap_48:	1S	1	SOB1S24
Hap_49:	1S	1	SOB1S26
Hap_50:	1S	1	SOB1S28
Hap_51:	1S	1	SOB1S29
Hap_52:	1S	1	SOB1S30
Hap_54:	1S	1	SOB1S32
Hap_55:	1S	1	SOB1S34
Hap_56:	1S	1	SOB1S36
Hap_57:	1S	1	CAR1S01
Hap_58:	1S	1	CAR1S02
Hap_59:	1S	1	CAR1S06
Hap_60:	1S	1	CAR1S07
Hap_61:	1S	1	CAR1S09
Hap_62:	1S	1	CAR1S10
Hap_63:	1S	1	CAR1S13
Hap_65:	1S	1	CAR1S17
Hap_66:	1S	1	CAR1S18
Hap_67:	1S	1	CAR1S19
Hap_69:	1S	1	CAR1S16
Hap_70:	1S	1	CAR1S21
Hap_71:	1S	1	CAR1S26

Hap_82:	2S	1	SOB2S15
Hap_83:	2S	1	SOB2S20
Hap_84:	2S	1	SOB2S22
Hap_87:	2S	1	CAR2S09
Hap_90:	2S	1	CAR2S15
Hap_91:	2S	1	CAR2S16
Hap_92:	2S	1	CAR2S17
Hap_93:	2S	1	CAR2S20
Hap_94:	2S	1	CAR2S22
Hap_95:	2S	1	CAR2S28
Hap_96:	2S	1	CAR2S31

ANEXO 2: Curriculum Vitae

César Raimundo Lima Costa Júnior

Curriculum Lattes

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7803087861941121>

Última atualização do currículo em 21/10/2015

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Bahia (2006) e mestrado em Programa de Pós-Graduação em Genética pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Federal de Pernambuco (2011). Atualmente é doutorado em genética da Universidade Federal de Pernambuco. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Evolução Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: bioinformática, filogenia molecular, evolução molecular e genômica comparativa. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

César Raimundo Lima Costa Júnior

Nome em citações bibliográficas

COSTA JÚNIOR, C. R. L.; Costa, C. R.; Costa Junior, César Raimundo Lima; Lima Costa, César Raimundo; COSTA, CÉSAR RAIMUNDO LIMA

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2011

Doutorado em andamento em Genética (Conceito CAPES 4).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Título: Expressão sazonal dos genes desaturase 2, period e maxadilan em populações de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) isoladas pela Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil,

Orientador: José Marcelo Ramalho Ortigão.

Palavras-chave: EVOLUÇÃO MOLECULAR; Filogenia Molecular; *Lutzomyia longipalpis*.

Grande área: Ciências Biológicas

2009 - 2011

Mestrado em Programa de Pós Graduação em Genética.

Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Federal de Pernambuco, FADE/UFPE, Brasil.

Título: Avaliação dos perfis de expressão de proteínas associadas à especiação de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum* chagasi, Ano de Obtenção: 2011.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, FACEPE, Brasil.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*; Filogenia Molecular; REAL TIME PCR.

Grande área: Ciências Biológicas

2002 - 2006

Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.

Título: Análise da genealogia do grupo protéico: DNA primase.

Orientador: Rodrigo Barban Zucoloto.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, FAPESB, Brasil.

Formação Complementar

2012 - 2012

V Entomol.

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocrz, CPQAM, Brasil.

2010 - 2010

III Curso de Genética e Bio. Mol. de Inse. Vetor.. (Carga horária: 75h).

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocrz, CPQAM, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutorado em Genética, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2009 - 2011

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestrado em Genética, Regime: Dedicação exclusiva.

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2007

Vínculo: BOLSISTA INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Enquadramento Funcional: INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Carga horária: 20

Vínculo institucional

2005 - 2006

Vínculo: VOLUNTÁRIO, Enquadramento Funcional: INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Carga horária: 20

Vínculo institucional

2003 - 2006

Vínculo: ESTAGIO CURRICULAR OBRIGATORIO, Enquadramento Funcional: TEC. EM BIOLOGIA MOLECULAR, Carga horária: 20

Outras informações

EXAMES MOLECULARES EM HIV

Atividades

10/2003 - 2/2006

Estágios , Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Laboratorio de Retrovirologia.

Estágio realizado

EXAMES MOLECULARES PARA HIV.

Projetos de pesquisa

2012 - 2012

Uso de ferramentas de Biologia Molecular no estudo dos padrões de transmissão vetorial da leishmaniose visceral canina em uma área de transmissão ativa no Sertão do Estado de Pernambuco, Brasil

Descrição: Ecoepidemiologia Molecular de Leishmaniose Visceral Canina.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (3) Doutorado: (4) .

Integrantes: César Raimundo Lima Costa Júnior - Integrante / Aragão, Nádia Consuelo - Integrante / Balbino, Valdir Queiroz - Coordenador / Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago - Integrante / Marcus Batista - Integrante / Lidiane Gomes - Integrante / Moisés Thiago Freitas - Integrante / Claudia Emanuele Ribeiro Tenorio - Integrante.

2006 - 2007

ENSAIO DE SIMILARIDADE DO GRUPO PROTÉICO: DNA PRIMASE

Descrição: ENSAIO DE SIMILARIDADE NO GRUPO PROTÉICO DAS DNA PRIMASE ATRAVÉS DA BIOINFORMÁTICA, BASEADOS NOS MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: César Raimundo Lima Costa Júnior - Coordenador.

2005 - 2006

ENSAIO DE SIMILARIDADE DO GRUPO PROTÉICO: RNA REPLICASE

Descrição: ENSAIO DE SIMILARIDADE NO GRUPO PROTÉICO DAS REPLICASES ATRAVÉS DA BIOINFORMÁTICA, BASEADOS NOS MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: César Raimundo Lima Costa Júnior - Coordenador.

Áreas de atuação

1.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos/Especialidade: Evolução Molecular.
2.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada/Especialidade: Exames Moleculares.
3.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos/Especialidade: Bioinformática.

Idiomas

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

1.
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.

2.
COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; FREITAS, MOISES THIAGO DE SOUZA ; SANTIAGO FIGUEIRÊDO, CARLOS ALBERTO ; Aragão, Nádia Consuelo ; DA SILVA, LIDIANE GOMES ; Marcondes, Carlos Brisola ; DIAS, RAIMUNDO VIEIRA ; BALBINO, TERESA CRISTINA LEAL ; SOUZA, MANUELA BARBOSA RODRIGUES ; ORTIGÃO, MARCELO RAMALHO ; 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.

Citações:1

3.
Pereira, L. F. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Brasileiro, B. T. R. ; de Moraes, M. A. . *Lachancea mirantina* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from the cachaca fermentation process. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Print), p. 01, 2010.

Citações:2|2

4.

Aragão, Nádia Consuelo ; Müller, Gerson Azulim ; Balbino, Valdir Queiroz ; Costa Junior, César Raimundo Lima ; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago ; Alencar, Jerônimo ; Marcondes, Carlos Brisola . A list of mosquito species of the Brazilian State of Pernambuco, including the first report of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), yellow fever vector and 14 other species (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Impresso), v. 43, p. 458-459, 2010.

Citações:1|1|2

Resumos publicados em anais de congressos

1.

Freitas M. T. ; Gomes L. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Aragão, Nádia Consuelo ; Balbino, Valdir Queiroz . Population Genetics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Caririaçu, Ceará.. In: XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine, 2012, 2012.

2.

Gomes L. ; Aragão, Nádia Consuelo ; Balbino, Valdir Queiroz ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. . . Using Molecular Marker for the Determination of Taxonomic Status of *Lutzomyia umbratilis*. In: I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies, 2012, Foz do Iguaçu. I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies, 2012, 2012.

3.

Silva N. F. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; FREITAS, N. S. ; Balbino, Valdir Queiroz . Associated With The Aminoacids Evolution And Codons Bias. In: International Workshop On Genomics Of Health And Diseases, 2011, Natal. International Workshop On Genomics Of Health And Diseases, 2011.

4.

Silva R. S ; Silva N. F. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; FREITAS, N. S. ; Balbino, Valdir Queiroz . Comparative Genomics of 342 and MGH 78578 Strains Of *Klebsiella pneumonia* Associated With The Evolution Of The Codons Use. In: X-Meeting, 2011. X-Meeting, 2011.

5.

FREITAS, N. S. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Balbino, Valdir Queiroz ; Balbino T. C. L. . . Evolution of Codon Usage in the High-Pathogenicity Island of *Yersinae* and Identification of association Patterns of Adjacent Molecule Groups. In: 10th International Symposium on /*Yersinia*, 2010, Recife. 10th International Symposium on /*Yersinia*, 2010.

6.

FREITAS, N. S. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Batista M. ; Balbino, Valdir Queiroz ; Balbino T. C. L. . Evolution Of The High-Pathogenicity Island In *Yersinia*. In: AB3C X-meeting, 2009, Angra dos Reis. X-Meeting, 2009.

7.

COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago ; OLIVEIRA, A. P. A. ; Coutinho Abreu, IV ; Ramalho Ortigão, M ; Balbino, Valdir Queiroz . Evaluation of the genetic markers cacophony and period in the development of topologies applied to phylogeography of *Lutzomyia longipalpis*. In: 54º Congresso brasileiro de Genética, 2008, Salvador. 54º Congresso brasileiro de Genética, 2008.

8.

Cardoso, M.V ; Alecrim, F.M ; Batista M. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; CUNHA, W. ; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago ; Tenorio, K.E.R ; Balbino, Valdir Queiroz . Otimização da Extração de DNA Mitocondrial de *Dekkera bruxellensis*. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

9.

COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; ZUCULOTO, Rodrigo Barban ; FREITAS, N. S. ; fernandes, f.m.c . reconstrução das relações filogenéticas entre duas classes de RNA vírus e suas interferências evolutivas através de RNA replicase. In: 53º congresso brasileiro de Genética, 2007, águas de lindóia. 53º congresso brasileiro de Genética, 2007.

Demais tipos de produção técnica

1.

Balbino, Valdir Queiroz ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Cardoso, M.V ; Batista M. ; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago ; LEVI, T. ; Santos M. A. O. . II Curso de Extensão, Bioinformática: Ferramentas e Aplicações. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

2.

Balbino, Valdir Queiroz ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Batista M. ; Cardoso, M.V ; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago ; LEVI, T. ; Santos M. A. O. . II Curso de Extensão, Bioinformática: Ferramentas e Aplicações. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

3.

Balbino, Valdir Queiroz ; Batista M. ; COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; LEVI, T. ; Santos M. A. O. ; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago . I Curso de Extensão, Bioinformática: Ferramentas e Aplicações. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

4.

COSTA JÚNIOR, C. R. L. ; Balbino, Valdir Queiroz ; Batista M. ; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago ; LEVI, T. ; Santos M. A. O. . I Curso de Extensão, Bioinformática: Ferramentas e Aplicações. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1.

Silva N. F.; COSTA JÚNIOR, C. R. L.. Participação em banca de Narah de França Silva. Genômica Comparativa dos Plasmídeos pPBPR1 SS9 e Pyv 8081 Associada à Evolução dos Aminoácidos e Uso de Códon. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

2.

FREITAS, N. S.; COSTA JÚNIOR, C. R. L.. Participação em banca de Reane Silva da Silva. Genômica Comparativa das Cepas *Klebsiella pneumoniae* 342 e MGH 78578 Associada à Evolução de Uso de Códon. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

X-Meeting. Comparative Genomics of 342 and MGH 78578 Strains Of *Klebsiella pneumoniae* Associated With The Evolution Of The Codons Use. 2011. (Congresso).

2.

International Workshop On Genomics Of Health And Diseases. Associated With The Aminoacids Evolution And Codons Bias. 2011. (Simpósio).

3.

Quinta Ciência-UFRPE. Uso da bioinformática na identificação e caracterização de novos genes de insetos vetores de importância médica e veterinária. 2010. (Seminário).

4.

10th International Symposium on *Yersinia*. Evolution of Codon Usage in the High-Pathogenicity Island of *Yersinia* and Identification of association Patterns of Adjacent Molecule Groups. 2010. (Simpósio).

5.

AB3C X-meeting. Evolution Of The High-Pathogenicity Island In *Yersinia*. 2009. (Congresso).