



Universidade Federal do Amapá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical  
Mestrado e Doutorado  
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil



TIAGO SILVA DA COSTA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODE) DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) NA TERRA INDÍGENA WAJÁPI,  
AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL

MACAPÁ, AP

2015

TIAGO SILVA DA COSTA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODE) DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) NA TERRA INDÍGENA WAJÃPI,  
AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biodiversidade Tropical (PPGBIO)  
da Universidade Federal do Amapá,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Biodiversidade  
Tropical.

Orientador: Dr. Raimundo Nonato P.  
Souto

Co-Orientadora: Dra. Paloma H. F.  
Shimabukuro

MACAPÁ, AP  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

574

C838i Costa, Tiago Silva da.

Identificação molecular (DNA BARCODE) de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na terra indígena Wajãpi, Amazônia Oriental, Brasil / Tiago Silva da Costa; orientador, Raimundo Nonato Picanço Souto; co-orientadora, Paloma H. F. Shimabukuro. -- Macapá, 2015.

94 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. DNA mitocondrial. 2. Leishmaniose tegumentar. 3. Taxonomia molecular. I. Souto, Raimundo Nonato Picanço, orientador. II. Shimabukuro, Paloma H. F, co-orientadora. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

**TIAGO SILVA DA COSTA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODE) DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) NA TERRA INDÍGENA WAJÃPI,  
AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL**

---

Prof. Dr. Raimundo Nonato P. Souto

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paloma H. F. Shimabukuro

Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR - FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Ricardo Adaime da Silva

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - AP)

---

Prof. Dr. Allan Kardec Galardo

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA)

Aprovada em 29 de maio de 2015, Macapá, AP, Brasil

*Esta dissertação é dedicada aos meus pais,*

*Francisca Helena de Castro e Silva e*

*Tiago Ribeiro da Costa*

## **AGRADECIMENTOS**

O período do mestrado foi uma jornada de muito aprendizado realizada em pouco tempo e de forma intensa, para concluí-la a ajuda de algumas pessoas foi inestimável e aqui agradeço:

Aos meus pais, Helena e Tiago, por fornecerem toda a base moral, afetiva e material na qual posso construir meus sonhos e ideais. Às minhas irmãs Soraya e Rosângela, por toda a demonstração de afeto e apoio em todos os meus projetos. E aos meus sobrinhos, Luiza e Hádrio que com seu amor e amizade me fazem uma pessoa melhor.

Ao meu orientador Dr. Raimundo Nonato Souto, por ser um grande professor e incentivador do meu trabalho desde o bacharelado, sempre me oportunizando e instigando a alcançar objetivos mais altos na profissão.

A minha co-orientadora Dra. Paloma Helena Shimabukuro, por ter me guiado em caminhos novos e belos da ciência, sendo na maior parte do tempo Professora, muitas vezes Mestre e sempre amiga. Obrigado por todos os valiosos memes.

Aos Professores do PPGBIO, por todo o conhecimento compartilhado.

A todos do Grupo de Estudos em Leishmaniose (GEL) do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/MINAS, pelo apoio e infra-estrutura concedida em todo o tempo que passei em Belo Horizonte.

Aos colegas de Laboratório, no Artrolab: Ricardo do Anjos Ferreira, no CRNIF: Caroline Almeida Machado, por toda ajuda e companheirismo nas longas jornadas na bancada.

Aos amigos da Osmose Reserva e da Santíssima Trindade, pela amizade e admiração mútua que tornam o caminho mais fácil, mesmo que algumas vezes à distância.

Aos queridos colegas da turma do PPGBIO2013: Dayna Filocreão, Ribeiro, Alinny Lima, Carlos Abreu, Zenaide Miranda e à grande amiga e companheira das atribuições Maisa Otake.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz e a  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Mr. Charles Darwin had the gall to ask”*

Michael Stipe – Man on the moon



## RESUMO

Silva da Costa, Tiago. Identificação Molecular (DNA BARCODE) de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Terra Indígena Wajãpi, Amazônia Oriental, Brasil. Macapá, 2015. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – Universidade Federal do Amapá).

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas que acometem o homem como hospedeiro acidental do ciclo de vida heteroxênico do protozoário *Leishmania* sp. Os insetos da família Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) desempenham o papel vetorial entre os reservatórios naturais do protozoário e seus hospedeiros. Integrante do projeto do projeto “Determinantes Sócio-ambientais da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), na Terra Indígena Wajãpi, Amapá”, que visa estudar a eco-epidemiologia do da LTA de forma integrada, o presente trabalho teve o intuito de avaliar o aspecto entomológico do ciclo, colaborando com a identificação da fauna flebotomínica para prover informações à Vigilância Entomológica na elaboração de políticas preventivas à endemia com uma das técnicas mais promissoras de identificação taxonômica, o DNA BARCODE. Metodologia que preconiza que um fragmento de aproximadamente 650 pb do DNA mitocondrial (mtDNA) pode ser padronizado como identificador universal, funcionando como um código de barras na identificação de espécies, desde a descoberta de novos táxons como na identificação de táxons já descritos. Para a aplicação da técnica foram realizadas coletas de flebotomíneos em 12 aldeias da TIW, no período de 20 a 29 de maio de 2014. As quais resultaram na captura de 1.277 flebotomíneos, pertencentes a 40 espécies e 15 gêneros. Foram identificadas espécies incriminadas e/ou suspeitas como vetores de *Leishmania*. Para a identificação molecular foram usados 249 indivíduos, que passaram por extração do DNA genômico e amplificação do alvo citocromo oxidase I (*COI*), destes 41 exemplares atingiram amplificação dentro dos padrões do *COI* e foram sequenciados para análise bioinformática. A análise das sequências resultantes demonstraram que o *COI* (DNA BARCODE) é uma ferramenta molecular com grande validade para a taxonomia, devendo ser empregada em integração com as demais técnicas já validadas.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar; taxonomia molecular; DNA mitocondrial.

## ABSTRACT

Silva da Costa, Tiago. Molecular identification (DNA BARCODE) of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Wajãpi Indigenous Land, Eastern Amazon, Brazil. Macapa, 2015. Dissertation (Master of Tropical Biodiversity - Postgraduate Certificate in Tropical Biodiversity Program - Dean of Research and Graduate Studies - Federal University of Amapá).

Leishmaniasis are a group of zoonotic diseases that affect humans as accidental host in the heteroxenic life cycle of the parasite *Leishmania* sp. Insects of the Phlebotominae subfamily (Diptera: Psychodidae) play the role as vectors of the natural reservoirs of the parasite and its host. This work is part of the Project "Determinantes Sócio-ambientais da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), na Terra Indígena Wajãpi, Amapá", which aims to study the eco-epidemiology of LTA using an integrated approach, this study aimed to evaluate the entomological aspect of the cycle, helping with the identification of sand flies to provide information to the Surveillance Entomological Services in the development of preventive policies with one of the most promising techniques of taxonomic identification, the DNA BARCODE. Methodology recommends that a fragment of approximately 650pb mtDNA can be standardized as a universal identifier, functioning as a barcode to identify species, since the discovery of new taxa as well as the identification of previously described taxa. For the application of technique sand fly collections were carried out in 12 villages in the WIL in the period 20-29 May 2014. A total of 1.277 sand flies, belonging to 15 genera and 40 species were collected. Species were identified as incriminated as vectors of *Leishmania*. For the molecular identification were used 249 individuals who underwent genomic DNA extraction and amplification of the COI target, these 41 copies were amplified within COI standards and were sequenced for bioinformatics analysis. Analysis of the resulting sequences showed that the COI (DNA BARCODE) is a molecular tool with great validity to the taxonomy and should be used in integration with other techniques.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; molecular taxonomy; mitochondrial DNA.

## ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fêmea de Lutzomyia longipalpis ingurgitada. Fonte: Wilson (2009). ..... 19*
- Figura 2- Estágios do ciclo de vida do flebotomíneo. Fonte: Adaptado de Hernández (2001). .....21*
- Figura 3- Ciclo de vida heteroxênico do protozoário causador da LTA. ....25*
- Figura 4 - Desenho esquemático do tubo digestório de um flebotomíneo. Fonte: Jobling(1987). .....26*
- Figura 5 - Distribuição de espécies de Leishmania responsáveis pela LTA nos estados da Federação. BRASIL (2010). .....28*
- Figura 6 - Distribuição da Leishmaniose Tegumentar Americana no Mundo (WHO,2015). .....28*
- Figura 7 - Culex minimus. Fonte: Bonnani (1961). .....32*
- Figura 8 - Cladograma das tribos Phlebotomini e Hertigini, incluindo as subfamílias Sergentomyiina e Psychodopygina. Fonte: adaptado de Galati (2003). ..... 34*
- Figura 9 - Cladograma da subtribo Lutzomyiina. Fonte: Galati (2003). .....35*
- Figura 10 - Mitocôndria endossimbionte. ....37*
- Figura 11 - Comparação entre genoma mtDNA humano e genoma mtDNA de um inseto (D.yakuba). Adaptado de Hoy (2003) e Velmust (2012). ..... 40*
- Figura 12 - Cadeia analítica da técnica DNA BARCODE e as informações depositadas no BOLD (Barcode of Life Data Systems). Adaptado de Floyd et al.(2010). .....43*

Figura 13 - BARCODE GAP. No gráfico a distância intraespecífica é demonstrada em vermelho, e a interespecífica em amarelo. No gráfico (A), a distância (“barcoding gap”) que delimita a espécie. No gráfico (B), a sobreposição dificulta a delimitação da espécie e/ou indica complexo de espécies. Adaptado de Meyer e Paulay (2005).

.....46

Figura 14 - Localização da TIW e aldeias amostradas nas coletas entomológicas no estado do Amapá. Fonte: adaptado de <http://www.portalbrasil.net> .....50

Figura 15 - Habitação Wajãpi. Fonte: Freire, M.P. (2014).....51

Figura 16 - Fluxograma da técnica utilizada na realização do trabalho.....51

Figura 17 - Distribuição das aldeias com pontos de coleta na TIW. Fonte: adaptado de Gallois (2011). .....52

Figura 18 - Registro fotográficos das armadilhas CDC das coletas realizados no período de 20 a 29 de maio de 2014 na TIW, estado do Amapá. As armadilhas foram dispostas no três ambientes em cada aldeia amostrada: Intra-aldeia, peri-aldeia e extra-aldeia no sentido horário; e da retirada do material coletado e triagem inicial dos espécimes. Fonte: FREIRE,M.P.(2014).....53

Figura 19 - Gêneros coletados na Terra Indígena Wajãpi, estado do Amapá, em maio de 2013.....64

Figura 20 - Espécies mais abundantes coletadas na Terra Indígena Wajãpi, estado do Amapá, em maio de 2013. Soma das espécies identificadas até o nível de gênero e total das outras espécies amostradas. ....64

Figura 21 - Confirmação em gel de agarose [1%] para a amplificação do alvo COI . 12 amostras apresentaram bandas compatíveis com o alvo: 17 – Pa. inflata, 19 – Th. ubiquitousis, 23 – Ny. yuilli pajoti, 24 – Ny. sp, 26 – Ny. yuilli pajoti, 27 – Pa. sp., 28 – Pa. sp., 29 – Pr. Trispinosa, 34 – Pa. infalta, 37 – Mi. série pilosa, 38 – Mi. rorotaensis e 39 – Ps. geniculatus. PM – Marcador molecular, P – controle positivo e B – branco da reação. ....65

Figura 22 - Confirmação em gel de agarose [1%] para a amplificação do alvo COI. Quatro amostras apresentaram bandas compatíveis com o alvo COI: 80 – Pa.

*dreisbachi*, 84 – *Pa. dreisbachi*, 92 – *Ny. yuilli pajoti* e 93 – *Ps. série squamiventris*.  
PM – Marcador molecular e B – Branco da reação.....66

Figura 23 - Confirmação em gel de agarose [1%] para a amplificação do alvo COI .  
Cinco amostras apresentaram bandas compatíveis com o alvo: 111 – *Th. sp*, 114 –  
*Ny. yuilli pajoti*, 120 – *Th. sp.*, 122 – *Pa. dreisbachi* e 123 – *Pa. inflata*. PM –  
Marcador molecular e B – branco da reação.....66

Figura 24 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o  
método de Neighbour-Joining. A árvore original com a soma dos comprimentos de  
ramos = 1.14710603 é mostrado. Valores de bootstrap (500 réplicas) são mostrados  
ao lado dos ramos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos dos ramos  
nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a  
árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método  
Kimura 2 parâmetros e são mostradas em relação às unidades do número de  
substituições de bases por local. A análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos.  
Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve  
um total de 565 posições no conjunto de dados final. Análises foram realizadas no  
MEGA6.....70

Figura 25 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o  
método de Neighbor-Joining . A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de  
500 réplicas é uma representação da história evolutiva dos táxons analisados. A  
análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm  
lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 565 posições no  
conjunto de dados final. Evolutionary análises foram realizadas em MEG .....71

Figura 26 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o  
método de máxima verossimilhança. A árvore foi inferida a partir do modelo GTR,  
selecionado pelo programa JmodelTest, e o suporte dos ramos a partir do método  
aLRT, é uma representação da história evolutiva dos táxons analisados [2] . A  
análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm  
lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 565 posições no  
conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no PHYML. ....72

Figura 27 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o  
método de Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma de comprimento ramo =  
2.10843054 é mostrada. A percentagem de árvores replicadas em que a taxa  
associada agrupados no teste de inicialização (500 réplicas) são mostrados ao lado  
dos ramos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos dos ramos nas  
mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore

*filogenética . As distâncias evolutivas foram calculados usando o método Probabilidade Composição máxima e estão em unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu 66 sequências de nucleotídeos. Posições de codões incluídos foram 1ª + 2 + 3 + não-codificante. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 518 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA6.....73*

*Figura 28 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 500 réplicas representa a história evolutiva dos táxons analisados. As distâncias evolutivas, foram calculados usando o método Probabilidade Composição máxima e estão em unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 66 sequências de nucleótidos. Posições de codões incluídos foram 1ª + 2 + 3 + não-codificante. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 518 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA6. ....74*

## TABELAS

*Tabela 1 - Espécies incriminadas/suspeitas como vetores de leishmânia e sua distribuição geográfica por estados da federação.* \_\_\_\_\_ 22

*Tabela 2 - Espécies de flebotomíneos e as espécies de protozoário Leishmania associadas. As espécies com (\*) são espécies sob suspeição do papel vetorial. Fonte: WHO(2010).* \_\_\_\_\_ 27

*Tabela 3 - Componentes típicos do genoma mitocondrial dos metazoários (BOORE, 1999).* \_\_\_\_\_ 38

*Tabela 4 - Progresso dos projetos internacionais DNA BARCODE (VOHRA, KHERA;2013).* \_\_\_\_\_ 44

*Tabela 5 - Demonstra as regiões amostrais com suas respectivas aldeias e população.* \_\_\_\_\_ 54

*Tabela 6 - Iniciadores utilizados para amplificação do alvo COI* \_\_\_\_\_ 57

*Tabela 7 - Reagentes utilizados para a reação de amplificação do alvo COI:* \_\_\_\_\_ 57

*Tabela 8 - Condições da PCR para o alvo COI* \_\_\_\_\_ 58

*Tabela 9 - Flebotomíneos coletados na Terra Indígena Wajãpi, estado do Amapá, em maio de 2013.* \_\_\_\_\_ 62

*Tabela 10 – Comparativo entre a identificação morfo-anatômica e o resultado do hit blast para cada sequência correspondente.* \_\_\_\_\_ 68

## ABREVIATURAS E SIGLAS

BOLD - Barcode of Life Data Systems

BLAST – Basic Alignment Search Tool

CBOL – Consortium for Barcode of Life

COI – Citocromo Oxidase I

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

CRNIF – Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos

dNTP - Deoxynucleotide Triphosphates

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

iBOL – International Barcode of Life Project

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

MEGA – Molecular Evolutionary Genetic Analysis

µL - Microlitro

mM – Milimolar

MV – Máxima Verossimilhança

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ng – Nanograma

NJ – Neighbor - Joining

Pb – Pares de base

PCR – Polimerase Chain Reaction

PM – Marcador Molecular



rpm – Rotações por minuto

SESAI – Secretária Especial de Saúde Indígena

SINAN – Sistema Nacional de Agravos e Notificação

sp - Espécie

TIW – Terra Indígena Wajãpi

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1. BIOLOGIA E ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2. As leishmanioses</b> .....	<b>23</b>
1.2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana .....	24
1.2.2. LTA no Amapá e na TIW .....	29
<b>1.3. Sistemática e Taxonomia</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3.1. Sistemática e Taxonomia da subfamília Phlebotominae</b> .....	<b>31</b>
<b>1.4. Taxonomia e Sistemática Molecular</b> .....	<b>35</b>
1.4.1. DNA Mitocondrial.....	36
1.4.2 Marcadores moleculares e o <i>Citocromo Oxidase I (COI)</i> .....	39
1.4.3. A iniciativa BARCODING OF LIFE.....	42
1.4.4. Barcode Gap.....	45
<b>2. HIPÓTESES</b> .....	<b>47</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
3. 1. GERAL.....	48
3. 2. ESPECÍFICOS.....	48
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.1. Área de Estudo .....	49
4.2. Delineamento do Estudo .....	51
4.2.1. Captura de flebotomíneos da Terra Indígena Wajãpi (TIW) .....	51
4.3. Processamento dos flebotomíneos .....	55
4.3.1. Identificação morfo-anatômica: dissecação e montagem das lâminas .....	55
4.3.2. Identificação Molecular ( <i>COI</i> ).....	55
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
5.1. COLETA E ESTUDO DESCRITIVO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA .....	60
5.2. Dados Moleculares .....	64
5.2.1. Extração de DNA e armazenamento do material testemunho. ....	64
5.2.2. Amplificação e sequenciamento .....	65
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
6.1. Fauna Flebotomínica coletada na TIW.....	75
6.2. Identificação Molecular .....	76
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>81</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho é integrante do projeto de pesquisa “DETERMINANTES SÓCIO-AMBIENTAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA TERRA INDÍGENA WAJÁPI, AMAPÁ”, contribuindo com a identificação taxonômica dos insetos envolvidos no ciclo de transmissão da doença alvo do projeto: a leishmaniose tegumentar americana (LTA).

### 1.1. BIOLOGIA E ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS

Os insetos da subfamília Phlebotominae tem sido objeto de estudo da taxonomia desde a segunda metade do século XVIII, sua importância entre os dípteros advém do seu papel de vetor do protozoário tripanossomatídeo *Leishmania* spp. Os flebotomíneos (Figura 1), são insetos que medem de 0,3 a 0,4 cm, suas asas possuem características que singularizam o grupo por serem recobertas por cerdas longas variando da tonalidade marrom claro semelhante a palha ao negro, e ao pousarem permanecerem eretas em forma de lança; desses aspectos originaram-se suas sinônimas populares como “cangalhinha”, “mosquito-palha” “birigui”, “anjinho”, “flebóti” (Dias et al. 2003, Rangel e Laison 2003).



Figura 1 - Fêmea de *Lutzomyia longipalpis* ingurgitada. Fonte: Wilson (2009).

O primeiro a utilizar o termo flebotomíneo foi o naturalista italiano Phillippo Bonnani em 1691, mas a descrição foi feita por outro naturalista italiano, Scopoli, que nomeou o espécime como *Bibio papatasi*. O gênero *Phlebotomus* surgiu apenas em 1840, criado por Rondani e Berté. Na América Latina os primeiros exemplares da espécie foram descritos no ano de 1907 por Coquillett e até 1940 somente 33 espécies haviam sido descritas (Rangel e Lainson 2003). Atualmente o registro é de aproximadamente 988 espécies e subespécies válidas de flebotomíneos em todos os continentes, excetuando a Antártica, incluindo 29 registros fósseis, nas regiões Neártica e Neotropical foram registradas 529 espécies, sendo 512 atuais e 17 fósseis (Bates et al. 2015). Das espécies conhecidas 93 são confirmadas ou suspeitas incriminadas na transmissão de leishmânias (WHO 2010). No Brasil foram registradas 19 espécies suspeitas ou incriminadas como vetores de *Leishmania* (Rangel e Lainson 2003).

Os flebotomíneos foram elevados a subfamília por Rohdendorf (1964) devido a características como o hábito hematófago das fêmeas e características singulares das larvas, que diferente dos demais psicodídeos estão aptas a se desenvolver em condições de menor umidade (Lewis et al. 1977), sendo a conduta hematofágica exclusiva das fêmeas da subfamília que se alimentam em mamíferos, aves e reptéis (Lewis 1982, Dias et al. 2003) para permitir a maturação dos ovos e ovoposição, já que a alimentação regular de ambos os sexos é constituída de carboidratos retirados de seivas vegetais, frutas maduras e néctar. e também tendo como fonte alimentar os açúcares produzidos por afídios (Hemiptera: Aphididae) (Cameron et al. 1979).

Os flebotomos são insetos com desenvolvimento holometábolo, ou seja, passam por quatro estágios de diferenciação em seu ciclo vital (ovo, larva, pupa e adulto) (Figura 2). As larvas dos flebotomíneos são terrestres (enquanto a maioria é aquática), saprófagas, anfipnêusticas e eruciformes, e as pupas são classificadas como obtoctos de Comstock (Dias et al. 2003, Sherlock 2003).

Nas Américas, os primeiros espécimes da subfamília só foram descritos no início do século XX, panorama modificado após a descoberta que o díptero desempenhava papel importante na transmissão de agentes patogênicos a outros animais, principalmente mamíferos, e entre os quais estaria incluindo o homem (Barreto 1943).

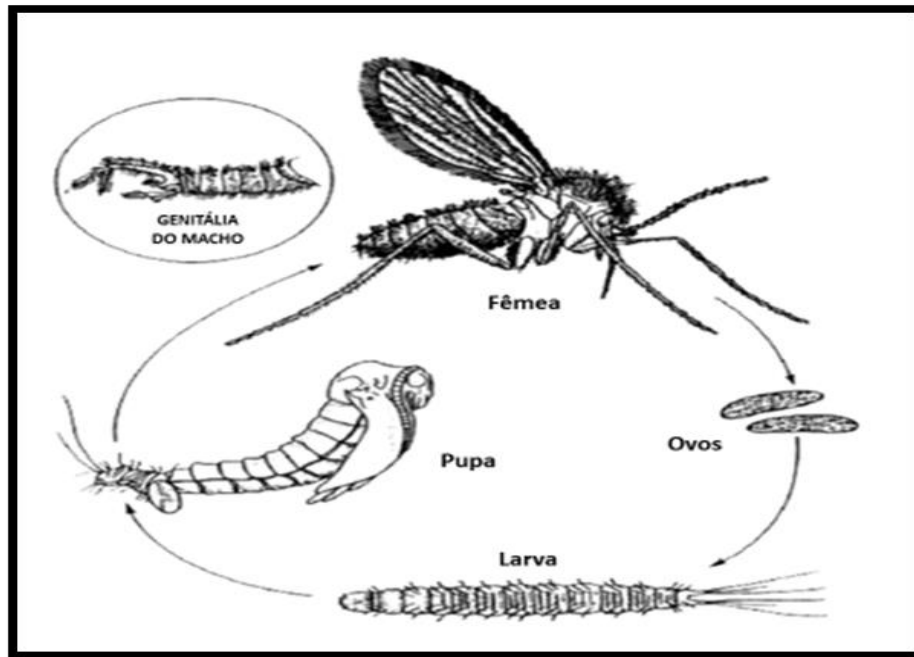


Figura 2- Estágios do ciclo de vida do flebotomíneo. Fonte: Adaptado de Hernández (2001).

Após a incriminação das primeiras espécies de flebotomíneos como vetores do protozoário *Leishmania* sp., consequentemente cresceram os estudos sobre o grupo aumentando. O Brasil é o país com o maior número de espécies e subespécies descritas representando assim 47,7% do total de espécies que ocorrem na região Neotropical, o número de espécies brasileiras registradas chega ao número de 267 (Andrade et al. 2013).

Desempenhando o papel vetorial no ciclo da leishmaniose, os flebotomíneos transmitem os protozoários do gênero *Leishmania*, que são os agentes etiológicos do grupo de doenças chamado de leishmanioses. São protozoários que formam um complexo com características clínicas e ciclos diferenciados e por isso são separados em três grupos principais: a leishmaniose visceral (LV), conhecida como calazar é a forma que causa mais morbidade, a leishmaniose tegumentar (LTA) que afeta primordialmente a estrutura da pele, e é forma mais comum entre as leishmanioses, e a leishmaniose muco-cutânea. (Brasil 2007, WHO 2015).

No Brasil, as principais espécies envolvidas no ciclo de transmissão da LTA são: *Bichromomyia flaviscutellata* (MANGABEIRA,1942), *Nyssomyia whitmani*, *Ny. umbratilis* (WARD; FRAIHA,1977), *Ny. intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* (FRAIHA, SHAW, LANISON,1971) e *Migonemyia migonei* (FRANÇA,1920) (BRASIL, 2007).

Tabela 1 - Espécies incriminadas/suspeitas como vetores de leishmânia e sua distribuição geográfica por estados da federação.

<b>VETOR</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>
<b><i>Bichromomyia flaviscutellata</i></b>	AC,AM, AP, BA, CE, DF, ES, GO, MA, MG, MT, MS, RO, RR, SP, TO.
<b><i>Migonemyia migonei</i></b>	AC, AL, AP, BA, CE, ES, MA, MG, MT, MS, PA, PB, PE, PR, RJ, RN, RS, SC, SP, TO.
<b><i>Nyssomyia whitmani</i></b>	AC, AL, AP, BA, CE, DF, ES, GO, MA, MG, MT, MS, PA, PB, PE, PI, PR, RJ, RN, RO, RS, SP, TO.
<b><i>Nyssomyia antunesi</i></b>	AC, AM, AP, MA, MT, PA, RO, RR, TO.
<b><i>Nyssomyia umbratilis</i></b>	AC, AM, AP, MA, MT, PA, PI, PR, RN, RO, RR.
<b><i>Nyssomyia anduzei</i></b>	AC, AM, AP, BA, MA, MT, PA, RO, RR.
<b><i>Nyssomyia neivai</i></b>	GO, MG, PA, PR, RS, SC, SP, TO.
<b><i>Nyssomyia intermedia</i></b>	AC, AL, BA, CE, DF, ES, GO, MA, MG, MS, PA, PB, PE, PI, PR, RJ, RN, RS, SC, SE, SP, TO.
<b><i>Psychodopygus wellcomei</i></b>	AM, AP, CE, MA, PA, PE, RO, SP, TO.
<b><i>Trichophoromyia ubiquitalis</i></b>	AC, AM, MA, MT, PA, RO, RR.

Fonte: adaptado de WHO (2010); Brasil (2010).

No Amapá, as espécies de flebotomíneos de importância médica registradas até o momento são: *Ny. ylephiletor* (Foratini 1959), *Ny. anduzei* (Foratini 1959, Freitas et al. 2002), *Ny. richardwardi* (Brazil et al. 2000); *Ny. antunesi* (Freitas et al. 2002), *Ny. whitmani* (Freitas et al. 2002), *Ny. umbratilis* (Freitas et al. 2002), *Ny. yuilli pajoti* (Freitas et al. 2002) e *Ny. antunesi* (Brazil et al. 2000).

## 1.2. As leishmanioses

As leishmanioses são um espectro de doenças infecto-parasitárias, zoonóticas causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Gontijo e De Carvalho 2003, Brasil 2007). Pertencente ao gênero *Leishmania* Ross, 1903. Os agentes etiológicos das leishmanioses integram a ordem Kinetoplastida, família Trypanossomatidae e apresentam duas formas básicas: a forma flagelada (promastigota), encontrada no intestino dos flebotomíneos, e a forma intracelular obrigatória das células do sistema fagocítico monocitário dos vertebrados (amastigota) (Ward 1985, Chance 1985).

Considerada um grande problema de saúde pública a leishmaniose representa um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (Brasil 2010). Suas formas clínicas são definidas de acordo com a espécie do protozoário envolvido, das características genéticas e resposta imune do hospedeiro vertebrado e da espécie do inseto vetor envolvido na transmissão do parasito (Saraiva 1989, Antinori et al. 2005). Existem duas principais manifestações: leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA), que se subdivide em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (Saraiva et al. 1989).

As leishmanioses possuem uma ampla distribuição geográfica, manifestando-se em cinco continentes e em 98 países (WHO 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 350 milhões de pessoas estejam em situação de risco para adquirirem a doença, numa taxa de aproximadamente 2 milhões de casos novos ao ano, destes 1.500.000 associadas à LTA e 500.000 à LV (Brasil 2010, WHO 2010). A LV tem 90% dos casos concentrados em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão, enquanto os casos de LT tem uma distribuição mais ampla, estendendo-se pelas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oeste asiático até o meio oeste da Ásia central. Os países com maiores números de casos reportados e que representam aproximadamente 75% da incidência de leishmaniose tegumentar em escala global são: Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria (WHO 2015).

A leishmaniose continua sendo uma das doenças de alcance planetário mais negligenciadas e que afetam as parcelas mais pobres das populações, principalmente de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (WHO 2010).

Apesar de nos últimos 10 anos a ciência ter feito grandes avanços no diagnóstico e prevenção da doença, programas de controle efetivos ainda são raros, e as taxas de mortalidade e morbidade advindas das leishmanioses vem demonstrando tendências de aumento.

### **1.2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana**

A leishmaniose tegumentar (LTA) é caracterizada como uma doença infecciosa, sendo uma protozoose que determina lesões cutâneas, simples ou múltiplas, e/ou de mucosas sendo as últimas responsáveis por destruições e ou mutilações que se traduzem por marcantes fenômenos psicossociais e estigmatizantes nos pacientes. Animais silvestres ou domésticos podem participar do seu ciclo de transmissão, e ocasionalmente podem desenvolver a doença. Considera-se que o perfil epidemiológico de transmissão da leishmaniose tegumentar mais comum no Brasil seja o silvestre, em que o homem adquire o parasita ao adentrar seu foco natural onde coexistem seus reservatórios naturais e seus vetores (Gontijo e De Carvalho 2003). A LTA é uma doença que acompanha a humanidade há séculos, existindo registros datados do século I d.C. Nas últimas décadas tem demonstrado uma tendência de aumento na morbidade e ampliação de sua ocorrência geográfica, manifestando-se atualmente em todos os estados brasileiros, nas suas variadas formas clínicas e perfis epidemiológicos (Basano e Camargo 2004).

Aragão (1922), evidenciou a função vetorial dos flebotomíneos ao estudar o primeiro foco de LTA no estado do Rio de Janeiro, demonstrando o papel da espécie *Ny. intermedia* como vetor do agente etiológico leishmânia, que possui um ciclo de vida heteroxênico (digenético) (Figura 3), vivendo parte do seu ciclo em hospedeiros vertebrados alternado com os insetos vetores (flebotomíneos), os quais são os responsáveis pela transmissão do protozário entre os hospedeiros mamíferos (Aragão 1922, Brasil 2010).



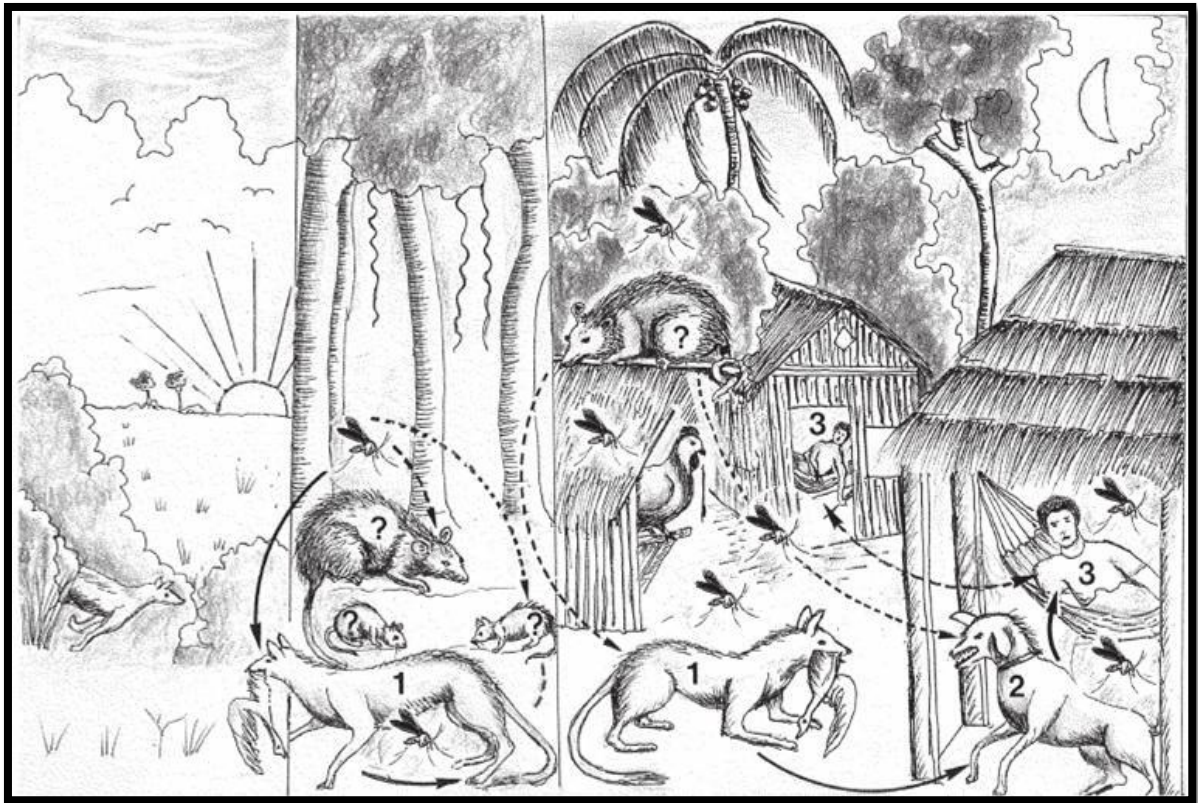


Figura 3- Ciclo de vida heteroxênico do protozoário causador da LTA.

Fonte: [https://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila\\_on\\_line/Figura7.jpg](https://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/Figura7.jpg)

As espécies de leishmanias envolvidas no ciclo que infectam o homem são classificadas como complexos de espécies e são agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, que são classificados primordialmente de acordo com o tipo de desenvolvimento dos flagelados no trato digestório (FIGURA 4) dos flebotomíneos (Lainson e Shaw 1987).

- *Leishmania (Leishmania)*: desenvolvimento suprapilário, predominante no intestino médio e anterior;
- *Leishmania (Viannia)*: desenvolvimento suprapilário, com uma fase no intestino posterior.

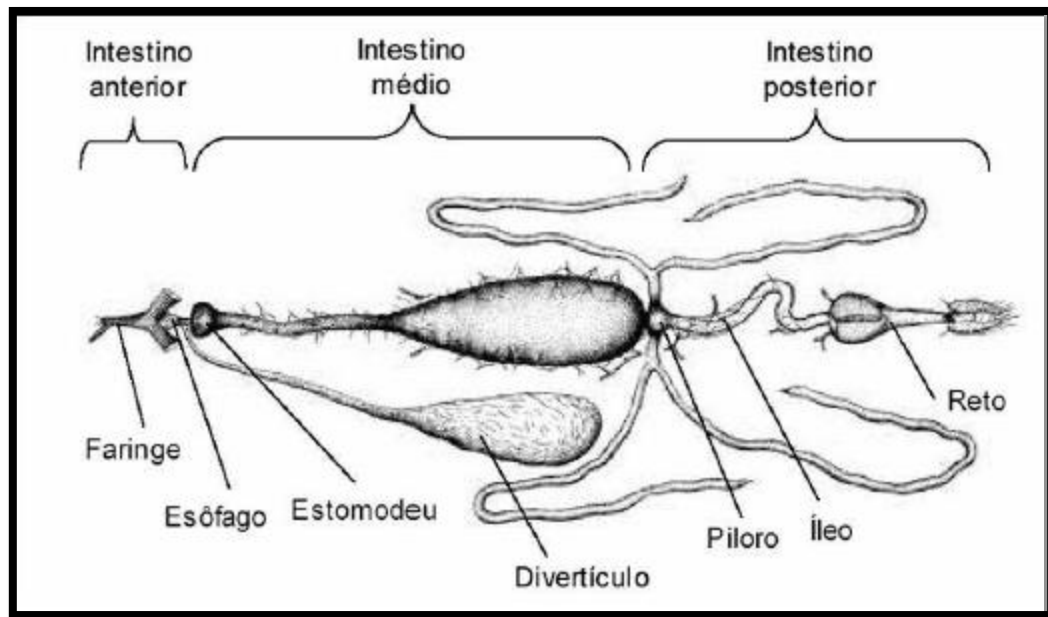


Figura 4 - Desenho esquemático do tubo digestório de um flebotomíneo. Fonte: Jobling(1987).

Atualmente são registradas 11 espécies de *Leishmania* dermatrópicas, destas , sete são endêmicas do território brasileiro e estão classificadas em três complexos: *braziliensis*, *mexicana* e *donovani*. No subgênero *Viannia* e integrando o complexo *braziliensis* temos as espécies: *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (Viannia) guyanensis*, *Le. (Viannia) lainsoni*, *Le. (Viannia) naiffi*, *Le. (Viannia) linderbergi* e *Le.(Viannia) shawi*. O subgenero *Leishmania (Leishmania)* é formado por dois complexos: o *mexicana* e *donovani*, que no Brasil tem como representantes as espécies: *Le. (Leishmania) amazonensis* e *Le. (Leishmania) infantum* (WHO 2010).

As manifestações das diferentes espécies de *Leishmania* estão associadas diretamente as espécies de hospedeiros invertebrados, resultando em cadeias epidemiológicas diferenciadas e restritas à regiões geográficas distintas. Acredita-se que o parasita e o vetor artrópode tenham experimentando uma evolução silmutânea, explicando assim a diversidade tanto do vetor como do protozoário (Nozais 2003, Killick-Kendrick 1985). Para ser incriminada como vetora de *Leishmania*, o flebotomíneo precisa atender a critérios fundamentais: a) apresentar comportamento antropofílico; b) realizar repasto sanguíneo nos outros hospedeiros vertebrados; c) apresentar infecção natural da mesma espécie de *Leishmania* que acomete humanos na área em questão; d) Capacidade de manter o ciclo de

desenvolvimento da *Leishmania* durante a infecção e, e) capacidade de transmitir o protozoário através da picada (WHO 2010, Killick-Kendrick 1985).

Na tabela abaixo, as espécies de flebotomíneos incriminadas ou suspeitas de papel vetorial e as espécies de *Leishmania* associadas à transmissão da LTA no Brasil.

Tabela 2 - Espécies de flebotomíneos e as espécies de protozoário *Leishmania* associadas. As espécies com (\*) são espécies sob suspeição do papel vetorial. Fonte: WHO(2010).

Espécies vetoras	Espécie de <i>Leishmania</i>
<i>Ny. whitmani</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>Ny. intermedia</i>	
<i>Ny. neivai*</i>	
<i>Ps. wellcomei</i>	
<i>Mi. migonei</i>	
<i>Bi. flaviscutellata</i>	<i>L. (V.) amazonensis</i>
<i>Ny. umbratilis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<i>Ny. anduzei</i>	
<i>Ny. antunesi*</i>	
<i>Ps. aryozei*</i>	<i>L. (V.) lindenbergi</i>
<i>Ps. davisii*</i>	
<i>Ps. paraensis*</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>
<i>Th. ubiquitalis*</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>

Os flebotomíneos tem distribuição diferenciada no território brasileiro e no mundo, dessa forma as espécies de *Leishmania* também obedecem essa variação geográfica (Figura 5 e 6).

Na Amazônia, a doença demonstra uma conexão com a ocupação do ambiente natural pelo homem, representadas na expansão das fronteiras agrícolas, implantação de garimpos, construção de estradas e o processo de ocupação das periferias da cidade (Guerra et al. 2006). Da mesma forma que nas áreas de pobreza, o seu caráter ressurgente ou endêmico recai desproporcionalmente sobre os segmentos mais pobres da população Amazônica (WHO 2004, Alvar et al. 2006).

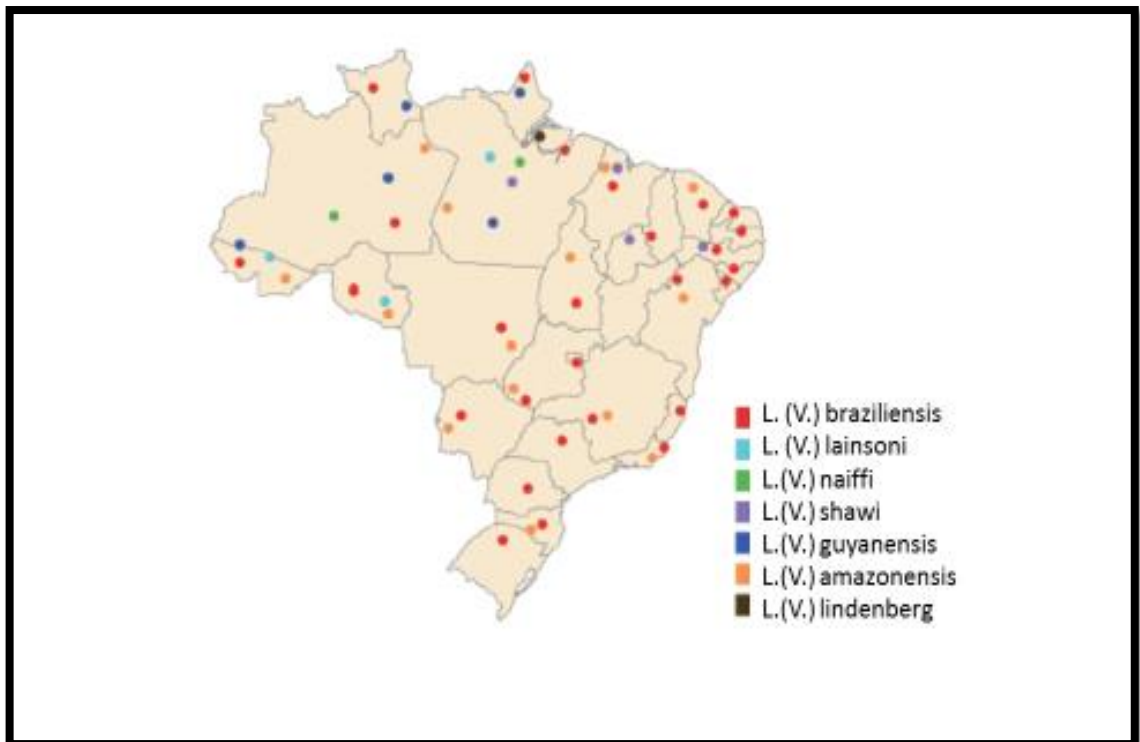


Figura 5 - Distribuição de espécies de Leishmania responsáveis pela LTA nos estados da Federação. BRASIL (2010).

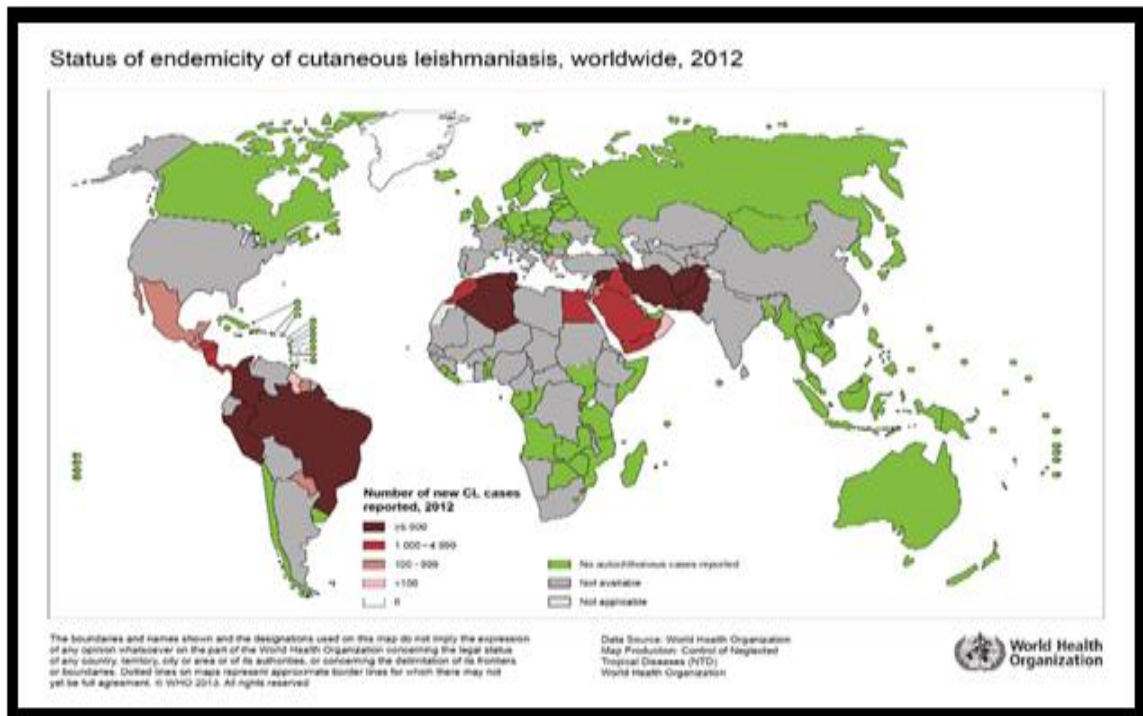


Figura 6 - Distribuição da Leishmaniose Tegumentar Americana no Mundo (WHO,2015).

Segundo dados do Sistema de Agravos de Notificação (SINAN) a LTA tem na região norte e nordeste os estados com 100% de autoctonia e de maior ocorrência da doença. No ano de 2013 da totalidade de 18.226 casos registrados no país, 8.407 casos ocorreram apenas na região norte, e a região nordeste ocupou o segundo maior índice com 5.355 casos. A região norte e os estados da Amazônia legal tem destaque no contexto nacional da LTA. Desde 1991, ocorrem no Brasil anualmente a média de 30.000 registros da doença, do total de casos autóctones a região norte correspondeu com 43,3% no ano de 2012 e 46,1% no ano de 2013 (Brasil 2014).

### **1.2.2. LTA no Amapá e na TIW**

O estado do Amapá apresenta autoctonia em 100% dos municípios para LTA, sendo esta uma doença considerada endêmica em todos os 16 municípios do estado, visto que para o ministério da saúde a ocorrência de 1 caso com autoctonia comprovada é o suficiente para classificar o município como área de endemismo ( Brasil 2010).

Estudos sobre a incidência da LTA no Amapá são escassos e provem quase da sua totalidade do do Ministério da Saúde e dos relatórios do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Apenas em 2001 os casos de LTA passaram a ser notificados no Sistema Nacional de Agravos e Notificação (SINAN), sendo que anteriormente os casos eram reportados pela FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), e com escassa caracterização dos casos.

Em levantamentos feitos no estado pelo Ministério da Saúde é possível analisar uma série histórica da LTA no estado do Amapá, e a variação das taxas da doença com uma curva ascendente na década de 90 culminando em 895 casos, que apesar de um descréscimo posterior apresenta números elevados. É necessário perceber, no entanto, que a elevação do números de casos podem estar ligados com um número maior de notificações e a melhoria dos registros por parte dos órgãos responsáveis.

Segundo o relatório do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (2005), no ano de 2004 houve uma grande elevação no número de casos de LTA registrados no Amapá, chegando ao número de 1.162, com uma incidência de 217/100 mil habitantes; o que representou um aumento de 190% dos casos relatados anteriormente. No ano de 2009, houve registro de 513 casos de LTA, resultando

numa incidência de 81,9/100 mil habitantes. Os municípios mais atingidos foram: Laranjal do Jari, Oiapoque e Calçoene, que juntos representaram um total de 61,1% dos casos registrados nesse ano. Os registros demonstram uma evidente concordância com os padrões epidemiológicos da LTA, visto que 94,9% dos casos ocorreram em indivíduos maiores de 10 anos e em sua maioria do sexo masculino (84%); na região ainda são registrados casos importados de outros países da região de fronteira do Amapá, aproximadamente 17,5% dos casos notificados são de outros países, e em sua maioria (98,7%) provenientes da Guiana Francesa (Brasil 2010).

### **1.3. Sistemática e Taxonomia**

A sistemática é o estudo da diversidade dos organismos na medida em que ela é relevante para algum tipo de relação existente entre populações, espécies ou táxons superiores, já a taxonomia é a teoria e prática da descrição e classificação dos organismos, e a forma como este organismo é classificado refletirá a abordagem usada (Wiley 1981,2011). As normas para a classificação taxonômica estão estabelecidas em Códigos de Nomenclatura, que atualmente estão sendo desafiados por aqueles que tentam redefinir o estudo da taxonomia (Wiley 2011).

A palavra espécie, assim como seu conceito, é de amplo uso popular e no meio científico. Em diferentes sociedades e etnias existem conceitos como “formas”, “tipos”, “variedades” e similares que convergem para a aceção atual mais aceita do termo, que define espécie como: uma população natural intercruzante, reprodutivamente isolada de outros grupos com as mesmas características (Mayr 1977). Apesar do papel central que o conceito de espécie ocupa nas ciências biológicas, a definição deste termo é paradoxalmente controversa entre os biólogos (Sites e Marshall 2004).

O conceito contemporâneo de espécie mais usado no meio acadêmico foi consolidado no final do século XX: o conceito biológico de espécie (CBE); foi o primeiro a demarcar explicitamente suas bases na teoria evolutiva de Charles Darwin (Futuyma 2003, Aleixo 2009). Apesar de amplamente aceito, o CBE que tem sua origem junto à ornitólogos como Ernest Mayr (1982) começou a ser amplamente questionado após os processos de especiação terem tomado papel central nos

estudos de sistemática a partir do advento da sistemática filogenética de Willi Hennig (1966). Assim, o CBE que se baseava no conceito de delimitação de espécie com a cessação do fluxo gênico através do isolamento reprodutivo, se diferencia de um novo conceito que busca a delimitação na descrição de grupos monofiléticos, o conceito filogenético de espécie (CFE). (Mayr 1982, Nelson e Platnick 1981, Cracraft 1983, Aleixo 2009).

Apesar de aparentemente contraditória, a existência de diferentes conceitos de espécie não é inesperada, visto que os conceitos são baseados nas propriedades que são de maior interesse para as diferentes áreas da biologia e grupos estudados por essas (de Queiroz 2005, Aleixo 2007). Em áreas específicas como o estudo das doenças infecciosas identificar os organismos integrantes dos ciclos das enfermidades, tais como os agentes etiológicos, os reservatórios e os vetores é de extrema importância, assim fazendo uso da taxonomia e da sistemática.

A identificação de espécies vetoras de agentes patogênicos por meio de caracteres morfológicos e biológicos, assim como a observação de seus hábitos e comportamentos que influenciam os ciclos de transmissão de doenças são os objetivos principais da vigilância entomológica, fornecendo elementos para a predição de ocorrências de doenças e permitindo intervenções para evitá-las ou abortá-las (Gomes 2002).

O presente trabalho procura investigar e descrever os métodos de identificação zoológica através de uma visão integrativa da taxonomia, embasada na sistemática filogenética Hennigiana.

### **1.3.1. Sistemática e Taxonomia da subfamília Phlebotominae**

A identificação e classificação taxonômica dos flebotomíneos possui um longo histórico de mudanças, que demonstra não apenas as transformações da ciência taxonômica mas também seu nível de dificuldade e problemática. A sistemática dos Phlebotominae demonstra-se controversa, primordialmente no que se refere aos gêneros e subgêneros do grupo (Lewis e Dice 1982, Ready 2012).

O primeiro registro de um espécime da subfamília ocorreu no final século XVII. Em 1691 o naturalista italiano Phillipò Bonanni, em sua obra “Micrographia curiosa” descreve e desenhou um díptero que nomeou como *Culex minimus* (Figura 7), mas a descrição de *Bibio papatasi* só ocorreu quase um século depois por Scopoli em



1786, sendo *Bibio* um gênero de moscas (Bibionidae). O nome “*papatasi*” vem do italiano “papataci” que significa alimentador silencioso (Bonnani 1691, Rondani 1843). Após uma década, foi descrito o primeiro gênero de Psychodidae: *Psychoda* Latreille, 1796, que sendo o gênero tipo deu nome a subfamília e a tribo que pertence, Psychodinae e Psychodini. O gênero *Flebotomus* da espécie tipo *F. papatasi* foi criada apenas em 1840 por Rondani; o nome *Flebotomus* significa “o que corta veias”. Em 1848, Agassiz corrigiu o nome do gênero em definitivo para o latim *Phlebotomus*, que foi inserido na tribo e família originadas do seu nome, Flebotomidae e Flebotominae respectivamente (Galati 2003, Shaw e Lainson 1987, Lewis et al. 1977).

Como na maior parte dos grupos zoológicos, a sistemática dos flebotomíneos é baseada em caracteres morfológicos, dessa forma em 1911, Newstead fez a primeira proposição de divisão do grupo baseado nas nervuras das asas, característica que dividiria o grupo em dois, e em 1914 agrupou as espécies acrescentando características como morfologia da genitália masculina, fórmula palpal e antena; índices morfométricos que definiram o agrupamento em gêneros e subgênero. Em 1926, Adler e Theodor iniciaram o uso de características morfo-anatômicas das fêmeas como faringe, forma do cibário e espermatecas para a diferenciação entre as espécies (Newstead 1911, França e Parrot 1920, Adler e Theodor 1926).

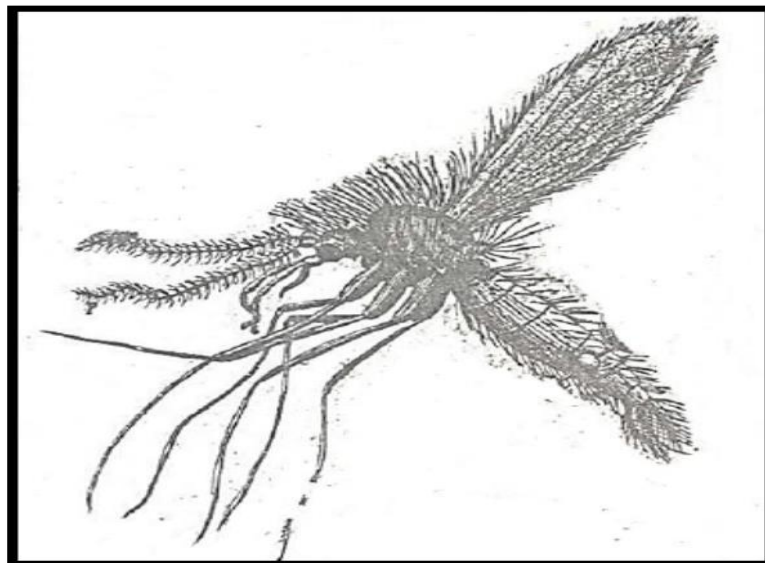


Figura 7 - *Culex minimus*. Fonte: Bonnani (1961).



Ao longo do século XX foram feitas várias proposições para a sistemática desta subfamília. Theodor (1948) sugeriu a criação de quatro novos gêneros, com a promoção de *Brumptomyia* França & Parrot, 1920, *Lutzomyia* França, 1924, *Phlebotomus* e *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 à categoria de gênero. Fairchild (1955) propôs uma classificação em três gêneros, *Phlebotomus* Rondani, 1840, *Warileya* Hertig, 1948 e *Hertigia* Fairchild, 1949; no mesmo ano, Barreto propôs elevar *Brumptomyia* e *Sergentomyia* à categoria de gênero mas em 1962 operou várias mudanças em sua classificação, incluiu *Warileya*, optou pela manutenção de *Brumptomyia*, introduziu *Hertigia* na subfamília *Bruchomyiinae*, e incluiu no gênero *Lutzomyia* a maior parte das espécies conhecidas na época (França e Parrot 1920, Barreto 1943)

Na segunda metade do século XX ocorreram grandes modificações na sistemática do grupo que em boa parte refletem a classificação atual. Forattini (1973), propôs um agrupamento das espécies conhecidas em sete gêneros: *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya*, *Pintomyia* Costa Lima, 1932, *Psychodopygus* Mangabeira, 1941, *Viannamyia* Mangabeira, 1941 e *Pressatia* Mangabeira, 1942.

Lewis et. al (1977) apresentou uma proposta sistemática baseada em critérios práticos, que determinava para as regiões Neártica e Neotropical apenas três gêneros, *Brumptomyia*, *Lutzomyia* e *Warileya*; e *Hertigia* como subgênero de *Warileya*. Diferente do agrupamento de Martins et. al. (1978), que considerava os três gêneros de Lewis e elevava *Hertigia* a gênero (Foratini 1973, Galati 2003, Lewis 1977, Martins et. al. 1978), Young e Duncan (1994) utilizaram a classificação de Lewis et al. (1977) estabelecendo-a como a mais empregada pelos estudiosos da subfamília Phlebotominae, mesmo sendo considerada prematura, primordialmente no que tange as espécies das regiões Neártica e Neotropical (Ready et. al.1980, Young e Duncan 1994). Leng (1987) descreveu uma espécie de flebotomíneo cavernícola proveniente das províncias de Schizuan e Ghizou, na China, e propôs mais um gênero para o grupo: *Chinius* Leng,1987; que foi redescrito por Depaquit et. al. em 2007. (Leng 1987, Léger e Depaquit 2012).

Numa tentativa de classificação natural, Artemiev (1991) propôs uma divisão com duas tribos e sete subtribos. A tribo Idiophlebotomini, subdividida em Idiophlebotomina para o hemisfério leste, contendo cinco gêneros: *Idiophlebotomus*, *Speleophlebotomus*, *Phlebotomites*, *Phlebotomiella* e *Chinius*; e a subtribo Hertigiina para a América, subdivida em dois gêneros: *Hertigia* e *Warileya*. E a tribo

Phlebotomini, subdividida em cinco subtribos: Phlebotomina, Sergentomyiina e Spelaeomyiina para o hemisfério leste, Brumptomyiina para a América e *Australophlebotomina* na Austrália (Artemiev 1991).

No Brasil, Galati (1995) incorporou o método filogenético de Willi Hennig à classificação dos flebotomíneos, e baseando-se em caracteres sinapomórficos reorganizou os grupos com ênfase nas espécies americanas. Assim como a classificação de Artemiev (1991), classificou os Phlebotominae em duas tribos, Hertigiini e Phlebotomini (Figura 8 e 9). Hertigiini em duas subtribos Hertigiina e Idiophlebotomina, e Phlebotomini em seis subtribos: Australophlebotomina, Brumptomyiina, Lutzomyiina, Phlebotomina, Psychodopygina e Sergentomyiina (Galati 1995, 2003). A classificação de Galati dividiu os flebotomíneos americanos em 30 gêneros e 35 subgêneros, dos 529 táxons (512 atuais e 17 fósseis) descritos para o continente americano (Galati 1995, Bates et al. 2015).

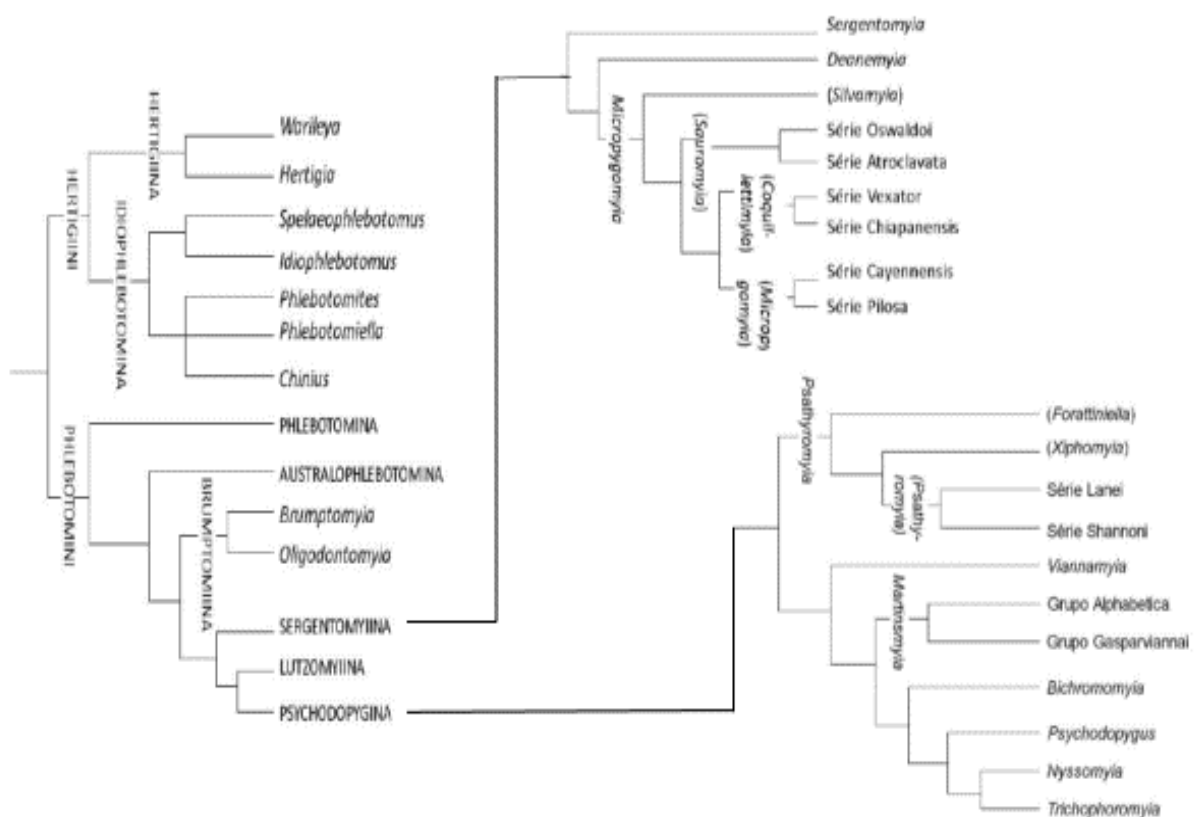


Figura 8 - Cladograma das tribos Phlebotomini e Hertigiini, incluindo as subfamílias Sergentomyiina e Psychodopygina. Fonte: adaptado de Galati (2003).

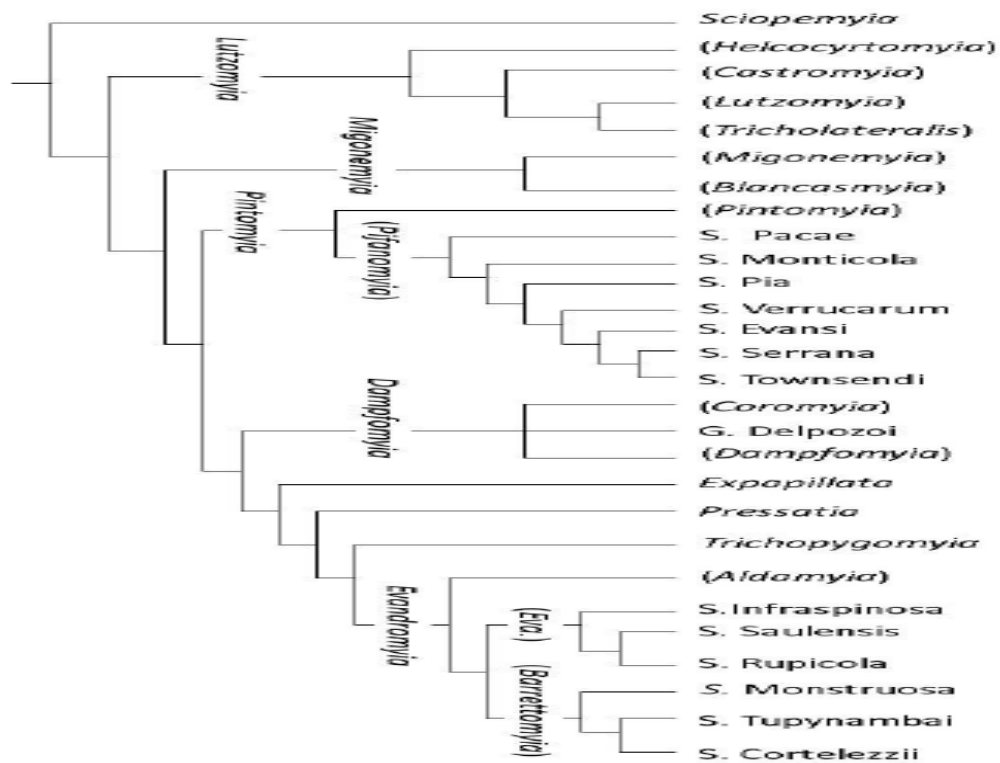


Figura 9 - Cladograma da subtribo Lutzomyiina. Fonte: Galati (2003).

#### 1.4. Taxonomia e Sistemática Molecular

As origens da abordagem molecular em taxonomia e sistemática datam do início do séc. XIX, quando os biólogos George Nuttal e Uhlenhuth iniciaram experimentos usando soro e anti-soro de diferentes espécies, no intuito de observar as relações sanguíneas entre os táxons. A ideia central do experimento demonstrava que quanto maior fosse a proximidade filogenética das espécies, maior seria a reação entre o soro e o anti-soro. Esse experimento, apesar de rudimentar para os dias atuais, estabelecia um dos mais importantes princípios para os estudos de evolução molecular: de que o grau de similaridade entre os genes refletirá a proximidade da relação evolutiva entre os mesmos (Page e Holmes 1998).

Em 1967, Allan Wilson e Vincent Sarich retomaram a ideia do experimento de Nuttal e Uhlenhuth. Fazendo modificações na técnica, realizaram reações cruzadas com a maior proteína do sangue, a albumina. No intuito de verificar as reações

imunológicos entre várias espécies de primatas, mensurando a reatividade entre albumina e a anti-albumina. O resultado do experimento provocou grandes e importantes mudanças na compreensão da filogenia dos grandes primatas, e é considerado como um dos primeiros exemplos em sistemática molecular (Sarich e Wilson 1967, Schwartz 2005). Além de marco para o estudo da sistemática molecular, o experimento de Sarich e Wilson, apresentou outra questão importante, o debate conhecido como “Molecular versus Morfologia”, que discute qual seria o marcador mais apropriado para reconstruir as relações filogenéticas (Page e Holmes, 1998).

#### 1.4.1. DNA Mitocondrial

A mitocôndria (Figura 10) é uma organela celular que desempenha um papel fundamental na produção de energia metabólica nas células eucarióticas. São responsáveis pela geração da maior parte da energia útil que deriva da quebra de carboidratos e ácidos graxos, que serão convertidos em ATP pelo processo de fosforilação oxidativa. A organela possui características únicas entre as organelas citoplasmáticas, a mais importante delas é possuir seu próprio DNA, que por sua vez tem um maquinário próprio de replicação e produção de proteínas mitocondriais. Esta característica que faz da mitocôndria um dos maiores exemplos de endossimbiose na natureza, pois seriam as descendentes de bactérias que foram fagocitadas e evoluíram para as mitocôndrias atuais (Sacoone 2000, Cooper 2000).

A “Teoria da Endossimbiose” propõe que a mitocôndria é um endossimbionte das células eucarióticas, postulando que o núcleo originário de uma *Archeobacterium* iniciou o processo de simbiose com uma *Eubacteria* originando a mitocôndria atual (Margulis 1971). Posteriormente, esta teoria foi revista para a “Hipótese do hidrogênio” sugerindo que a simbiose teria ocorrido entre uma *Archeobacterium* anaeróbia, dependente de hidrogênio, com uma *Eubacteria* capaz de realizar a respiração e que gerava hidrogênio como produto residual do metabolismo anaeróbio (Martin e Müller 1998).

Por razões funcionais, acredita-se que quanto mais importante for a função de um gene ou proteína, mais lentamente será a taxa de modificações evolutivas em sua estrutura primária (Wilson 1985). Assim seria esperado que o mtDNA possuísse um padrão lento de evolução, já que a mitocôndria possui função vital para a

sobrevivência do animal. Desempenhando papel central no metabolismo animal é nela que ocorre a fosforilação oxidativa, processo essencial para a produção de ATP, assim como outros processos bioquímicos (Moritz e Cícero 2004, Boore 1999). Apesar dessa expectativa, estudos demonstram que a taxa de evolução do mtDNA é mais rápida do que cópias únicas de DNA nuclear (Brown et al. 1979).

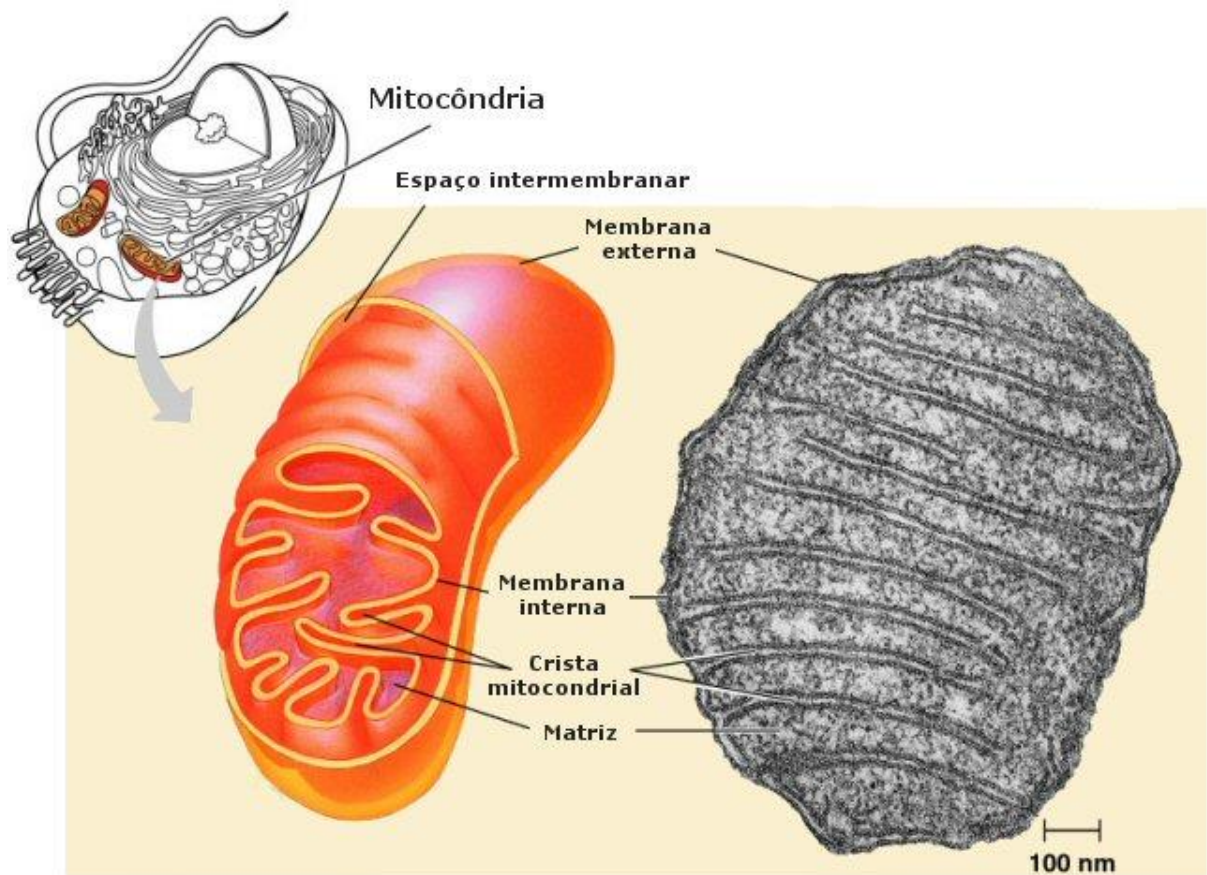


Figura 10 - Mitocôndria endossimbionte.

Fonte: ([http://www.cientic.com/tema\\_celula\\_img4.html](http://www.cientic.com/tema_celula_img4.html))

O DNA mitocondrial (mtDNA) dos metazoários é caracterizado como uma fita dupla extracromossomal pequena, fechada em forma circular com aproximadamente 15 a 20 kb. Com poucas exceções, o genoma mitocondrial dos animais tem os mesmos 37 genes: 2 para RNA ribossomal (rRNA), 13 para proteínas e 22 para RNA transportador (tRNA) (Tabela 2). Além destes, o mtDNA possui uma região não codificante, cuja função é o controle da replicação e transcrição do genoma mitocondrial; denominada região controle, esta é rica em adenina e timina, também

conhecida como região rica em conteúdo A/T. Essas regiões diferem entre espécies de vertebrados e invertebrados, sugerindo que esse sistema regulatório se modificou durante a evolução dos grupos zoológicos (Wolstenholme 1992, Boore 1999, Saito et al. 2005).

Tabela 3 - Componentes típicos do genoma mitocondrial dos metazoários (Boore 1999).

<b>Região codificadora de proteínas</b>	<b>Designação do mtDNA em animais</b>	<b>Sinônimo</b>
<b>Citocromo C oxidase</b> <b>Subunidades I,II,III</b>	COI, COII, COIII	cox1, cox2, cox3
<b>Citocromo b apoenzima</b>	Cytb	Cob
<b>Nicotinamina adenina dinucleotideo (NAD) desidrogenase subunidades 1-6, 4L</b>	ND1-6, ND4L	Nad1-6, nad4L
<b>Trifosfato de adenosina (ATP) sintetase subunidades 6,8</b>	ATP6, ATP8	Atp6, atp8 ou A6, A8
<b>Subunidade menor do RNA ribossomal</b>	16S	LrRNA, ml
<b>Subunidade maior do RNA ribossomal</b>	12S	SrRNA, mS
<b>18 RNAs transportadores cada um especificando um aminoácido</b>	Com a primeira letra do aminoácido correspondente	trnX
<b>Dois RNAs transportadores específicos para leucina</b>	Diferenciando pelo código reconhecido L(CUN) ou L(UUR)	Diferenciado pelo código
<b>Dois RNAs transportadores específicos para serina</b>	Diferenciado pelo código reconhecido S(AGN) ou S(UCN)	Diferenciado pelo código

O estudo do mtDNA tem sido amplamente empregado como ferramenta em estudos de genética de população, taxonomia e sistemática molecular. O emprego

dessa técnica se justifica por razões práticas como: o mtDNA é relativamente fácil de amplificar, não é duplicado, supostamente neutro e altamente variável entre e dentro dos táxons (Nabholz et al. 2008). O mtDNA possui outras características importantes que justificam sua utilidade como marcador molecular, além de vantagens ao compará-lo com o DNA nuclear: o genoma é de origem materna, sem processos de recombinação gênica; baixa eficiência do mecanismo de reparo durante a replicação e altas concentrações de compostos oxigenados, potenciais deteriorantes do DNA, que resultam numa taxa de evolução mais rápida que a nuclear. Mostrando assim seu potencial para estudos de evolução e identificação de espécies (Wolstenhome 1992, Boore 1999).

#### **1.4.2 Marcadores moleculares e o *Citocromo Oxidase I (COI)***

Marcadores moleculares podem ser caracterizados como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como isoenzimas ou marcadores bioquímicos, ou de um segmento específico de DNA (expresso ou não), a sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ser conhecidas ou não. Se o marcador molecular obedecer as leis de herança mendeliana, será também definido como um marcador genético (Avisé 2004, Griffiths et al. 2000).

Os avanços dos métodos e análises em biologia molecular tem propiciado o aprimoramento dos sistemas de identificação molecular. Os marcadores moleculares têm se mostrado um alvo efetivo na diferenciação de espécies de diversos grupos (Avisé 2004, Hebert et al. 2003, 2005). Marcadores moleculares mitocondriais têm sido cada vez mais empregados em estudos filogenéticos de vários táxons, um dos principais motivos que justificam sua escolha é sua taxa de evolução, o mtDNA (Figura 11) evolui mais rapidamente que o DNA nuclear, acumulando um número maior de diferenças numa proporção de até 10 vezes mais que os genes nucleares (Stoeckle et al. 2005). Vários genes no mtDNA e do DNA nuclear foram usados como marcadores moleculares na tentativa de diferenciar espécies, o *COI* se demonstra como um dos mais eficientes (Hebert et al. 2005, Roe e Sperling 2007).

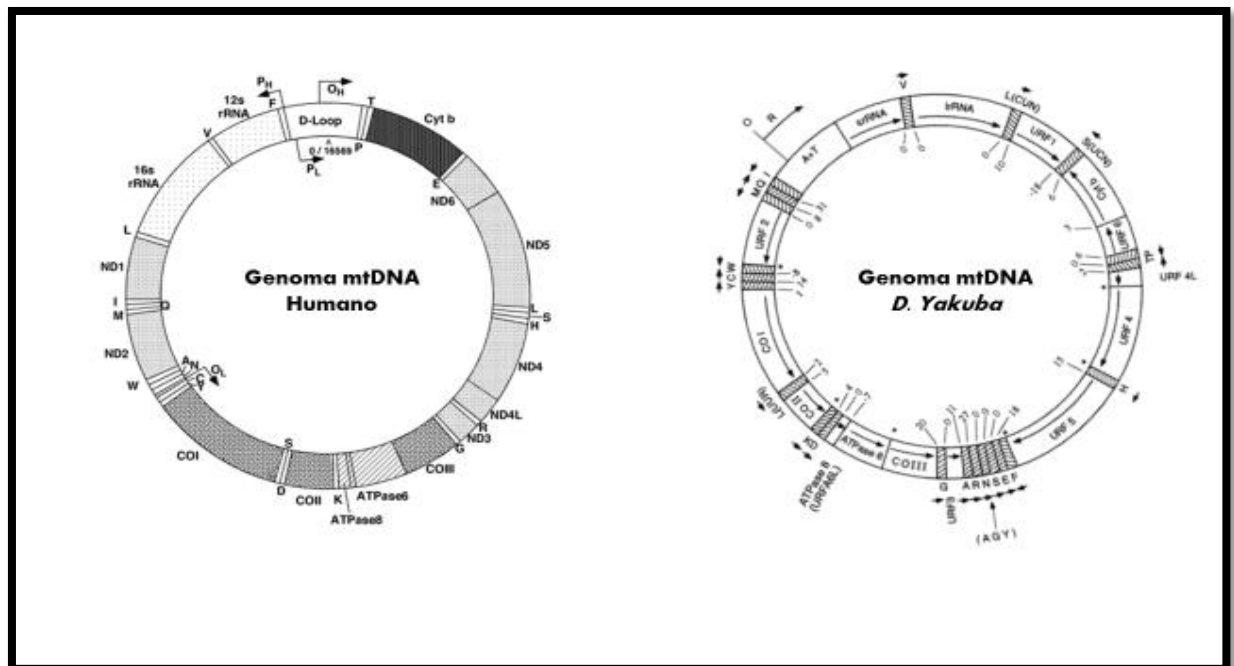


Figura 11 - Comparação entre genoma mtDNA humano e genoma mtDNA de um inseto (*D.yakuba*). Adaptado de Hoy (2003) e Velmust (2012).

Motivados pela descoberta de comunidades em fontes termais submarinas com numerosas espécies de invertebrados não descritos e que demonstravam características de potenciais novos gêneros e até um novo filo, Folmer et al. (1994) experimentaram novas técnicas moleculares que auxiliassem no estudo e classificação desses novos e desconhecidos organismos. Para tal elegeram como alvo o *Citocromo C Oxidase subunidade I (COI)*, aparentemente era uma das regiões mais conservadas do DNA mitocondrial (Brown 1985, Avise 1994, Griffiths et al. 2000).

Analisando a eficiência de iniciadores (primers) para amplificar a região alvo (*COI*), definiram um par de “primers” que amplificaram com sucesso um fragmento de 710 bp num amplo conjunto de invertebrados. Como resultado da análise da eficiência em amplificar a região alvo, chegaram a percepção de que o *COI* poderia ser usado para uma gama maior de metazoários (Zhang e Hewitt 1997, Folmer et al. 1994, Hebert et al. 2003), estimando-se que mais de 95% das espécies dos grupos testados tenham apresentando divergência nos padrões do *COI* (Ratnasingham e Hebert 2007).

A grande diversidade de seres vivos ainda não descritos foi um dos motivos que levaram à ideia de desenvolver uma forma mais generalista de identificação de



espécies. Sendo a biodiversidade do planeta extremamente variada, considerando desde a microbiota do solo até organismos de alta complexidade, conhecer e descrever toda essa diversidade é um dos maiores desafios que biólogos e pesquisadores da taxonomia e sistemática são postos a prova (de Salle 2006). O objetivo do trabalho destes profissionais é a descrição e discriminação de espécies, o que tem se demonstrado uma tarefa cada vez mais difícil, já que os critérios de identificação permanecem baseados em caracteres morfológicos e este tipo de identificação não é apenas um processo demorado, mas como também demanda um profissional treinado na identificação específica de um determinado grupo zoológico. Processo que acaba por dificultar e muitas vezes impossibilitar a descrição de uma espécie (Goldestein e de Salle 2011)

Dessa forma, quase uma década após Folmer et al. (1994) terem publicado suas pesquisas com mtDNA, pesquisadores da Universidade de Guelph no Canadá, formalizaram a proposta do DNA BARCODE ou DNA BARCODING , que baseou-se na ideia de utilizar uma sequência gênica pequena como uma posição padrão no genoma, e para tal foi estabelecida a análise de uma das regiões do *Citocromo Oxidase I*. A técnica mostrou-se capaz de fazer a distinção de organismos de diferentes espécies visto que a variação genética interspecífica é superior à intraespecífica. Esta região do genoma mitocondrial funcionaria como um sistema para a diagnose universal de organismos, a partir da base 58 da extremidade 5' do gene *COI* (Hebert et al., 2003). O nome DNA BARCODE originou-se na ideia de que o código genético extraído do mtDNA pode ser equiparado ao código de barras usado comumente nos produtos à venda. O código de barras dos produtos comerciais faz uso de 10 números alternados em 11 posições, gerando 100 bilhões de identificadores únicos. No DNA BARCODE, existem 4 possibilidades de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) em uma cadeia maior que 11 posições, que em apenas 15 posições de nucleotídeos permitiria a geração de um bilhão de códigos únicos, o que supera a estimativa de espécies descritas (Hebert et al., 2003).

Outro fator a ser considerado é que as regiões codificadoras do *COI* não possuem “indels” (inserções e deleções). As indels causam problemas difíceis de serem selecionados durante o alinhamento das sequências de DNA. O *COI* também apresenta uma maior variação nas terceiras posições de seus códons, o que proporciona discriminar entre espécies do mesmo grupo, mas as mutações são

lentas o suficiente nas mudanças de aminoácidos, o que proporcionaria uma unidade filogenética que possibilita reconhecer mesmo os maiores níveis de organização taxonômica (Hajibabaei et al. 2007).

#### **1.4.3. A iniciativa BARCODING OF LIFE**

Vários grupos zoológicos tem sido estudados no intuito de testar a técnica e construir bancos de dados com as sequências do alvo (*COI*). Um dos objetivos primordiais do projeto DNA BARCODE, é agrupar os dados das sequências genéticas do *COI* e montar um banco de referência para as espécies conhecidas (Hebert et al. 2003, Hajibabaei et al. 2006), esses bancos tem se mostrado eficientes em diferenciar espécies em testes realizados com assembleias de grupos diferentes, demonstrando que os grupos taxonômicos possuem a região referente ao *COI* distintas (Ratnasingham e Hebert 2007).

Segundo Hebert et al. (2003), a iniciativa BARCODING OF LIFE tem dois principais propósitos:

1. Identificar e designar espécimes desconhecidos em espécies previamente descritas;
2. Auxiliar na descoberta e na descrição de novas espécies, facilitando o diagnóstico de espécies crípticas.

Em 2004, como consolidação do projeto foi criado um consórcio internacional para apoiar e expandir o projeto DNA BARCODE, o CBOL (Consortium Barcoding of Life) – [www.barcodelife.org](http://www.barcodelife.org). Entre os objetivos do CBOL estão o estabelecimento de um protocolo padronizado para a aplicação da técnica e construir um banco de dados acessível e universal com as sequências do DNA BARCODE, o CBOL inclui aproximadamente 120 organizações de 45 nações. Para tanto, foram desenvolvidos duas subdivisões do projeto, o iBOL e o BOLD.

O BOLD (Barcode of Life Data Systems) tem como papel ser o repositório eletrônico de sequências e uma plataforma de bioinformática para sustentar as fases

do processo analítico-comparativo das análises das sequências novas com as antigas, operando em conjunto com o maior repositório gênomico público, o NCBI (National Center for Biotechnology Information). Além do código genético, o BOLD (Figura 8) promove a associação de dados adicionais que registram o processo de análise dos espécimes como: foto do “voucher” (organismo testemunho); pontos de coleta; instituição onde foi depositado; descrição taxônômica e dados moleculares, como iniciadores utilizados na amplificação e eletroferogramas (Floyd et al. 2010, Ratnasingham e Hebert 2007).

O iBOL (International Barcoding of Life Project) se configura como uma grande colaboração internacional para estabelecer um sistema de identificação automatizado baseado no DNA BARCODE para todos os eucariotos. Nos primeiros cinco anos o objetivo será em desenvolver o banco de dados genético com 5 milhões de espécimes de 500 mil espécies, além de desenvolver e compartilhar melhorias em tecnologia, protocolos e técnicas, que vão desde a extração do DNA até sistemas de análise bioinformática (Miyaki 2007, Jinbo et al. 2011).

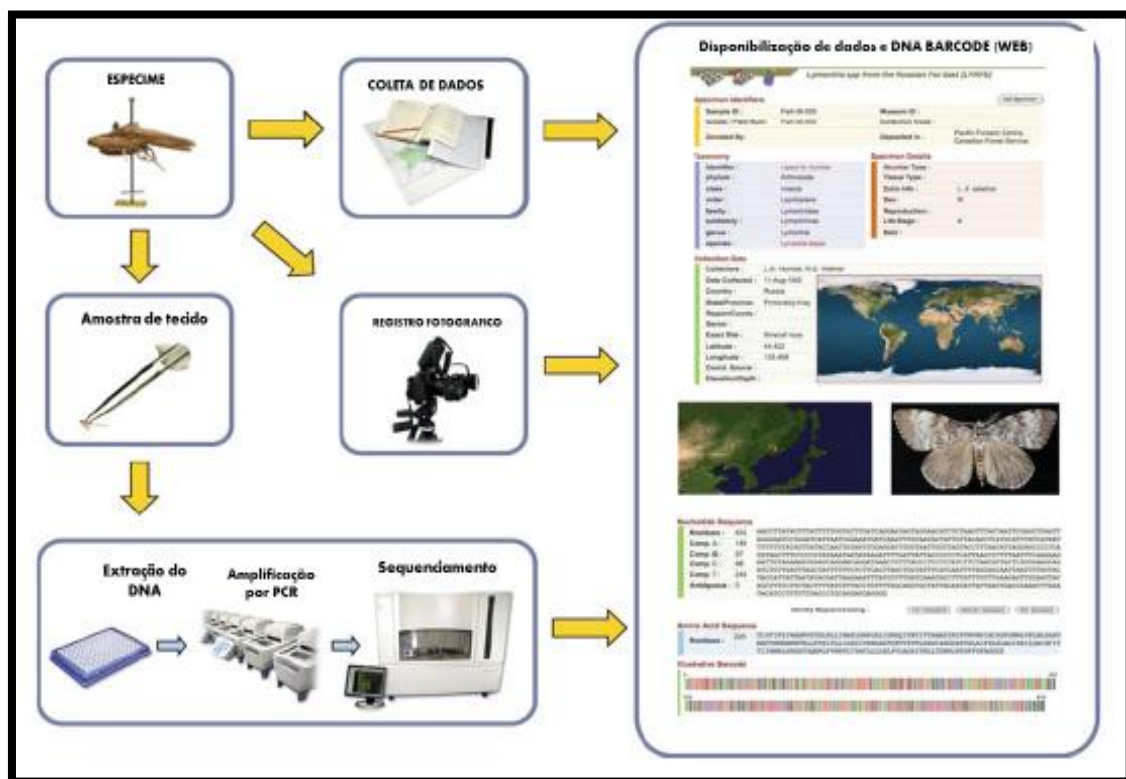


Figura 12 - Cadeia analítica da técnica DNA BARCODE e as informações depositadas no BOLD (Barcode of Life Data Systems). Adaptado de Floyd et al.(2010).

Para a construção do grande banco de dados genéticos, o CBOL e o IBOL lançaram campanhas para cada grupo taxonômico. Os principais projetos são para peixes (Fish-BOL), passáros (ABBI), mamíferos (Mammalia Barcode of Life), vida marinha (MarBOL) e insetos. Há campanhas temáticas como da vida polar (PolarBOL), quarentena e patógenos de plantas (QBOL e ECBOL), e saúde humana (HealthBOL) (Jinbo et al. 2011).

Tabela 4 - Progresso dos projetos internacionais DNA BARCODE (VOHRA, KHERA;2013).

<b>Nome da campanha</b>	<b>Número Total de espécies</b>	<b>Espécimes utilizados</b>	<b>Espécies com BARCODE</b>	<b>Grupos Identificados pelo BARCODE</b>
<b>Formicidae barcode of life</b>	12.205	8495	792 (6%)	1.697
<b>Trichoptera barcode of life</b>	13.165	17.823	2347 (18%)	654
<b>Lepidoptera barcode of life</b>	165.000	43.8341	48.676 (29%)	<4.000
<b>All birds barcoding of life</b>	9.933	20.246	3.281 (33%)	31
<b>Coral reef barcode of life</b>	16.807	28.619	5.431 (32%)	_____
<b>Fish barcode of life</b>	31.220	60.385	7.882 (25%)	_____
<b>Mammalia barcode of life</b>	5.426	19.862	858 (16%)	305
<b>Marine barcode of life</b>	55.451	37.182	6.199 (11%)	_____
<b>Shark barcode of life</b>	1.160	4.339	557 (48%)	_____

A técnica do DNA BARCODE tem sido usada com sucesso em vários grupos de artrópodos: aracnídeos, lepidópteros (Hebert et al. 2004, Hajibabei et al. 2006), Ephemeroptera ( Ball et al. 2005), formigas (Schilick-Steiner et al., 2006), vespas

(Smith et al. 2008), e em vários grupos de dípteros (Kumar et al. 2012; Laurito et al. 2013, Gutiérrez 2014, Nzelu et al. 2015). Os estudos com lepidópteros demonstraram claramente os ganhos e as vantagens possíveis da técnica do BARCODE (Hebert et al. 2004). Demonstrou-se através do DNA BARCODE, que uma borboleta conhecida como Skipp Butterfly (*Austraptes fulgerator*) descrita em 1775, é na verdade um complexo de 10 espécies que se vivem em diferentes plantas hospedeiras.

Apesar do sucesso da técnica em vários grupos, há controvérsias no uso do mtDNA para a identificação de espécies por adotar uma única sequência como critério taxonômico (Moritz e Cicero 2004, Jinbo et al. 2011). Outro ponto de discordância é em relação à sequência diminuta do *COI* que não conteria informação suficiente para descrever a diversidade biológica, e que as sequências produzidas pelo DNA BARCODE não contribuiriam com o desafio de descrever a diversidade da vida na terra (Will e Rubinoff 2004).

Outros pontos controversos no uso do *COI* seriam: processos de especiação muito recentes, nas quais as espécies ainda estivessem compartilhando haplótipos (Hebert et al. 2009, Lukhtanov et al. 2009); processos que poderiam levar a subestimar o número de espécies como hibridação, retenção de poliformismo ancestral e infecção pela bactéria simbiote *Wolbachia*; assim como o inverso pode ocorrer pela influência de cópias nucleares do *COI* e intervenção nuclear do mtDNA (numits), podendo superestimar o número de espécies (Song et al. 2008).

#### **1.4.4. Barcode Gap**

Um ponto crítico do emprego da técnica do DNA BARCODE é a precisão com a qual consegue identificar e delimitar uma espécie. O que dependerá diretamente da extensão e da separação, entre a variação intraespecífica e interespecífica do marcador selecionado (Hebert e Gregory 2005, Meyer e Paulay 2005).

A possibilidade de variação da taxa evolutiva, dentro e entre grupos de espécies relacionadas poderá ocasionar a sobreposição dos níveis de variação intra e interespecífica de alguns táxons, dificultando a identificação de um indivíduo do grupo (Moritz e Cicero 2004). Quanto maior for a sobreposição entre a variação genética dentro de uma espécie e a divergência que separa espécies irmãs, menor

será a precisão do BARCODE (Meyer e Paulay 2005).

Há um intervalo (“gap”) entre as variações intra e interespecíficas que garantem que os valores das distâncias intraespecíficas sejam menores que os valores da distância interespecífica. O intervalo esperado entre os padrões genéticos intraespecíficos e interespecíficos do mtDNA é chamado de BARCODE GAP, dessa forma quanto maior for o intervalo entre esses padrões, maior será o sucesso da técnica (Meyer e Paulay 2005, Jinbo et al. 2011). Foram designados padrões de diferenças mínimas para os grupos zoológicos: uma diferença  $\geq 2\%$  nas sequências de mamíferos implica que as amostras são provenientes de espécies diferentes, já para insetos a delimitação é de  $\geq 3\%$  (Stoeckle e Hebert 2008).

Em estudos com aracnídeos esta técnica foi capaz de delimitar e identificar um total de 163 espécies de aranhas e mais 35 espécies de aracnídeos, sem ocorrência de sobreposição das distâncias intra e interespecíficas (Barrett e Hebert 2005),.

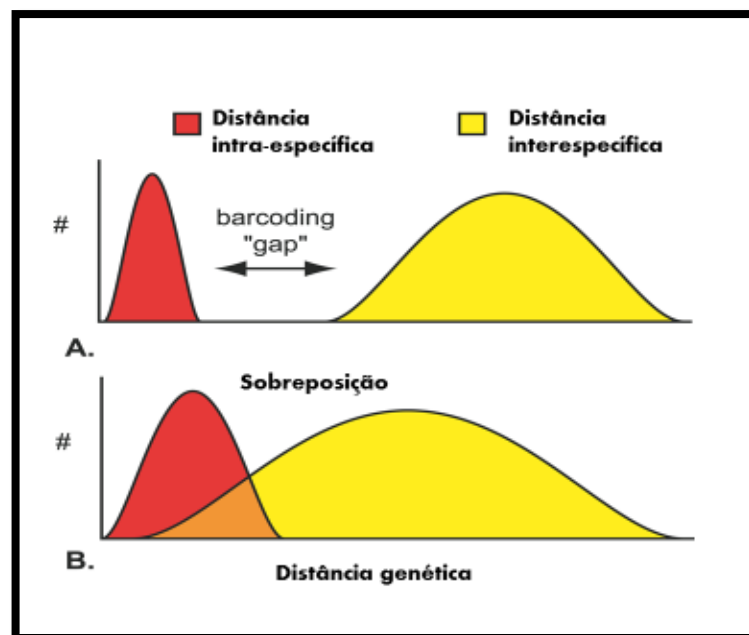


Figura 13 - BARCODE GAP. No gráfico a distância intraespecífica é demonstrada em vermelho, e a interespecífica em amarelo. No gráfico (A), a distância (“barcoding gap”) que delimita a espécie. No gráfico (B), a sobreposição dificulta a delimitação da espécie e/ou indica complexo de espécies. Adaptado de Meyer e Paulay (2005).

## 2. HIPÓTESES

1. Determinar a diversidade da fauna flebotomínica do território Wajãpi poderá auxiliar no entendimento da eco-epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Amapá.

H<sub>0</sub>: O conhecimento da fauna flebotomínica do território Wajãpi a eco-epidemiologia da leishmaniose poderá auxiliar no entendimento da eco-epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Amapá

H<sub>1</sub>: O conhecimento da fauna flebotomínica do território Wajãpi não poderá auxiliar no entendimento da eco-epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Amapá

2. A identificação molecular da fauna flebotomínica demonstra a eficácia da técnica DNA BARCODE na caracterização da biodiversidade.

H<sub>0</sub>= A identificação molecular da fauna flebotomínica poderá demonstrar a eficácia da técnica de identificação molecular DNA BARCODE.

H<sub>1</sub>= A identificação molecular da fauna flebotomínica não poderá demonstrar a eficácia da técnica de identificação molecular DNA BARCODE.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3. 1. GERAL**

Identificar as espécies da fauna flebotomínica da Terra Indígena Wajãpi, estado do Amapá, utilizando a região do *Citocromo C Oxidase Subunidade I* (COI – DNA Barcode) do DNA mitocondrial.

#### **3. 2. ESPECÍFICOS**

- Contribuir para o conhecimento da diversidade biológica amazônica.
- Identificar as espécies de flebotomíneos da Terra Indígena Wajãpi com marcador padrão para código de barras de DNA (DNA Barcode);
- Testar a eficácia das regiões citadas do DNA mitocondrial para a identificação das espécies através das sequências obtidas;
- Elaborar o primeiro banco genético com DNA BARCODE de flebotomíneos do Amapá.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de Estudo

A Terra Indígena Wajãpi (FIGURA 14) foi demarcada pela FUNAI em 1996 (DOU, 24/05/96), encontra-se atualmente na fase regularizada do processo administrativo da FUNAI. O decreto 1.775 estabeleceu uma área de 607.017,204 hectares localizados na região centro-oeste do Amapá, cuja extensão corresponde a 4,23% do território amapaense, sua localização abrange parte dos municípios de Pedra Branca do Amapari e Laranjal do Jari, nos quais se localiza a maior parte de sua extensão (60%); as bacias dos rios Amapari (leste), rio Jari (oeste) e Oiapoque (norte) fazem sua delimitação geográfica (Galois 2011).

O relevo em sua maior parte segue o padrão amazônico de planícies, mas podemos encontrar áreas com relevo acidentado, visto que parte da TIW encontra-se inserido no Parque Nacional Montanhas do Tumucumaque. O clima da região é quente e úmido, predominante chuvoso (*Ami*) (Alvares et al. 2013) com períodos curtos secos apresentando temperatura média de 25 °C, concernente com o bioma predominante de floresta tropical densa; as clareiras geralmente resultam de explorações agrícolas, pecuária e exploração mineral que ocorrem na áreas próximas. Apresentando um alto índice de diversidade faunísticos e florístico, a região onde se localiza a TIW possui registros de mamíferos de grande porte como *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Leopardo wiedii*, *Tapirus terrestris*, *Mazama americana*, *Hidrocaerys hidrocaerys*; além de aves, répteis e anfíbios que demonstram um alto grau de diversidade e preservação da fauna (Lima 2008).

A população indígena atual da TIW é de aproximadamente de 1.000 pessoas, que se distribuem ao longo de 49 pequenas aldeia distribuídas em todo território demarcado. As aldeias são núcleos familiares que periodicamente são transferidas para que área nas quais são desenvolvidas atividades de subsistência como a agricultura, caça, pesca e coleta, possa se recuperar. Os grupo familiares ocupam três categorias espaciais: os lugares de concentração (aldeias, roças e habitações) (Figura 15); os lugares de dispersão e assentamentos intermitentes (acampamento de caça, pesca e coleta) e os sítios de ocupação, que funcionam como reservas

faunísticas (Galois 2011).

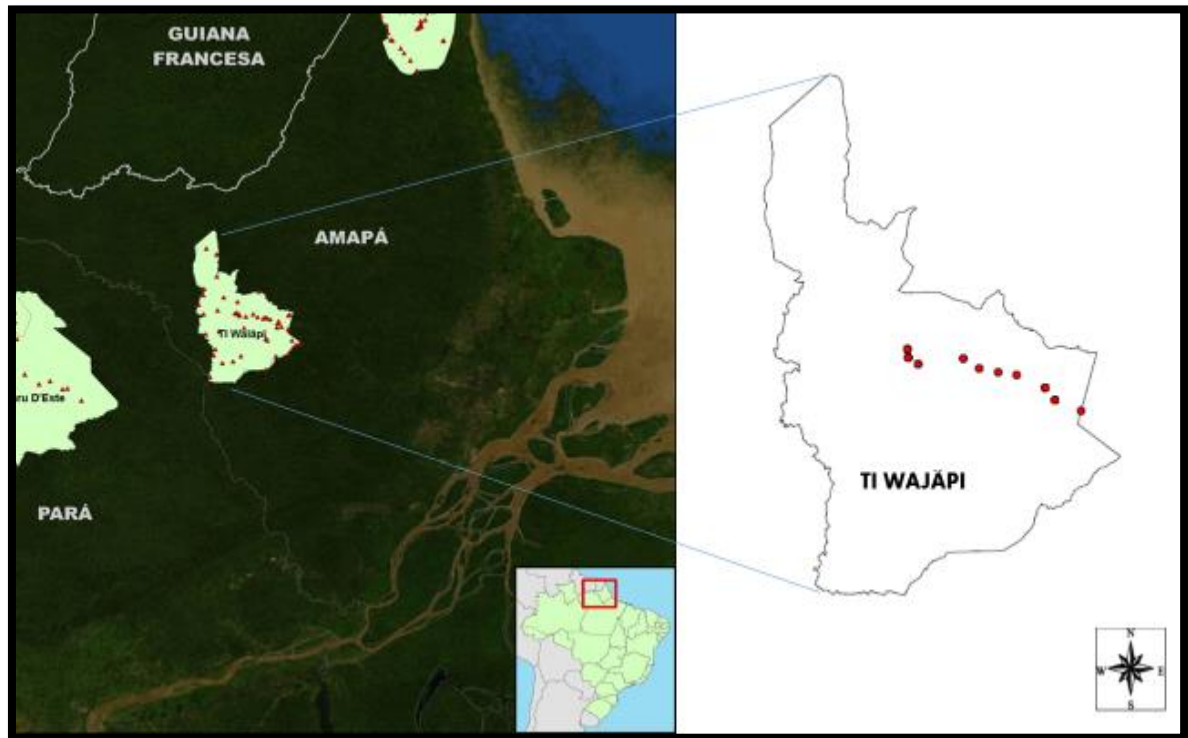


Figura 14 - Localização da TIW e aldeias amostradas nas coletas entomológicas no estado do Amapá. Fonte: adaptado de <http://www.portalbrasil.net>



Figura 15 - Habitação Wajãpi. Fonte: Freire, M.P. (2014)

## 4.2. Delineamento do Estudo

O projeto utilizou técnicas de taxonomia morfo-anatômica e taxonomia molecular de forma integrativa e a cadeia analítica empregada pode ser visualizada no fluxograma da Figura 16.

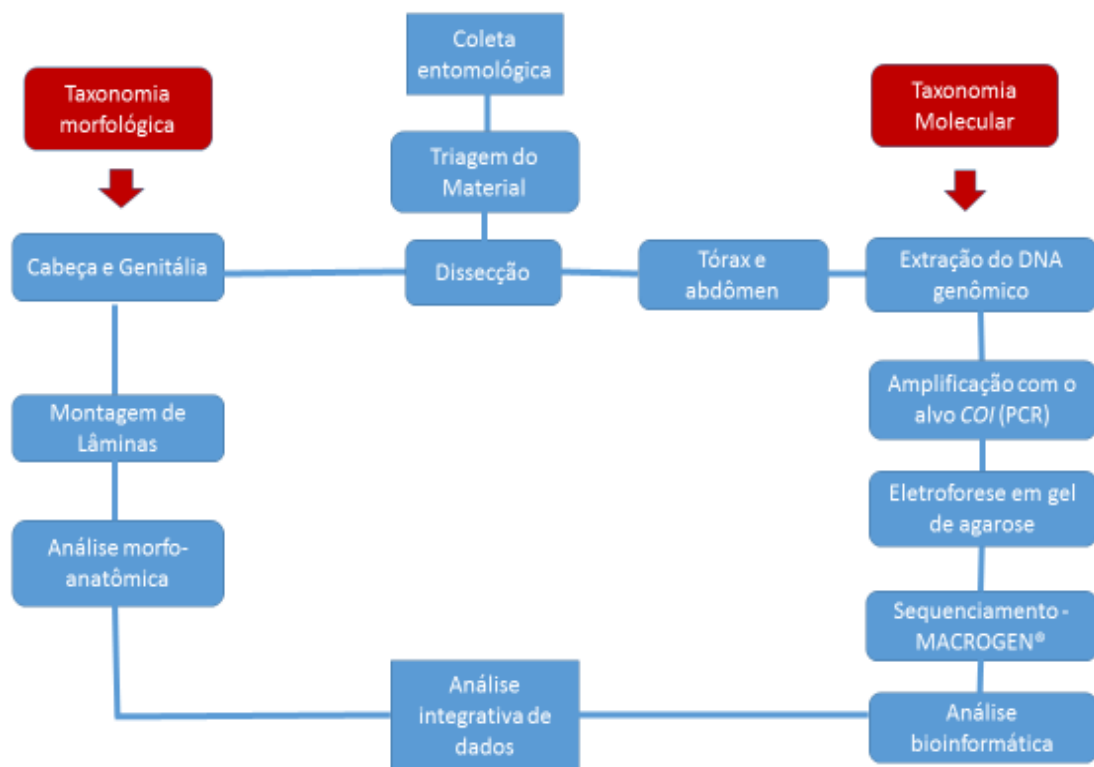


Figura 16 - Fluxograma da técnica utilizada na realização do trabalho.

### 4.2.1. Captura de flebotomíneos da Terra Indígena Wajãpi (TIW).

As coletas entomológicas foram realizadas durante as visitas dos pesquisadores ao TIW durante os meses de maio e setembro de 2013 e janeiro de 2014. As coletas fizeram parte das ações do projeto “Determinantes Sócio-Ambientais da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Wajãpi, Amapá”, e coincidiram com os meses chamados de *Mijarãkaa’rã* pelos indígenas, caracterizados por serem meses de fartura de caça (Galois 2011). As coletas foram

realizadas tendo as aldeias do TIW como unidades amostrais e distribuídas nos três planos amostrais delineados no território. A diretriz dos planos amostrais foram os números de casos de LTA registrados entre as aldeias entre os anos de 2012 e 2013, dessa forma 12 aldeias foram selecionadas como unidades amostrais fixas para as coletas entomológicas. A distribuição das aldeias pode ser observada na Figura 17.

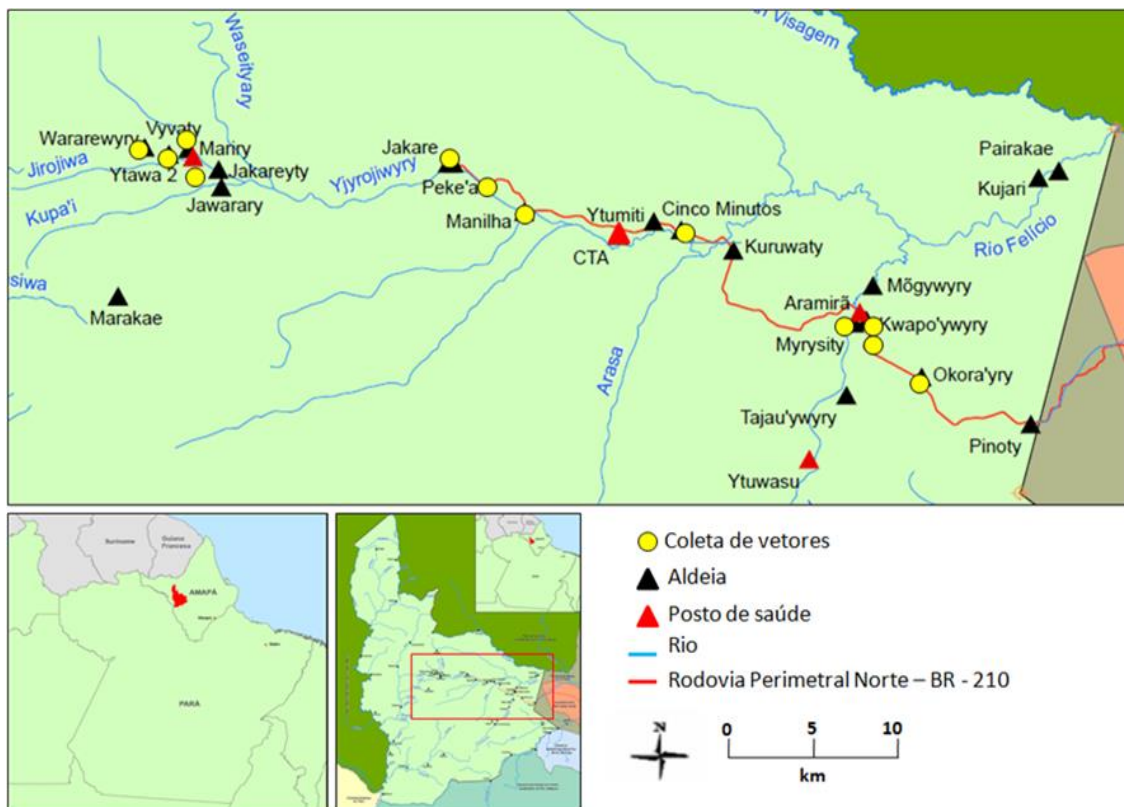


Figura 17 - Distribuição das aldeias com pontos de coleta na TIW. Fonte: adaptado de Gallois (2011).

Para a coleta de flebotomíneos foram instaladas em 12 aldeias (Tabela 5) armadilhas seguindo o seguinte padrão de distribuição espacial: ambientes de peri-aldeia, intra-aldeia e extra-aldeia (Figura 18). As armadilhas intra-aldeia foram colocadas nas moradias ou no pátio (espaço comunal), as peri-aldeia nos pontos de transição entre o pátio e a vegetação circundante, e as extra-aldeia dispostas com uma distância de 100 metros do pátio da aldeia; também foram instaladas de forma não sistemática armadilhas nas copas das árvores para fornecer dados sobre uma possível diferenciação de extratos de altura.

Na captura foram usadas armadilhas luminosas automáticas do tipo CDC, nas



quais a luz funciona como atrativo para os insetos. As armadilhas são compostas por um motor que gera um fluxo de ar mantido por quatro pilhas de 1,5 volts e uma gaiola de filó onde foram aprisionados os insetos atraídos pela luminosidade e conduzidos pelo fluxo constante de ar. As armadilhas funcionaram entre o período de 17:00 até as 06:00, sendo vistoriadas para a retirada do material coletado diariamente. Os insetos coletados foram armazenados em tubos do tipo Falcon (1,5 mL) com etanol 96° até a triagem dos espécimes de flebótomos nos laboratórios da UNIFAP (Artrolab) e da Unidade de Controle de Vetores (LACEN-AP).



Figura 18 - Registro fotográficos das armadilhas CDC das coletas realizados no período de 20 a 29 de maio de 2014 na TIW, estado do Amapá. As armadilhas foram dispostas no três ambientes em cada aldeia amostrada: Intra-aldeia, peri-aldeia e extra-aldeia no sentido

horário; e da retirada do material coletado e triagem inicial dos espécimes. Fonte: FREIRE, M.P. (2014).

Tabela 5 - Demonstra as regiões amostrais com suas respectivas aldeias e população.

<b>Região Amostral</b>	<b>Aldeias</b>	<b>População</b>
<b>1 - Aramirã</b>	Pinoty	22
	Okorayry	43
	Piauí	45
	Aramirã II	52
<b>2 – CTA</b>	Kuruaty	15
	Cinco minutos	44
	CTA	15
	Cachoeirinha	16
	Manilha	42
	Continental	20
	Jakaré	16
	Pikiá	18
	<b>3 - Mariry</b>	Mariry
Vivaty		15
Yvytötö		34
Boa Vista		22
Tapukakwerary		9
Ytawa		49
Urutuary		9
Wyrarewryry		8

### **4.3. Processamento dos flebotomíneos**

#### **4.3.1. Identificação morfo-anatômica: dissecação e montagem das lâminas**

Os espécimes foram processados individualmente no procedimento de dissecação para a montagem em lâminas e posterior análise microscópica e identificação molecular. Para o estudo taxonômico morfológico foram retiradas a cabeça e a terminália (últimos três segmentos abdominais) seguindo a montagem em líquido Berlese modificado (Langeron 1949) em lâmina e lamínula. O líquido Berlese promove a diafanização das estruturas internas facilitando a identificação anatômica. As estruturas de importância taxonômica observadas foram: terminália e cabeça montada em posição dorsal para os machos e espermatecas e cabeça montada em posição ventral para as fêmeas (para observação do cibário).

A identificação morfo-anatômica dos flebotomíneos foi realizada através de observação por microscopia ótica no laboratório do Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos (CRNIF) no Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), seguindo as chaves de identificação e a classificação proposta por Galati (2003), os registros das espécies seguem a abreviação proposta por Marcondes (2007).

#### **4.3.2. Identificação Molecular (COI)**

##### **Extração de DNA dos flebotomíneos**

As amostras dos espécimes preservadas em RNALater® (Life Technologies) a -20 °C foram submetidas à extração individual seguindo o protocolo do kit de extração de tecido e células Genra Puregene® da QIAGEN adaptado por Quaresma et al., (2011) para o protocolo de extração de DNA de flebotomíneos (individual e

pool de 10 fêmeas): o tórax e parte do abdômen de cada indivíduo foram processados com o auxílio de um macerador inicialmente com 50 µL de solução de lise celular e após a maceração foram adicionados 50 µL ainda de solução de lise completando o volume final para 100 µL. Seguiu-se a adição de 1 µL de proteinase K. Posteriormente a mistura foi homogeneizada por inversão dos tubos e incubadas no em banho-seco a 55 °C “overnight”. Após esse período foram adicionados 1 µL de RNase, homogeneizados por inversão e incubados por 30 min a 37 °C e após incubados no gelo por 1 min. A mistura foi adicionada 100 µL de solução de precipitação de proteínas. Os tubos foram vortexados vigorosamente por 20 segundos e centrifugados por cinco minutos a 16.000xg (14.000 rpm), formando um “pellet” do precipitado de proteínas. A fase aquosa foi transferida para novos tubos com 300 µL de isopropanol resfriado, sendo homogeneizados por inversão 50 vezes e centrifugados por 5 min em 16.000 Xg (14.000 rpm). Posteriormente o sobrenadante foi descartado, ficando apenas o precipitado (“pellet”) no tubo que foi mantido a temperatura ambiente para secar. O “pellet” que permaneceu na parede do tubo foi lavado com 300 µL de etanol 70% e 30 µL de acetado de sódio [3M] (10%) por inversão dos tubos. Após a incubação de 1h a -20 °C, os tubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm (16.000 X g) e o sobrenadante descartado para submeter o “pellet” a secagem em temperatura ambiente. Na etapa final, o pellet foi eluído com 30 µL de água DPEC (DNAse e RNAse-free) (Sigma-Aldrich) e incubado a 65 °C por 1 h para dissolver o DNA, que após esse período permaneceu a temperatura ambiente “overnight” para a posterior estocagem em freezer à temperatura de -20 °C.

### **Quantificação do DNA extraído**

Após a extração, o DNA das amostras foi dosado para averiguar a qualidade e concentração do material resultante. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro de microvolume Nanadrop®1000 (Thermo Fisher Scientific). Para a detecção dos ácidos nucleicos, o espectro de luz foi ajustado de acordo com as recomendações do fabricante para 260 e 280 nanômetros. Na averiguação da pureza do material, a razão de 260nm/280nm na absorbância é utilizada aceitando os valores entre 1,4 e 1,8; valores menores podem indicar a presença de proteínas ou contaminantes do procedimento de extração.



### Amplificação do alvo *COI* (DNA BARCODE)

As amostras de DNA dos flebótomos foram submetidas à amplificação em reação de cadeia de polimerase (PCR – Polymactioerase Chain Reaction) direcionado ao alvo *COI* (citocromo oxidase subunidade 1) do DNA mitocondrial. Para isso, foram usados os primers escritos por Folmer *et. al.* (1994): primer senso LCO 1490 e anti-senso HCO 2198. Iniciadores que amplificam uma região de aproximadamente de 710 pb (Tabela 6). A reação foi polimerizada com a enzima PlatinumTaq™ DNA Polymerase (Invitrogen), reagentes e concentrações na Tabela 7, reação realizada no termociclador Eppendorf; seguindo os ciclos de reação seguiram as condições descritas na Tabela 8.

Tabela 6 - Iniciadores utilizados para amplificação do alvo *COI*

Primers	Sequência
<b>LCO 1490</b>	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'
<b>HCO 2198</b>	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

Tabela 7 - Reagentes utilizados para a reação de amplificação do alvo *COI*:

Reagentes	Concentração	Volume
<b>Iniciador LCO</b>	2 mM	5 µL
<b>Iniciador HCO</b>	2 mM	5 µL
<b>Buffer Taq</b>	10x	5 µL

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 mM	2 µL
<b>dNTPs</b>	2 mM	5 µL
<b>PlatinumTaq™</b>	5 u/µL	2 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	23 µL
<b>DNA</b>	-	3 µL
<b>Volume final</b>		<b>50 µL</b>

Tabela 8 - Condições da PCR para o alvo COI

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	94 °C	2:00 min
<b>Desnaturação</b>	94 °C	1:00 min
<b>Anelamento</b>	55 °C	1:00 min
<b>Extensão</b>	72 °C	1:00 min
<b>Extensão final</b>	72 °C	10:00 min

### **Eletroforese em gel de agarose**

No intuito de avaliar o resultado da PCR para o alvo *COI*, os produtos foram visualizados em gel de agarose [1%] preparado com: 0,84 de agarose, diluída em 0,84 mL de TBE 1X e corados com 7 µL de brometo de etídio

### **Sequenciamento dos produtos da PCR**

A purificação dos produtos e sequenciamento foram realizados na sede da empresa MACROGEN localizada em Seoul, Coréia do Norte. Os produtos da PCR foram purificados usando o kit Milipore plate MSNU030 (Milipore SAS, Molsheim, França) e posteriormente sequenciados pelo método Sanger utilizando o Kit BigDye terminator v3.1 no sequenciador automático Applied Biosystems 3739xl DNA Analyzer.

### **Montagem e análises das sequências**

As sequências obtidas tiveram seus eletroferogramas em formato ABI conferidos no programa FinchTV v1.4 (Geospiza) através de análise visual para conferir a qualidade do sequenciamento. Posteriormente as sequências “Forward” e “Reverse” de cada espécime foram alinhadas no programa SeqTrace0.9 (Stucky 2012) para produzir as sequências consenso.

Todas as sequências consenso foram comparadas com sequências existentes no banco de dados genético GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do algoritmo BlastN para verificar o posicionamento taxônomico das mesmas e gerar um banco de dados com as sequências correlatas já depositadas no Genbank. As sequências foram conferidas, editadas com a retirada dos iniciadores e alinhadas no programa MEGA6 (Tamura et al. 2013).

### **Árvores de NJ e MV**

Para a análise das relações evolutivas entre os indivíduos foi construída árvores de Neighbour-Joining e Máxima Verossimilhança. O método de agrupamento de vizinhos (Neighbour joining) utilizando o modelo Kimura2parameter (k2P) para a correção de distâncias nucleotídicas, e a confiabilidade do nó mensurado pelo “bootstrap”. As árvores de Máxima verossimilhança (MV) são construídas para verificação de uma hipótese mais aproximada da real história evolutiva, pois se baseia em métodos evolutivos explícitos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. COLETA E ESTUDO DESCRITIVO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA

A coleta entomológica na TIW no estado do Amapá resultou num total de 1.277 flebotomíneos, que após serem dissecados e montados em lâminas passaram por identificação morfo-anatômica seguindo a classificação proposta por Galati (1995) que revelaram os seguintes dados: os espécimes capturados pertencem a quatro subtribos, *Brumptomyiina*, *Lutzomyiina*, *Psychodopygina* e *Sergentomyiina*. Do total de espécimes coletados 811 (63,5%) foram fêmeas e 466 (36,4%) machos resultando uma razão de 1,74 como demonstra a Tabela 9, que elenca também o número de flebotomíneos coletados por espécie. Foram identificados 40 espécies pertencentes a 15 gêneros (Figura 19): *Bichromomyia*, *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Pressatia*, *Psathyromyia*, *Psychodopygus*, *Trichopygomyia*, *Trichophoromyia*, *Sciopemyia* e *Viannamyia*.

As espécies identificadas foram: *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira,1942), *Evandromyia andersoni* (Le pont & Desjeux,1988), *Evandromyia bacula* (Martins, Falcão & Silva,1965), *Evandromyia brachyphalla* (Mangabeira,1941), *Evandromyia infraspinosa* (Mangabeira,1941), *Evandromyia monstrosa* (Floch & Abonnenc,1944), *Evandromyia pinotti* (Damasceno e Arouk,1956), *Micropygomyia* sp. (série pilosa) (Damasceno & Causey,1965), *Micropygomyia rorotaensis* (Floch e Abonnenc,1944), *Migonemyia bursiformis* (Floch & Abonnec, 1944), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia antunesi* (Coutinho, 1939), *Nyssomyia yuilli pajoti* (Abonnenc, Léger& Fauran 1979), *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977), *Pintomyia damascenoi* (Mangabeira, 1941), *Pressatia trispinosa* (Mangabeira, 1942), *Psathyromyia aragoi* (Costa Lima, 1932), *Psychodopygus complexus* (Mangabeira, 1941), *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929), *Psathyromyia dendrophylla* (Mangabeira, 1942), *Psathyromyia dreisbachi* (Causey & Damasceno, 1945), *Psathyromyia inflata* (Floch & Abonnenc, 1944), *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932), *Psathyromyia pradobarrientosi* (Le

Pont, Matias, Martinez & Dujardin, 2004), *Psychodopygus claustris* (Abonnenc, Léger & Fauran, 1979), *Psychodopygus corossoniensis* (Le Pont & Pajot, 1978), *Psychodopygus davisi* (Root, 1934), *Psychodopygus geniculatus* (Mangabeira, 1941), *Psychodopygus hirsutus* (Mangabeira, 1942), *Psychodopygus maripaensis* (Floch & Abonnenc, 1946), *Psychodopygus paraensis* (Costa Lima, 1941), *Psychodopygus squamiventris* (Lutz & Neiva, 1912), *Sciopemyia fluviatilis* (Floch & Abonnenc, 1944), *Sciopemyia sordelli* (Shannon & Del Ponte, 1927), *Trichophoromyia ubiquitalis* (Mangabeira, 1942), *Trichophoromyia brachipyga* (Mangabeira, 1942), *Trichophoromyia ininnii* (Floch & Abonnenc, 1943), *Trichopygomyia depaquitii* (Gantier, Gaborit & Rabarison, 2006), *Trichopygomyia trichopyga* (Floch & Abonnenc, 1945), *Micropygomyia rorotaensis* (Floch & Abonnenc, 1944), *Vianamyia furcata* (Mangabeira, 1941) e *Vianamyia tuberculata* (Mangabeira, 1941).

Os flebotomíneos são dípteros pequenos e suscetíveis à manipulação, dessa forma alguns indivíduos foram identificados apenas até o nível de gênero 290 (22,7%) devido: i. a perda de estruturas morfológicas durante a coleta, triagem, preparação e/ou montagem das lâminas microscópicas; ii. espécies em que um dos sexos nunca foi descrito ou, iii. as fêmeas são indistinguíveis. Em um total de 17 (1,3%) indivíduos as perdas de estruturas morfológicas impossibilitaram totalmente a identificação.

Tabela 9 - Flebotomíneos coletados na Terra Indígena Wajãpi, estado do Amapá, em maio de 2013.

Epíteto genérico	Epíteto específico	FÊMEAS	%	MACHOS	(%)	TOTAL	(%)
<i>Bichromomyia</i>	<i>flaviscutellata</i>	32	2,5	14	1,0	46	3,6
<i>Evandromyia</i>	<i>andersoni</i>	7	0,5	4	0,3	11	0,8
<i>Evandromyia</i>	<i>bacula</i>	1	0,0	-	0	1	0,0
<i>Evandromyia</i>	<i>brachyphalla</i>	21	1,6	3	0,2	24	1,8
<i>Evandromyia</i>	<i>infraspinosa</i>	8	0,6	11	0,8	19	1,4
<i>Evandromyia</i>	<i>monstruosa</i>	13	1,0	-	0	13	1,0
<i>Evandromyia</i>	<i>pinotti</i>	2	0,1	-	0	2	0,1
<i>Micropygomyia</i>	<i>rorotaensis</i>	6	0,4	-	0	6	0,4
<i>Micropygomyia</i>	série pilosa	4	0,3	-	0	4	0,31
<i>Migonemyia</i>	<i>bursiformis</i>	1	0,0	-	0	1	0,0
<i>Migonemyia</i>	<i>migonei</i>	10	0,7	-	0	10	0,7
<i>Nyssomyia</i>	<i>antunesi</i>	6	0,4	-	0	6	0,4
<i>Nyssomyia</i>	<i>yuilli pajoti</i>	92	7,2	6	0,4	98	7,6
<i>Nyssomyia</i>	<i>umbratilis</i>	73	5,7	5	0,3	78	6,1
<i>Pintomyia</i>	<i>damascenoi</i>	1	0,0	-	0	1	0,0
<i>Pressatia</i>	<i>trispininosa</i>	-	0,0	1	0,0	1	0,0
<i>Psathyromyia</i>	<i>aragoi</i>	4	0,3	1	0,0	5	0,3
<i>Psathyromyia</i>	complexo shannoni	1	0,0	-	0	1	0,0
<i>Psathyromyia</i>	<i>dendrophyla</i>	-	0	1	0,0	1	0,0
<i>Psathyromyia</i>	<i>dreisbachi</i>	85	6,6	51	3,9	136	10,6
<i>Psathyromyia</i>	<i>inflata</i>	5	0,3	11	0,8	16	1,2
<i>Psathyromyia</i>	<i>lutziana</i>	2	0,1	-	0	2	0,1
<i>Psathyromyia</i>	<i>pradobarrientosi</i>	1	0,0	-	0	1	0,0
<i>Psychodopygus</i>	<i>claustris</i>	2	0,1	2	0,1	4	0,3
<i>Psychodopygus</i>	<i>corossoniensis</i>	5	0,3	-	0	5	0,3
<i>Psychodopygus</i>	<i>davisi</i>	24	1,8	3	0,2	27	2,1
<i>Psychodopygus</i>	<i>geniculatus</i>	17	1,3	14	1,0	31	2,4
<i>Psychodopygus</i>	<i>hirsutus</i>	1	0,0	-	0	1	0,0
<i>Psychodopygus</i>	<i>maripaensis</i>	1	0,0	-	0	1	0,0
<i>Psychodopygus</i>	<i>paraensis</i>	4	0,3	-	0	4	0,3
<i>Psychodopygus</i>	<i>squamiventris</i>	4	0,3	-	0	4	0,3
<i>Sciopemyia</i>	<i>fluviatilis</i>	4	0,3	-	0	4	0,3
<i>Sciopemyia</i>	<i>sordelli</i>	35	2,7	8	0,6	43	3,3
<i>Trichophoromyia</i>	<i>ubiquitalis</i>	31	2,4	68	5,3	99	7,7
<i>Trichophoromyia</i>	<i>brachipyga</i>	-	0	147	11,5	147	11,5
<i>Trichophoromyia</i>	<i>ininnii</i>	-	0	2	0,1	2	0,1
<i>Trichopygomyia</i>	<i>depaquiti</i>	-	0	2	0,1	2	0,1
<i>Trichopygomyia</i>	<i>trichopyga</i>	1	0,0	106	8,3	107	8,3
<i>Vianamyia</i>	<i>furcata</i>	4	0,3	-	0,0	4	0,3
<i>Vianamyia</i>	<i>tuberculata</i>	2	0,1	-	0,0	2	0,1

-----	sp.	288	22,5	2	0,1	290	22,7
<b>Sem identificação</b>		13	1,0	4	0,3	17	1,3
<b>Total</b>		<b>811</b>	<b>63,5%</b>	<b>466</b>	<b>36,4%</b>	<b>1.277</b>	<b>100%</b>

Os gêneros com maior representação (FIGURA 17) foram *Trichophoromyia* com 467 (37,0%) espécimes, *Nyssomyia* com 190 (15,1%) e *Psathyromyia* com 169 (13,4%). A espécie *Th. brachipyga* foi a mais abundante na amostragem da coleta correspondendo a um total de 177 (11,5%) indivíduos, seguida da espécie *Pa. dreisbachi* com 136 (10,6%) e *Ty. trichopyga* que totalizou 107 (8,3%) espécimes. As espécies que foram identificadas somente até o nível de gênero (sp.) somaram 290 (22,7%), e o conjunto de todas as outras espécies foi de 567 que correspondem ao total de 46,9% (FIGURA 19). As espécies *Ev. andersoni*, *Ev. bacula*, *Ev. pinottii*, *Mg. bursiformis*, *Pa. pradobarrentosi*, *Ps. corossonienseis* foram registradas pela primeira vez no estado do Amapá e a espécie *Ty. depaquiti* foi registrada pela primeira vez no Brasil, esta espécie era apenas conhecida da localidade-tipo na Guiana Francesa (Gantier et al. 2006).

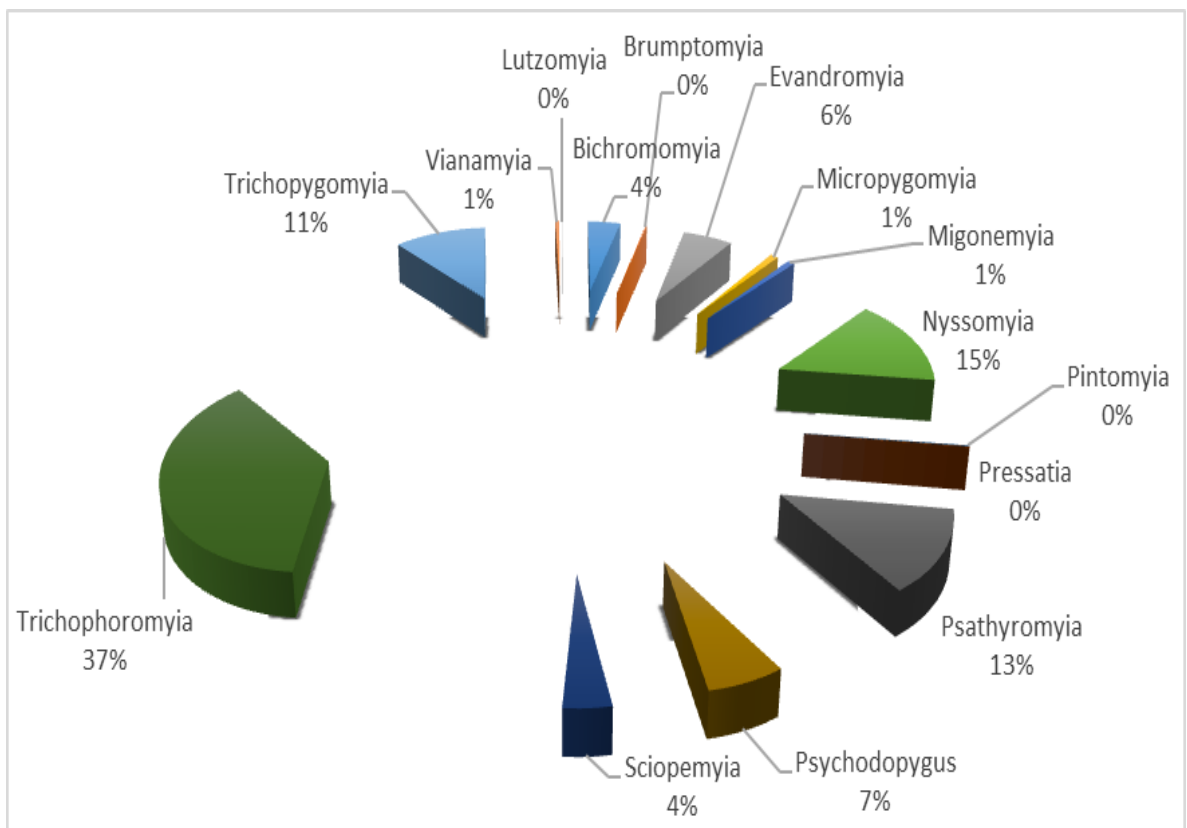


Figura 19 - Gêneros coletados na Terra Indígena Wajãpi, estado do Amapá, em maio de 2013.

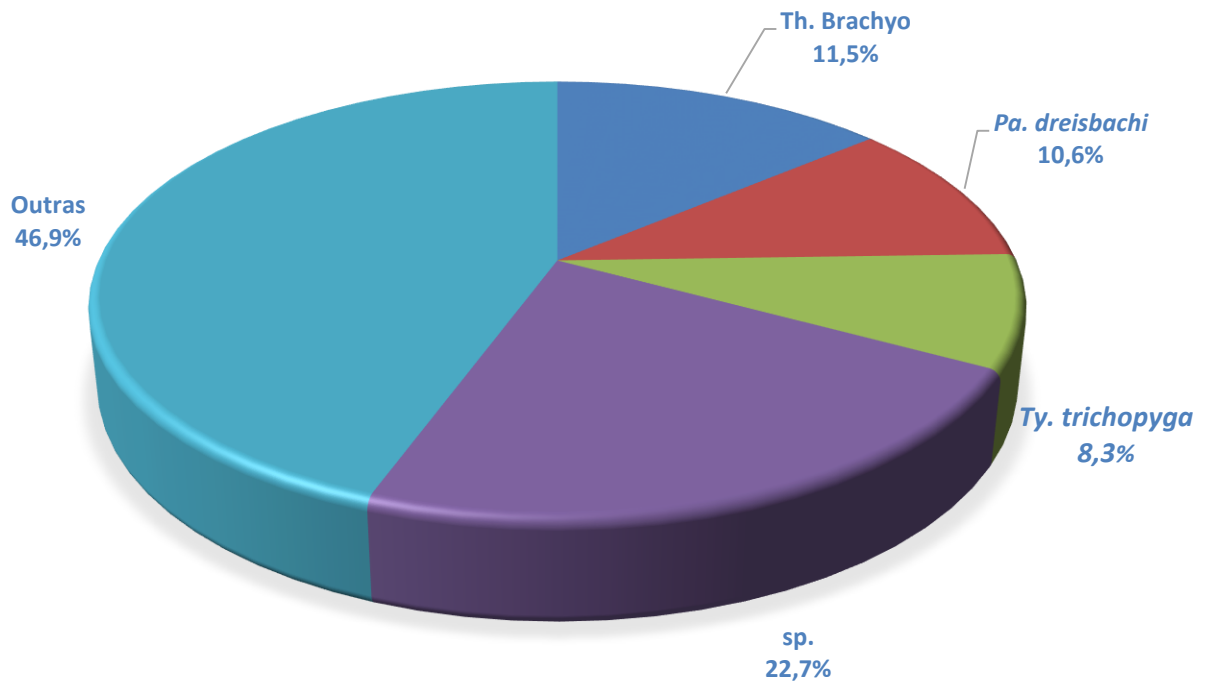


Figura 20 - Espécies mais abundantes coletadas na Terra Indígena Wajãpi, estado do Amapá, em maio de 2013. Soma das espécies identificadas até o nível de gênero e total das outras espécies amostradas.

## 5.2. Dados Moleculares

### 5.2.1. Extração de DNA e armazenamento do material testemunho.

Após a identificação anato-morfológica dos espécimes foram separadas as amostras correspondentes destinadas a análise molecular e selecionadas de acordo com a espécie previamente identificada. Foram utilizadas 249 mostras para a extração de DNA genômico com amostras representativas de todas as espécies coletadas e dos espécimes que foram identificados até o nível de gênero. O material testemunha de cada espécime está depositado no Centro Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos (CRNIF) na FIOCRUZ- MINAS.



A extração do DNA genômico foi realizado de forma satisfatória nas amostras selecionados com concentrações aferidas por espectrofotometria variando entre 1,75 e 1,8 na razão de 260/280nm.

### 5.2.2. Amplificação e sequenciamento

As 249 amostras de DNA genômico extraídos passaram por PCR para a amplificação do alvo *COI*, sendo posteriormente analisados em eletroforese em gel de agarose (figuras 21, 22 e 23), um total de 44 amostras foram amplificadas atingindo o nível esperado de ~650 até 700pb para o alvo *COI* e em 205 amostras não foi possível a obtenção de produto da PCR (amplicons).

As 44 amostras amplificadas (TABELA 15) foram enviadas para sequenciamento na sede da empresa MACROGEN e destas 41 obtiveram sucesso no sequenciamento, as demais mesmo após resequenciamento não atingiram o nível de qualidade confiável para entrar na análise e foram descartadas. Na análise dos eletroferogramas foi possível constatar a boa qualidade de definição dos picos, o que exclui possíveis presenças de pseudogenes.

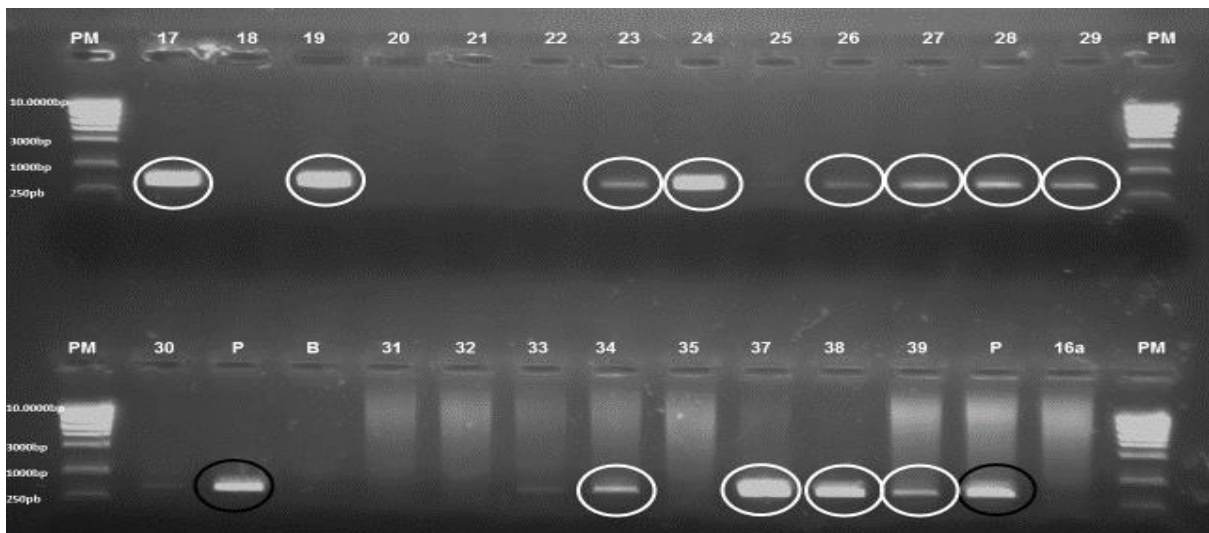


Figura 21 - Confirmação em gel de agarose [1%] para a amplificação do alvo *COI*. 12 amostras apresentaram bandas compatíveis com o alvo: 17 – *Pa. inflata*, 19 – *Th. ubiquitousalis*, 23 – *Ny. yuilli pajoti*, 24 – *Ny. sp.*, 26 – *Ny. yuilli pajoti*, 27 – *Pa. sp.*, 28 – *Pa. sp.*, 29 – *Pr. Trispinosa*, 34 – *Pa. infalta*, 37 – *Mi. série pilosa*, 38 – *Mi. rorotaensis* e 39 – *Ps. geniculatus*. PM – Marcador molecular, P – controle positivo e B – branco da reação.

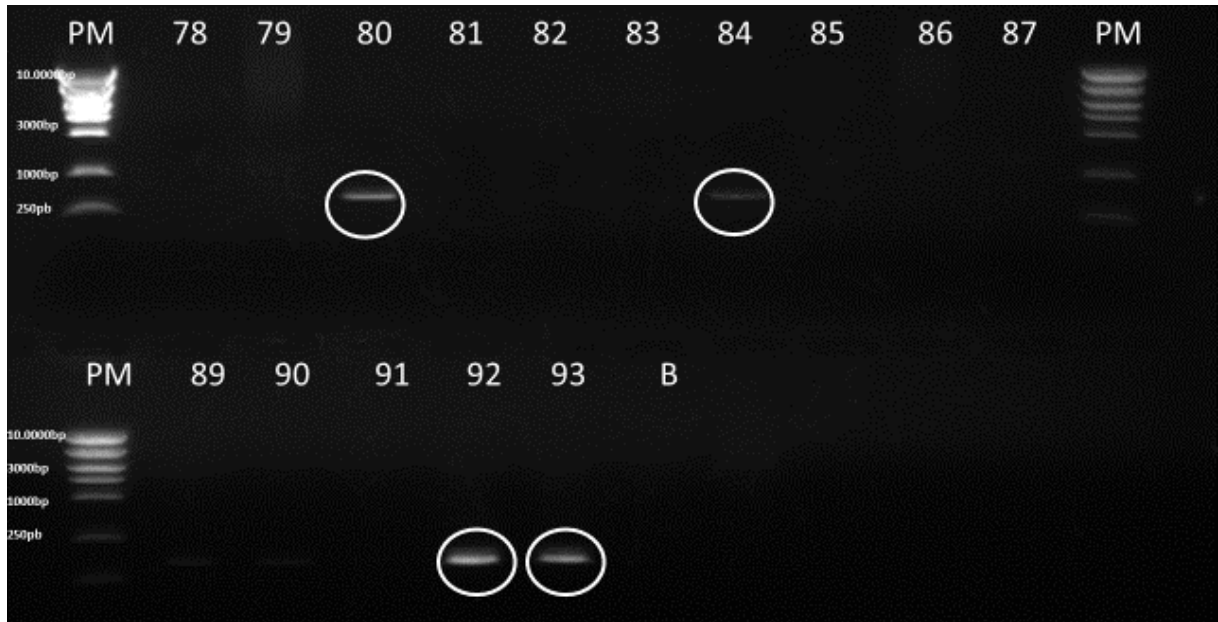


Figura 22 - Confirmação em gel de agarose [1%] para a amplificação do alvo COI. Quatro amostras apresentaram bandas compatíveis com o alvo COI: 80 – *Pa. dreisbachi*, 84 – *Pa. dreisbachi*, 92 – *Ny. yuilli pajoti* e 93 – *Ps. série squamiventris*. PM – Marcador molecular e B – Branco da reação.



Figura 23 - Confirmação em gel de agarose [1%] para a amplificação do alvo COI . Cinco amostras apresentaram bandas compatíveis com o alvo: 111 – *Th. sp.*, 114 – *Ny. yuilli pajoti*, 120 – *Th. sp.*, 122 – *Pa. dreisbachi* e 123 – *Pa. inflata*. PM – Marcador molecular e B – branco da reação.

Um total de 34 sequências consenso (contigs) foram obtidas com qualidade suficiente para serem alinhadas (ANEXO I) e utilizadas nas análises de neighbour-joining (NJ) e máxima verossimilhança (ML).

O alinhamento das sequências pela implementação do algoritmo ClustalW no programa MEGA permitiu gerar um arquivo com 581 pares de base. A partir do alinhamento calculou-se a composição de bases por espécie e a distância genética entre as sequências (pairwise genetic distance) (ANEXO II). Também foram produzidas árvores de neighbour-joining (NJ) e máxima verossimilhança (ML).

Tabela 10 – Comparativo entre a identificação morfo-anatômica e o resultado do hit blast para cada sequência correspondente.

ID. AMOSTRA	ID. TAXONÔMICA	SEXO	HIT BLAST	N. ACESSO BLAST	Similaridade (%)	Query coverage (%)
1	<i>Ny. yuilli pajoti</i>	F	<i>Lutzomyia antunesi</i>	JN845549	97	82
			<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	KC921323	96	100
5	<i>Sc. sordelli</i>	F	<i>Lutzomyia nunez-tovari</i>	AB984471	89	100
			<i>Lutzomyia migonei</i>	GU909508	89	100
			<i>Lutzomyia sordellii</i>	KC921298	88	100
6	<i>Th. sp.</i>	F	<i>Psychodopygus panamensis</i>	KC921263.	90	98
8	<i>Th. brachipyga</i>	M	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467597	89	96
			<i>Lutzomyia panamensis</i>	GU909460	89	99
			<i>Lutzomyia reburra</i>	KC921282	87	99
9	<i>Ps. sp.</i>	M	<i>Lutzomyia guyanensis</i>	GU001736	96	84
			<i>Psychodopygus panamensis</i>	KC921266	89	100
15	<i>Sc. sordelli</i>	M	<i>Lutzomyia castanea</i>	AB984423	88	92
			<i>Lutzomyia micropyga</i>	GU909466	88	97
			<i>Lutzomyia migonei</i>	GU909508	88	97
17	<i>Pa. inflata</i>	F	<i>Lutzomyia panamensis</i>	GU909461	90	99
			<i>Psychodopygus panamensis</i>	KC921264	89	100
19	<i>Th. ubiquitous</i>	M	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467591	90	97
			<i>Lutzomyia panamensis</i>	GU909460	90	100
23	<i>Ny. yuilli pajoti</i>	F	<i>Lutzomyia antunesi</i>	JN845549	97	79
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	KP702938	97	99
24	<i>Ny. sp.</i>	F	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467591	90	96
			<i>Psychodopygus panamensis</i>	KC921263	89	100
26	<i>Ny. yuilli pajoti</i>	M	<i>Lutzomyia antunesi</i>	JN845549	98	79
			<i>Lutzomyia umbratilis</i>	KF467554	97	96
			<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	KC921323	97	100
27	<i>Pa. sp.</i>	M	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467591	90	95
			<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	KC921323	90	100
28	<i>Pa. sp.</i>	F	<i>Psychodopygus panamensis</i>	KC921263	91	100
			<i>Lutzomyia shannoni</i>	JQ769141	87	100
29	<i>Pr. trispinosa</i>	M	<i>Lutzomyia camposi</i>	GU001726	94	80
			<i>Lutzomyia youngi</i>	KC921327	89	100
37	<i>Mi. série pilosa</i>	F	<i>Lutzomyia nunez-tovari</i>	AB984471	89	95
			<i>Phlebotomus perniciosus</i>	JN036800	88	100
38	<i>Mi. rorotaensis</i>	F	<i>Lutzomyia venezuelensis</i>	GU909484	88	100
41	<i>Th. ubiquitous</i>	F	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KC921283	90	97
			<i>Lutzomyia reburra</i>	KC921283	89	100
42	<i>Th. sp.</i>	F	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467591	90	97
			<i>Lutzomyia panamensis</i>	GU909460	90	100
44	<i>Ny. antunesi</i>	F	<i>Lutzomyia antunesi</i>	JN845549	99	81
			<i>Lutzomyia umbratilis</i>	KF467553	98	98
			<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	KC921323	97	100
45	<i>Th. brachipyga</i>	M	<i>Brumptomyia mesai</i>	GU909506	88	100

			<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467595	87	97
<b>46</b>	<i>Sc. Sordelli</i>	F	<i>Lutzomyia migonei</i>	GU909508	89	98
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	KP702938	89	100
			<i>Lutzomyia sordellii</i>	KC921298	89	99
<b>68</b>	<i>Th. sp</i>	F	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467591	91	99
<b>80</b>	<i>Pa. dreisbachi</i>	F	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	KF467557	88	99
<b>84</b>	<i>Pa. dreisbachi</i>	F	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	KF467557	88	99
<b>89</b>	<i>Ps. paraensis</i>	F	<i>Lutzomyia carrerai thula</i>	KC921240	89	99
			<i>Lutzomyia umbratilis</i>	KF467559	90	98
<b>92</b>	<i>Ny. yuilli pajoti</i>	F	<i>Lutzomyia guyanensis</i>	GU001736	97	83
			<i>Lutzomyia panamensis</i>	GU909463	91	99
<b>114</b>	<i>Ny. yuilli pajoti</i>	F	<i>Lutzomyia antunesi</i>	JN845549	98	83
			<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	KC921323	97	100
<b>120</b>	<i>Th. sp</i>	F	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467593	90	97
			<i>Lutzomyia panamensis</i>	GU909461	90	100
			<i>Lutzomyia reburra</i>	KC921283	88	100
<b>122</b>	<i>Pa. dreisbachi</i>	F	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	KP702938	88	100
<b>123</b>	<i>Pa. inflata</i>	F	<i>Lutzomyia panamensis</i>	GU909460	90	99
			<i>Lutzomyia shannoni</i>	KC755387	88	100
<b>124</b>	<i>Pa. dreisbachi</i>	F	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	KF467557	88	100
<b>129</b>	<i>Th. ubiquitous</i>	F	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	KF467559	90	100
<b>130</b>	<i>Th. sp (dut. Ind. longos)</i>	F	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467597	90	98
<b>131</b>	<i>Th. sp (dut. Ind. curtos)</i>	F	<i>Lutzomyia anduzei</i>	KF467597	90	97

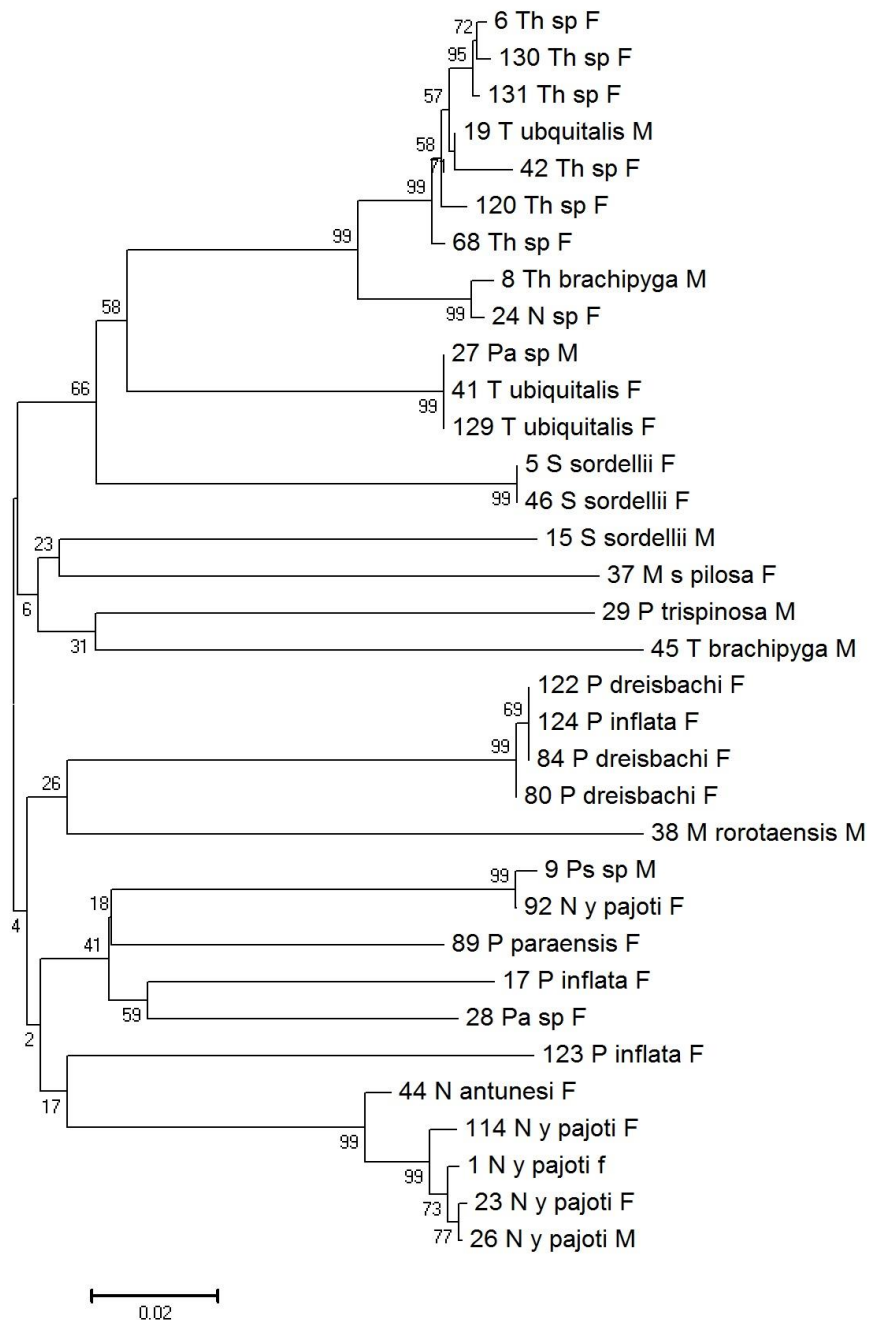


Figura 24 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbour-Joining. A árvore original com a soma dos comprimentos de ramos = 1.14710603 é mostrado. Valores de bootstrap (500 réplicas) são mostrados ao lado dos ramos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos dos ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura 2 parâmetros e são mostradas em relação às unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 565 posições no conjunto de dados final. Análises foram realizadas no MEGA6.

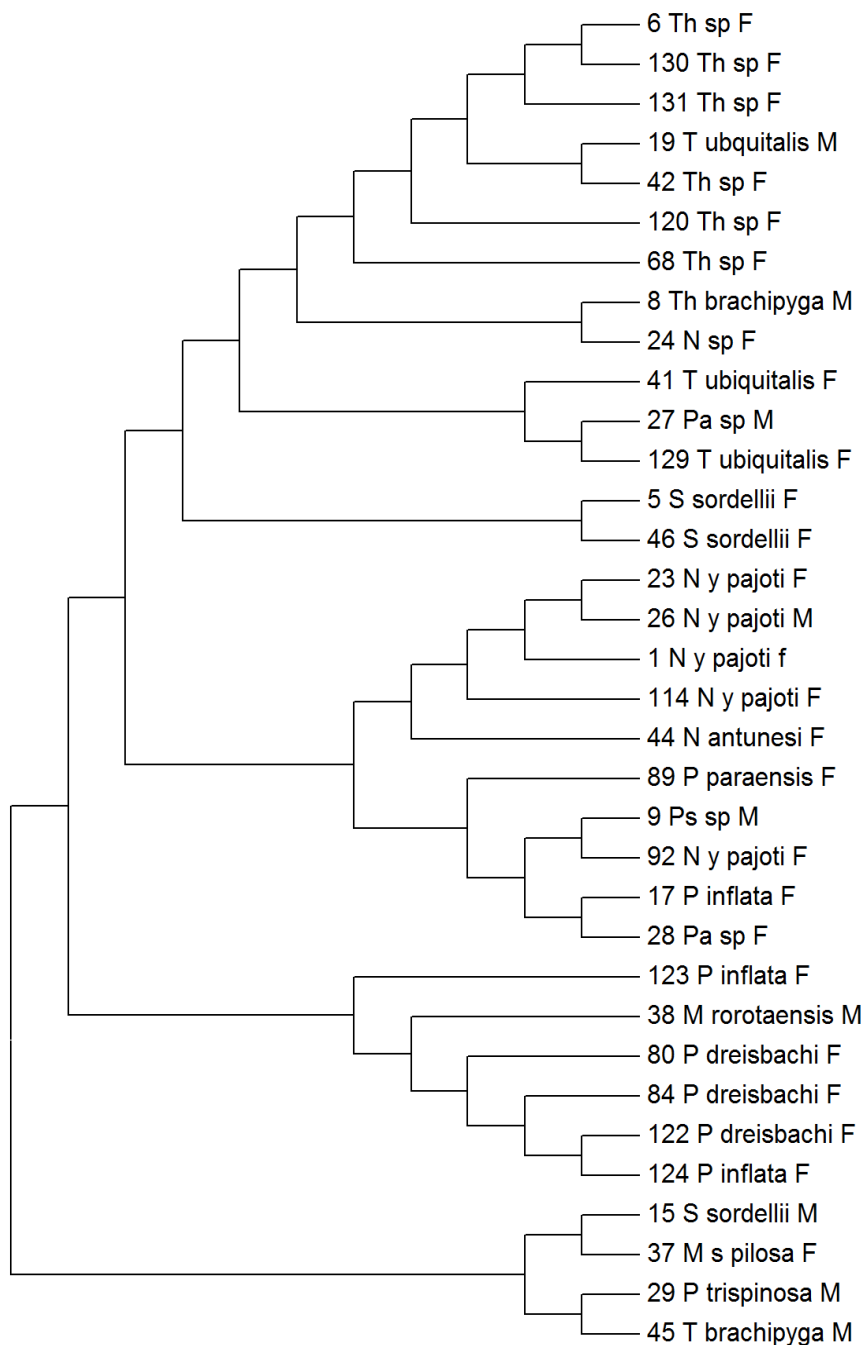


Figura 25 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining . A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 500 réplicas é uma representação da história evolutiva dos táxons analisados. A análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 565 posições no conjunto de dados final. Evolutionary análises foram realizadas no MEGA6.

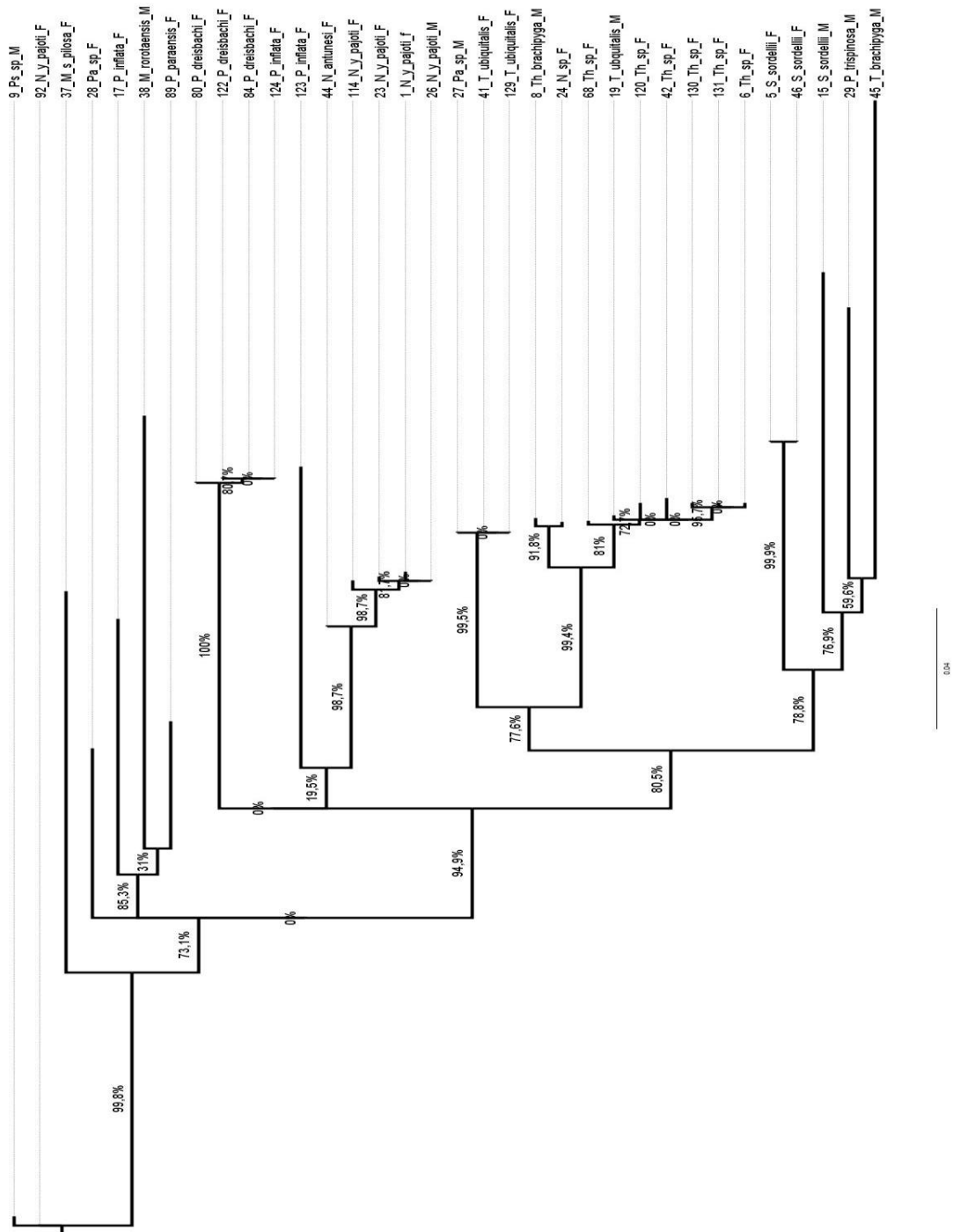


Figura 26 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de máxima verossimilhança. A árvore foi inferida a partir do modelo GTR, selecionado pelo programa JmodelTest, e o suporte dos ramos a partir do método aLRT, é uma representação da história evolutiva dos táxons analisados [2]. A análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 565 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no PHYML



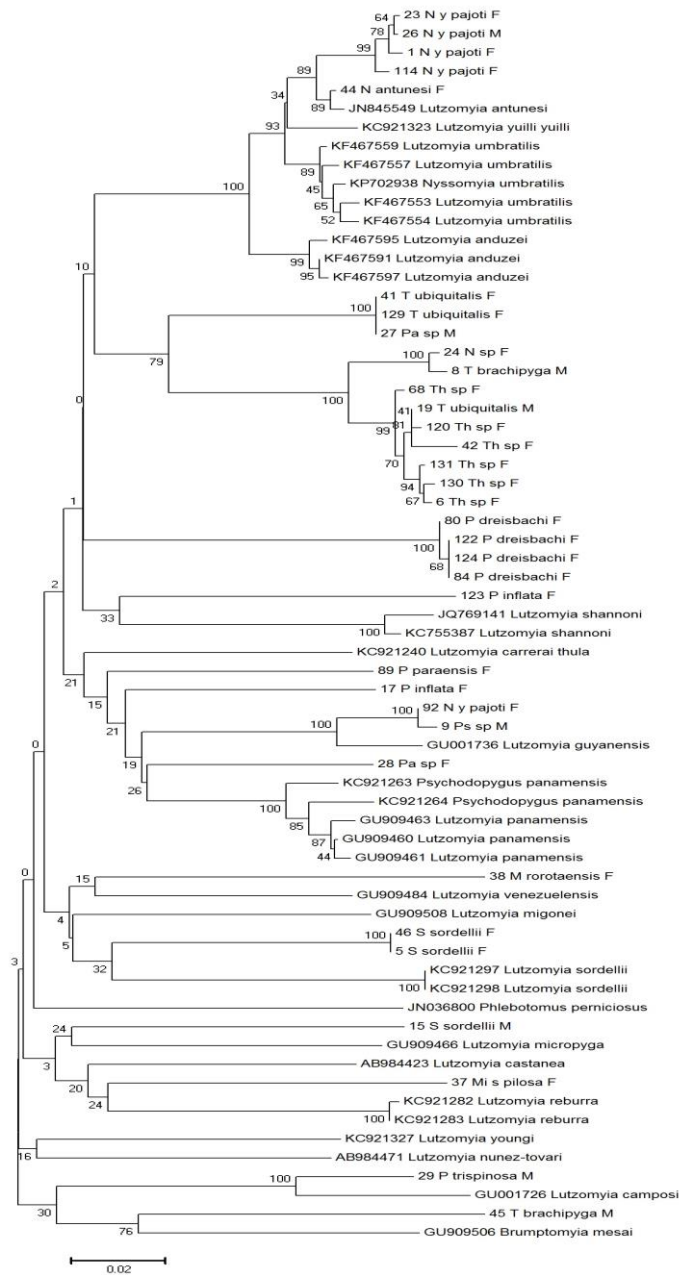


Figura 27 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma de comprimento ramo = 2.10843054 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que a taxa associada agrupados no teste de inicialização (500 réplicas) são mostrados ao lado dos ramos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos dos ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculados usando o método Probabilidade Composição máxima e estão em unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu 66 sequências de nucleotídeos. Posições de codões incluídos foram 1ª + 2 + 3 + não-codificante. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 518 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA6.

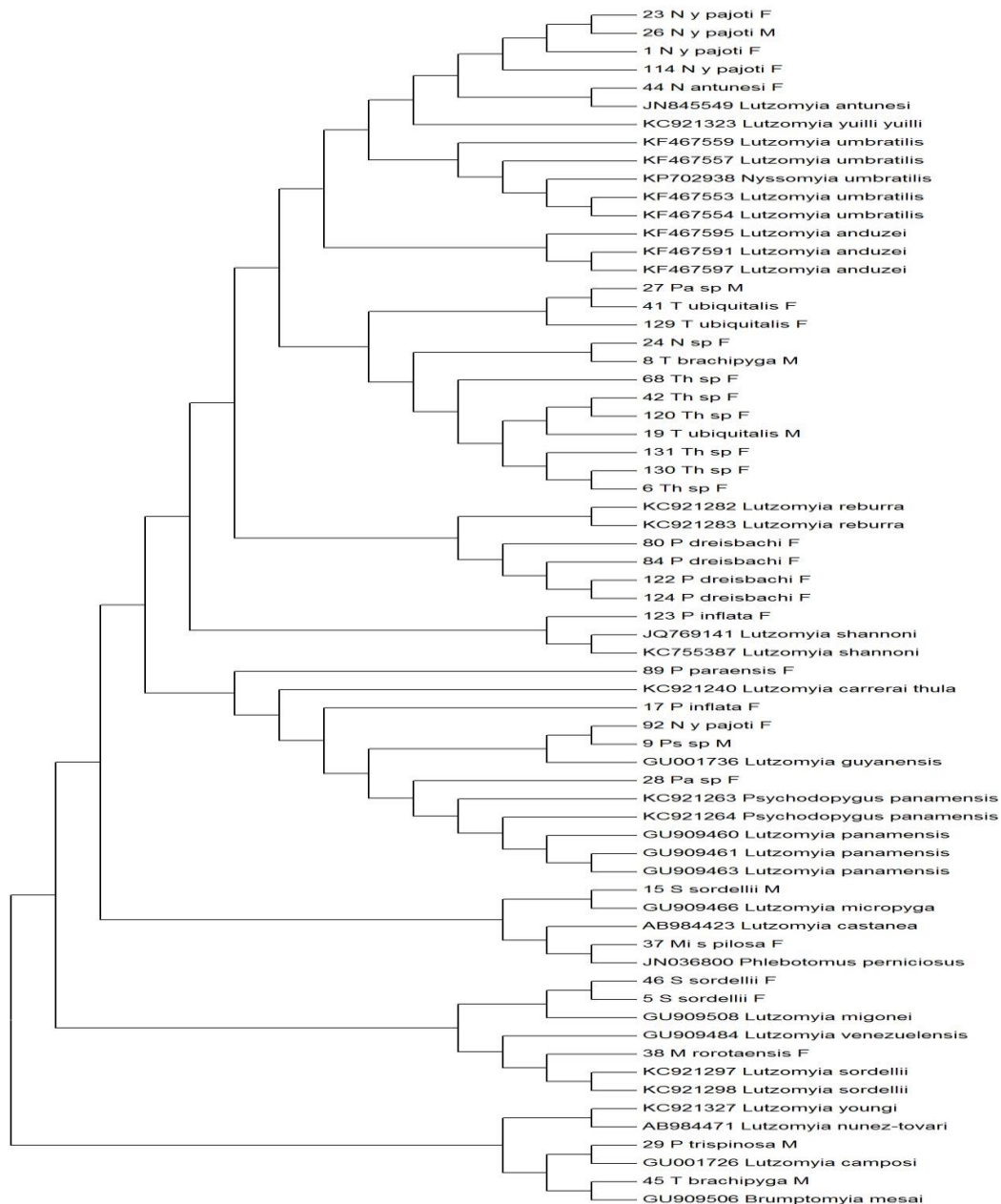


Figura 28 - Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 500 réplicas representa a história evolutiva dos táxons analisados. As distâncias evolutivas, foram calculados usando o método Probabilidade Composição máxima e estão em unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 66 sequências de nucleótidos. Posições de códons incluídos foram 1<sup>a</sup> + 2 + 3 + não-codificante. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 518 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA6.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Fauna Flebotomínica coletada na TIW

As 40 espécies da subfamília Phlebotominae coletadas durante os dias 20 a 29 de maio de 2014 na Terra Indígena Wajãpi representam 7,5% das espécies descritas para as Américas e em apenas uma coleta foram amostradas 5 subtribos e 15 gêneros demonstrando claramente a grande diversidade do grupo na Amazônia.

Nos primeiros levantamentos feitos no estado por Foratini (1959,1960) foram encontradas 24 espécies descritas e uma não descrita. Trabalhos posteriores foram realizados por Brazil et al. (2000), Souza et al. (2001), Freitas et. al. (2002) e Saraiva et al. (2011) em que estes autores registraram um aumento no número de flebotomíneos, atualmente somando 59 espécies para o estado. Todas as espécies encontradas já haviam sido descritas pelos levantamentos anteriores já citados, e espécies como *Pi. damascenoi*, *Pa. dreisbachi*, *Ps. squamiventris* e *Ny. yuilli pajoti* confirmam os registros feitos por Brazil et al. (2000) que ajudam a preencher áreas com ausências aparentes de registros mas já eram previstas em levantamentos como os realizados por Martins et al. (1978) e Bermudez (2009) em áreas vizinhas como o estado do Pará e Guiana Francesa. Na TIW também foi registrada a espécie *Th. ininnii* que teve seu primeiro registro feito em território brasileiro por Brazil et al. (2000).

Na Amazônia os gêneros com maiores diversidade são *Trichophoromyia*, *Psychodopygus* e *Trichopygomyia* em comparação com qualquer outra área da região Neotropical (Galati, 2003; Castellón, 2012). No presente levantamento, todos os três gêneros foram amostrados, sendo o gênero *Trichophoromyia* o gênero com maior amostragem (37%) em números de espécimes: cinco espécies diferentes, *Trichopygomyia* 11% com duas espécies diferentes. *Psychodopygus* é um gênero com comprovada importância médica, havendo incriminação e suspeição de espécies pertencentes ao gênero como vetores de *Leishmania* (Grimaldi et al. 1991, Bates et al. 2015), na presente amostragem o gênero representou 7% do total com 8 espécies diferentes, entre estas a espécie *Ps. davisii* com alto índice de registros em levantamentos na região Amazônica e hábito antropofílico (Luz et al. 2004, Alves et al. 2012, Ramos et al. 2014, Silva et al. 2014), sendo o gênero com a maior riqueza

na coleta. O gênero *Psathyromyia* totalizou 13% com 7 espécies, entre elas foi identificado 1 espécime de *Pa. sp.* que faz parte do complexo shannoni que é suspeito de ter importância veterinária, estando envolvido na transmissão do vírus da estomatite vesicular (VSV), que acomete o rebanho bovino e ovino nos Estados Unidos (Comer et al.1994).

Das espécies reportadas como principais envolvidas na transmissão da LTA (Brasil 2007), foram registradas nesta amostragem 46 indivíduos de *Bi. flaviscutellata* incriminada como vetor da *L.(V.) amazonensis*, 78 indivíduos da espécie *Ny. umbratilis*, vetora de *L. (V.) guyanensis* e dez espécimes de *Mi. migonei* reconhecida como vetora de *L.(V.) amazonensis* (Pessoa & Coutinho, 1941; Queiroz et al. 1994). *Ny. umbratilis* e *Pa. dendrophyla* representam 50% das espécies de fêmeas encontradas infectadas com leishmânia no levantamento feito no município de Porto grande no levantamento de Freitas et al. (2002). Assim como também foram registradas espécies que atualmente possuem o status de suspeitas do papel vetorial como *Ps. davisii* (27 indivíduos) (Castellón et al. 1994, Luz et al. 2000), *Ny. antunesi* (6 indivíduos) (Silveira et al. 2002) e *Th. ubiquitous* (99 indivíduos) (Silveira et al. 1991).

A TIW situa-se numa região onde tem ocorrido uma forte pressão ambiental devido a atividades como a mineração e construção de hidrelétricas, além de outras consequências o desmatamento advindo dessas atividades acaba por aumentar o nível de exposição ao vetores da LTA, o que é agravado pelas habitações típicas sem a presença de paredes, próximas aos ambientes florestais e ainda de suas atividades agroflorestais de subsistência (Galois 2011). Dessa forma inventários e levantamentos da fauna flebotomínica são de extrema importância para que se possa conhecer a eco-epidemiologia de áreas endêmicas como a TIW.

## **6.2. Identificação Molecular**

A técnica do “DNA barcode” foi proposta por Hebert et al. (2003), e tem se demonstrado uma ferramenta eficiente para identificação de espécies entre vários grupos taxonômicos e útil para identificação de diversas espécies de insetos (Kumar et al. 2012) como lepidópteros (Hajibabei et al. 2006), formigas ( Schilick-Steiner et

al. 2006), e dípteros (Cywinska et al. 2006, Sebastian 2015), incluindo a subfamília Phlebotominae (Kumar et al. 2012), as Américas tem aproximadamente o registro de 529 espécies de flebotomíneos (Bates et al. 2015), sua grande diversidade e sua importância médica tem transformado o grupo alvo de vários estudos com a técnica do barcode como no Panamá (Azupurua et al. 2010) Peru e Colômbia (Cohnstaedt et al. 2011, Gutiérrez 2014).

A região amazônica é uma das mais diversas em gêneros e espécies do grupo de flebotomíneos (Galati 2003), o estado do Amapá apesar de ser um dos estados endêmicos e com altos índices de LTA tem poucos estudos da fauna flebotomínica e até o momento encontra-se sem estudos de identificação moleculares do grupo. Com 59 espécies registradas atualmente, o estado demonstra-se um candidato natural a este tipo de estudo que o presente trabalho se propõe.

Para instituir um sistema de identificação molecular baseado em uma técnica como o barcode, deve-se atender condições três condições premissas: a) deve ser possível a extração do DNA genômico de todas as espécies do grupo estudado; b) as informações contidas nas sequências devem ser analisáveis e c) a sequência produzida pelo marcador (alvo) deverá possibilitar a identificação até o nível de espécie (Cywinska et al. 2006), o presente estudo foi capaz de atender as três condições estipuladas.

A quantidade de amostras é um fator que influencia da eficácia da técnica do BARCODE, um padrão ótimo de análise exigiria uma quantidade de cinco indivíduos sequenciados por espécie para que se tenha a possibilidade de compará-los (Hebert et al. 2010). Dessa forma o presente estudo encontrou dois obstáculos, o número de amostras da área estudada que não conseguiram ter o alvo COI amplificado, assim como a falta de sequências (BARCODE) no GenBank que dificulta a identificação através do BLAST das espécies de flebotomíneos da região amazônica e áreas correlatas.

A extensão do gene *COI* tem uma variação prevista entre aproximadamente 650 ~700 bp (Hebert e Gregory 2005), as sequências obtidas com os flebotomíneos da TIW em mais de 90% tiveram 581bp, sendo uma extensão próxima a outros estudos com flebotomíneos, ficando acima de 548 (Richard Hoyos et al. 2012) e 549 (Azpurua et al. 2010) , mas abaixo de 681 (Cohnstaedt et al. 2011), 689 (Kumar

et al. 2012) e 700 (GUTIÉRREZ et al., 2014). A composição de bases das 34 sequências demonstrou ser o esperado para os atropódes (Hebert et al. 2003) com uma composição rica em AT, com os valores de A (28,9%), T (33,6%), G (15,7%) e C (17,8%).

Na identificação molecular gerada pelo algoritmo BlastN no site do NCBI todas as 41 sequências (Tabela 10) foram identificadas como pertencente a subfamília Phlebotominae, mas com diferenças para as identificações de gênero e espécie. O gênero *Nyssomyia* foi o que mais encontrou identificação com outras sequências do mesmo gênero como *Ny. yuilli pajoti* e *Ny. yuilli yuilli*. Resultados díspares são resultados de fatores como, possíveis erros de identificação morfo-anatômico e baixa qualidade das sequências geradas e um dos aspectos mais importantes a considerar, a ausência de sequências depositadas no GenBank de indivíduos de regiões biogeográficas próximas. Atualmente os indivíduos maior proximidade geográfica com sequências disponíveis são o do estudo de (Gutiérrez 2014) com espécies da colômbia e de (Azpurua et al. 2010) com espécies no Panamá. Fatores como este demonstram a necessidade de maiores amostragens das espécies brasileiras e principalmente amazônicas que reconhecidamente possuem uma grande diversidade baseada em análise morfológica, provavelmente indicando sua diversidade biomolecular.

Os métodos de inferência filogenética buscam hipóteses de relacionamento evolutivo, nos métodos de inferência moleculares as características usadas para a tentativa de reconstrução filogenética são as biomoléculas (Kumar 2009). Na análise baseada na árvore gerada pelo Neighbor-Joining (Figura 24 e 25) é possível fazer o comparativo entre a identificação morfo-anatômica e a identificação molecular. É perceptível o agrupamento da maioria dos indivíduos do mesmo gênero identificados previamente. Os espécimes do gênero *Trichophoromyia* permaneceram todos próximos, com os indivíduos identificados apenas até o nível de gênero reunidos no mesmo ramo de origem com exceção de um exemplar de *T. ubiquitous\_24* e um de *Ny.sp\_19* que aparecem no mesmo grupo. O mesmo ocorre com os gêneros *Trichopygomyia*, *Psathyromyia* e *Nyssomyia* que agruparam em ramos separados, com o diferencial que os grupos de *Sciopemyia*, *Trichophoromyia* e *Nyssomyia* são suportados por nós com valores de “bootstrap” maiores (99%) que os demais grupos.

O gênero *Nyssomyia* agrupou todos os indivíduos com representantes das espécies de *Ny. yuilli pajoti* e *Ny. antunesi*, com a exceção de um indivíduo com identificação até o nível de gênero *Ny.sp\_19* e um *Ny. yuilli pajoti\_92* que permaneceu no ramo com os indivíduos do gênero *Psychodopygus*.

Na árvore processada pelo método da máxima verossimilhança análise demonstra um agrupamento maior das espécies de mesmo gênero suportados por valores de “bootstrap” iniciais de 99,9%, que dão maior robustez aos resultados obtidos. Inicialmente podem ser identificadas os agrupamentos bem definidos em ramos diferentes dos gêneros *Nyssomyia*, *Psathyromyia*, *Trichopygomya* e *Sciopemya*. No gênero *Nyssomyia* houve resultado similar ao da árvore de NJ, com todos os indivíduos da espécie reunidos num ramo com nó interno com um suporte de 98,7% de “bootstrap”, com os mesmo dois indivíduos anteriores ( *Ny.sp\_19* e *Ny.yuilli pajoti\_92*) ficando em outros ramos, o que demonstra a possibilidade de existência de problemas na sequência desses indivíduos. No gênero *Psathyromyia*, todos os indivíduos da espécies *Pa. dreisbachi* e um de *Pa. inflata\_124* formaram um grupo suportado com um valor de 100%, o outro exemplar de *Pa.inflata\_17* foi agrupado em outro ramo próximo a outro exemplar do mesmo gênero mas sem classificação no nível de espécie (*Pa.sp\_28*). As espécies do gênero *Sciopemyia* foram agrupadas num ramo com suporte inicial de 78,8%, e posteriormente as duas fêmeas ficaram separadas do exemplar macho (*S.sordelli\_15*).

As diferenças entre as análises advem do fato do método de NJ ser uma abordagem matemática baseada em distância, minimizando a soma dos comprimentos dos ramos a cada passo do processo de clusterização (agrupamento) (Nei 1987). O método apresenta alta eficácia computacional mas não envolve uma ferramenta filogenética, como a história natural ou a ação do relógio molecular (Moftah et al. 2011). O que difere do método de máxima verossimilhança que é um método baseado em caracteres, que usa um modelo exvolutivo explicito de substituição de nucleotídeos, modelos que são avaliados quanto a probabilidade de elucidar um conjunto de dados para que reflita de maneira mais próxima a verdadeira história evolutiva dos indivíduos analisados (Whelan et al. 2001). Sendo assim pode-se perceber com maior confiabilidade os resultados mostrados nas árvores de MV, que formaram árvores com as espécies do presente estudo com gêneros com maior resolução de clusterização que na árvore gerada por NJ.

É interessante salientar que o presente trabalho fornece as primeiras sequências de DNA BARCODE da fauna flebotomínica do estado do Amapá e promove a utilidade da técnica em auxiliar na identificação de espécies. É necessário perceber que a técnica foi usada de maneira integrativa com outras técnicas taxonômicas (morfo-anatômica), para somar evidências que possam atender o impedimentos taxonômicos de um grupo tão diverso quando a subfamília Phlebotominae.

Utilizar apenas a sequência BARCODE para identificação é uma premissa que levanta controvérsias (Goldstein e DeSalle 2011), o uso de informações de suporte são necessárias para se obter melhor resultados, no que é chamado de taxonomia integrativa (Goldstein e DeSalle 2011, Kirichenko et al. 2015), a forma ideal de realizar o trabalho taxonômico sera incorporando todos os dados disponíveis (morfológicos, moleculares, comportamentais, biogeográficas, ecológicas) desenvolvendo códigos de nomenclaturas que possam integrar as diversas fontes de dados e possibilitem a análise simultânea destes (Pires e Marinoni 2010, Goldstein e DeSalle 2011).

Em conclusão pode-se observar que a técnica do DNA BARCODE tem efetividade de acordo com os objetivos traçados pelo projeto desenvolvido por Hebert et al (2003), ao ser capaz de separar os grupos taxonômicos, mas é proeminente a necessidade de que haja uma padronização do método para cada grupo estudado (Gutiérrez 2013). Os resultados obtidos no trabalho apresentado estão restritos às espécies coletadas na área da TIW, mas demonstram um grande indicativo que o DNA BARCODE é uma ferramenta que poderá contribuir de forma válida a taxonomia de um grupo tão diverso e de importância médica reconhecida como os Phlebotominae.



## 7. CONCLUSÕES

- A coleta entomológica realizada nas aldeias da Terra Indígena Wajãpi resultaram numa amostragem de 2.277 indivíduos, divididos em 15 gêneros e 40 espécies. Demonstrando o alto nível de riqueza da fauna flebotômica da da região amazônica e do estado do Amapá.
- Com a utilização do marcador padrão do DNA BARCODE, os indivíduos coletados na TIW puderam ser identificados em sua totalidade como integrantes da subfamília Phlebotominae, com divergências quanto a níveis taxômicos mais restritos como gênero e espécie.
- A região do mitDNA *Citocromo Oxidase I* demonstrou-se como uma ferramenta de grande utilidade para identificação de espécies através das sequências da região, que deve ser usada integrada a outras técnicas de investigação taxômica de uso comprovado como a identificação morfo-anatômico.
- O projeto produziu 41 sequências do marcador *COI*, que se configuram com as primeiras sequências genéticas dos representantes da fauna flebotomínica do estado do Amapá.

## 8. REFERÊNCIAS

- Adler, S., O.Theodor. 1926. The mouth parts, alimentary tract and salivar apparatus of the females in *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 20:109-142.
- Aleixo, A. 2007. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: Uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia* 15:297–310.
- Aleixo, A. 2009. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. *Megadiversidade* 5:87–95.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno J, Nieto J (2004) Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57:1–88
- Alvares, C. A., J. L. Stape, P. C. Sentelhas, J. L. De Moraes Gonçalves, e G. Sparovek. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22:711–728.
- Awise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York (511 pp.).
- Andrade, A. J. D. E., P. H. F. Shimabukuro, e E. A. B. Galati. 2013. On the taxonomic status of *Phlebotomus breviductus* Barretto, 1950 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) *3734:477–484*.
- Antinori, S., E. Gianelli, S. Calattini, E. Longhi, M. Gramiccia, e M. Corbellino. 2005. Cutaneous leishmaniasis: An increasing threat for travellers. *Clinical Microbiology and Infection* 11:343–346.
- Aragão, H. B. Transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Brasil pelo *Phlebotomos intermedius*. *Brasil-Médico*, Rio de Janeiro, v.36,p.129-130,1922.
- Artemiev, M.M. 1991. A classification of the subfamily Phlebotominae. *Parassitologia*, 33(Suppl. 1):69-77.
- Azpuruá, J., D. De La Cruz, A. Valderama, e D. Windsor. 2010. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4.
- Barrett, R. D. H., e P. D. N. Hebert. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83:481–491.
- Barreto, M.P 1943. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae) São Paulo. Tipografia Rossolito,162p.

Basano, S. D. A., e L. M. A. Camargo. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7:328–337.

Bates, P. a, J. Depaquit, E. A. Galati, S. Kamhawi, M. Maroli, M. A. McDowell, A. Picado, P. D. Ready, O. D. Salomón, J. J. Shaw, Y. M. Traub-Csekö, e A. Warburg. 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors* 8:1–8.

Bermudéz, E. G. C. 2009. *Lutzomyia* sand flies in brazilianamazon basin (Diptera: Psychodidae), Editora INPA, Manaus – AM, 202p

Bonanni, P., 1691. *Observationes circa viventia, quae in rebus non viventibus reperiuntur. Cum Micrographia curiosa.* Typis Dominici Antonij Herculi: Rome.

Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes 5347:209–210.

Brasil. 2007. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2a Ed. Brasília.

Brasil.2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2a Ed. Brasília.

Brasil.2011. Ministério da Saúde. Relatório de situação: Amapá/ Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: 5 ed. Brasília, Ministério da Saúde. 19 p.

Brazil, R. P., J. D. Andrade Filho, e A. L. Falcão. 2000. Notes on phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae) from Amapá State, North Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association* 16:40–41.

Brown, W. M., M. George, e A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:1967–71.

Caméron, P.J.; Thomas, W.P.; HILL, R.L. 1979. Introduction of lucerne aphid parasites and preliminary evaluation of the natural enemies of *Acyrtosiphon* spp. (Hemiptera: Aphididae) in New Zealand. In: AUSTRALIAN CONFERENCE ON GRASSLAND INVERTEBRATE ECOLOGY, 2., 1979, Wellington. Proceedings. Wellington : Government Print, 1979. p.219-223.

Cameron, M. M.; Pessoa, F. A.; Vasconcelos, A. W. & Ward, R. D., 1995. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medicine and Veterinary Entomology*, 9:263-272

Castellón, E. G.; J. R. Arias; R. A. Freitas & R. D. Naiff. 1994. Os flebotomíneos da região Amazônica, estrada Manaus-Humaitá, Estado do

Amazonas, Brasil (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae). *Acta Amazônica* 24: 91–102.

Castellón, E. G. 2009. *Lutzomyia* Sand Flies in the Brazilian Amazon Basin (Diptera: Psychodidae). Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 202 p

Cohnstaedt, L. W., L. Beati, A. G. Caceres, C. Ferro, e L. E. Munstermann. 2011. Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group *Verrucarum* (Diptera: Psychodidae: *Lutzomyia*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84:913–922.

Comer, J. A.; D. M. Kavanaugh; D. E. Stallknecht & J. L. Corn. 1994. Population dynamics of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to the epizootiology of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia. *Journal of Medical Entomology* 31: 850–854.

Cooper, G. M. *The Cell, 2nd edition A Molecular Approach*. Boston University Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6

Chance, M.L. 1985 The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. In: Chang/Gray(eds) Elsevier Science Publishing Company 1985; 93-110.

Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* 1:159-187.

Cywinska, a., F. F. Hunter, e P. D. N. Hebert. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology* 20:413–424.

Dedet, J. P. Stages in the identification of phlebotomine sandflies as vectors of leishmaniasis and other tropical diseases. *Parassitologia*. 2005 Dec;47(3-4):291-5.

Dias, F. D. O. P., E. S. Lorosa e J. M. M. Rebêlo. 2003. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública* 19:1373–1380

Forattini, O.P. 1959. Sobre os flebotomos do territorio do Amapá, Brasil. *Ar Hig Sao Paulo* 13:159-164.

Forattini O.P. 1960. Notas sobre *Phlebotomus* do territorio do Amapá, Brasil (Diptera:Psychodidae). *Stud Entomol* 3:467-480

França,C; Parrot,L. 1920. Introducion à l'étude systématique des Diptères du genre *Phlebotomus*. *Bull Soc Pathol Exot.*13: 695-708.

Freitas, R.A., Naiff, R.D. Barret,T.V. 2002. Species diversity and flagellate infections in the Sandy fly near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (1):53-59.

- Floyd, R., J. Lima, J. de Waard, L. Humble, e R. Hanner. 2010. Common goals: Policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biological Invasions* 12:2947–2954.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, e R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* 3:294–299.
- Futuyma, D. J. (2003) *Biologia evolutiva*, 2ª Edição. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP.
- Galati, E.A.B. 2003. Classificação dos Phlebotominae. In: Rangel, E.F; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. p.23-51.
- Gallois, D. T. 2011. Terra Indígena Wajãpi : da demarcação às experiências de gestão territorial / Dominique Tilkin Gallois. -- São Paulo : Iepé,. -- (Coleção ensaios ; 1).
- Gantier JC, Gaborit P, Rabarison P. 2006. Phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae) of French Guiana. I--Description of the male of *Lutzomyia* (*Trichopygomyia*) *depaquiti* n. sp]. *Parasite*. 2006Mar;13(1):11-5
- Goldstein, P. Z., e R. DeSalle. 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *BioEssays* 33:135–147.
- Gomes, A. D. C. 2002. Vigilância Entomológica. *Iesus* 11:79–90.
- Gontijo, B., e M. D. L. R. De Carvalho. 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36:71–80.
- Guerra, J. A. D. O., J. A. S. Ribeiro, L. I. D. A. R. D. C. Coelho, M. D. G. V. Barbosa, e M. G. Paes. 2006. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica* 22:2319–2327.
- Hajibabaei, M., G. a C. Singer, P. D. N. Hebert, e D. a. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23:167–172.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, e R. Jeremy. 2003. Biological identifications through DNA barcodes:313–321.
- Hebert, P. D. N., J. R. Dewaard, e J.-F. Landry. 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology letters* 6:359–362.
- Hebert, P. D. N., e T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology* 54:852–859.
- Hennig, W. 1966 . *Phylogenetic Systematics* . University of Illinois Press , Urbana.

- Hoy, M. A. 2003. Molecular Systematics and Evolution of Arthropods. Em: Insect Molecular Genetics, Academic Press of Elsevier Science, p. 363-365.
- Jinbo, U., T. Kato, e M. Ito. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* 14:107–124.
- Jobling B. 1987. Anatomical drawing of biting flies. London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust Publisher; 119p.
- Killick Kendrick R. 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmaniae* and their phlebotome vectors. *Bull Soc Pathol Exot* 78: 747-755.
- Kirichenko, N., P. Huemer, H. Deutsch, P. Triberti, R. Rougerie, e C. Lopez-Vaamonde. 2015. Integrative taxonomy reveals a new species of *Callisto* (Lepidoptera, Gracillariidae) in the Alps. *ZooKeys* 176:157–176.
- Kumar, N. P., R. Srinivasan, e P. Jambulingam. 2012. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular Ecology Resources* 12:414–420.
- Kumar, S. 2009. Encyclopedia of life sciences. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*.
- Lainson R, Ryan L,; Shaw J.J. 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 82: 421-424.
- Langeron, M. 1949. Précis de microscopie. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Médecine Saint-Germain, Paris.
- Laurito, M., T. M. De Oliveira, W. R. Almirón, e M. A. M. Sallum. 2013. COI barcode versus morphological identification of *Culex* ( *Culex* ) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108 Suppl :110–22.
- Leng, Y.J. 1987. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, with description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1987;81:311–7
- Léger, N., J. Depaquit, e F. Gay. 2012. Description of the sandfly species *Chinius samarensis* n. sp. (Psychodidae; Diptera) from the Philippines. *Pathogens and Global Health* 106:346–351.
- Lewis, D. J. 1982. a Taxonomic Review of the Genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae).
- Lewis, D. J., D. G. Young, G. B. Fairchild, e D. M. Minter. 1977. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology* 2:319–332.

- Lima, J. D. 2008. A herpetofauna do Parque Nacional do Montanhas do Tumucumaque, Amapá, Brasil, Expedições I a V. Inventários Biológicos Rápidos no Parque Nacional Montanhas do Tumucumaque, Amapá, Brasil. RAP Bulletin of Biological Assessment.
- Lukthanov V.A., Sourakov A., Zakharov E.V. & Hebert P.D. 2009: DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce success of species identification. Mol. Ecol. Resour. 9: 1302–1310
- Luz, E.; N. Membrive; E. A. Castro; J. Dereure; F. Pratlong; J. A. Dedet; A. Pandey & V. Thomaz–Socol. 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, Southern Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 94: 623–631
- Griffths, M. S. 2000. Introdução à Genética. 6ª Edição. Ed. Guanabara Koogan
- Gutiérrez, M. A. C., Vélez, D. I., R. J. V. 2014. DNA Barcoding for the Identification of Sand Fly Species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. PLoS ONE:n/a.
- Marcondes, C.B.2007.A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomological News; 118: 351–356
- Margulis L.1971.The origin of plant and animal cells. Am Sci, 59: 230–235.
- Martin, W., e M. Müller. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature 392:37–41.
- Martins, A. V.; Williams, P.; Falcão, A. L. 1978, American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ. Editora Herman Lent.
- Mayr, E.1977. Populações, espécies e evolução. São Paulo : Ed. Nacional,485p.
- Mayr, E. 1982. The growth of biological thought: diversity, evolution, and inheritance. Cambridge: Harvard University Press.
- Meyer, C. P., e G. Paulay. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biology 3:1–10.
- Miyaki, C. Y. 2007. A iniciativa do código de barras em aves e a participação do Brasil. Revista Brasileira de Ornitologia 15:311–313.
- Moftah, M., S. H. A. Aziz, S. El Ramah, e A. Favereaux. 2011. Classification of sharks in the egyptian mediterranean waters using morphological and DNA barcoding approaches. PLoS ONE 6.
- Moritz, C., e C. Cicero. 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. PLoS Biology 2.

Nabholz, B., S. Glémin, e N. Galtier. 2008. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals - The longevity hypothesis. *Molecular Biology and Evolution* 25:120–130.

Nei, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees' 4:406–425.

Nelson, G. e Platnick, N. 1981. *Systematics and Biogeography Cladistic and Vicariance*. Columbus University Press. New York. 345 p

Newstead, R., 1911. The papataci flies (*Phlebotomus*) of the Maltese islands. *Bull Entomol Res* 2, 47- 48.

Nozais, J. P. 2003. The Origin and Dispersion of Human Parasitic Diseases in the Old World (Africa, Europe and Madagascar). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98:13–19.

Nzelu, C. O., A. G. Cáceres, M. J. Arrunátegui-Jiménez, M. F. Lañas-Rosas, H. H. Yañez-Trujillano, D. V. Luna-Caipo, C. E. Holguín-Mauricci, K. Katakura, Y. Hashiguchi, e H. Kato. 2015. DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. *Acta Tropica* 145:45–51.

Nuttal, G. H. F., 1904 *Blood immunity and blood relationship*. 444 pp. Cambridge: University Press.

P, P. B. K., e C. D. Sebastian. 2015. Molecular barcoding of green bottle fly , *Lucilia sericata* ( Diptera : Calliphoridae ) using COI gene sequences 3:10–12.

Pêsoa, S.B, Coutinho J.O.1941 Infecção natural e experimental de flebótomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo. *Hospital*, 20:25-30.

Pires, A. C., e L. Marinoni. 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica* 10:0–0.

Quaresma, P.F., Rêgo, F.D e Botelho, H.A. 2011. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 105: 579-585

De Queiroz, K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 Suppl :6600–6607.

De Queiroz, K. 2005a. Different species problems and their resolution. *BioEssays* 27(12):1263-1269



Queiroz R.G, Vasconcelos I.A, Vasconcelos A.W, Pessoa F.A, Sousa RN, David JR. 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Am J Trop Med Hyg* 1994,50:693-698.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364.

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

Roe, A. D. e F. A. H. Sperling. 2007. Delimitation of cryptic species boundaries in *Dioryctria* moths using an integrative approach. *Molecular Ecology* in review.

Hoyos, R. L., S., Uribe, S. e Vélez. I. 2012. Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae) mediante "código de barras". *Revista Colombiana de Entomología* 38:134–140.

Saccone C, Gissi C, et al. 2000. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene*, 261: 153–159

Saito, S., K. Tamura, e T. Aotsuka. 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 171:1695–1705.

Saraiva, N.G.L., Valderrama, M., Labrada, A.F., Holguin, C., Navas, G., Palma, A., Weigle, K.A. 1989. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 159:725-735.

Saraiva, J. F., R. Nonato, P. Souto, e A. Ferreira. 2011. Flebotomíneos ( Diptera : Psychodidae ) coletados em um assentamento rural no Estado do Amapá , Brasil. *Biota Amazonia*:58–62

Sarich, V. M., e a C. Wilson. 1967. Immunological time scale for hominid evolution. *Science (New York, N.Y.)* 158:1200–1203.

Silveira, F. T., A.A.A. Souza, R. Lainson, J. J. Shaw, R. R. Braga, and E.E.A. Ishikawa. 1991. Cutaneous leishmaniasis in the amazona region: Natural infection of sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86: 127–130

Silveira, F. T., E.A.Y. Ishikawa, A.A.A. Souza, and R. Lainson. 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasitology* 85: 43–50

SINAN. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

Stoeckle, M. Y & P. D. N. Hebert (2008): Barcode of Life. Scientific American October, 2008: 82-88.

Souza A. A. A, Barata I.R, Silva, M.G.S, Lima J.A.N, Martins A.F.P. 2001. Contribuição à fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) da Serra Navio, Amapá, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34 (Supl. 1): 53.

Shaw, J. J.; Lainson, R.1987. Ecology and epidemiology: New World. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (eds.). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press London, vol. 1, p. 291-363.

Schwartz, J. H. 2005. *Molecular Systematics and Evolution*.

Sites, J. W., e J. C. Marshall. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, Vol. 35: 199-227

Song, H., J. E. Buhay, M. F. Whiting, e K. a Crandall. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:13486–13491.

Stucky, B. J. 2012. Seqtrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques* 23:90–93.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, e S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.

Vohra, P., Khera, K.S. 2013. DNA barcoding: Current advances and future prospects - a review. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*. 185 - 189.

Ward R. D. *Vector biology and control*. In KP Chang & R Bray, *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York & Oxford 1985; 199-212.

Whelan, S., P. Liò, e N. Goldman. 2001. Molecular phylogenetics: State-of-the-art methods for looking into the past. *Trends in Genetics* 17:262–272.

Wiley. E. O. 1981. *The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. (Wiley-Interscience, 1981; 439 p.

Wiley, E. O. 2011. *Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. Second edition. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey. 406 pp.

Will, K. W., e D. Rubinoff. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20:47–55.

Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George Jr., M., Gyllensten, U.B., HelmBychowski, K., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D.,

Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26, 375–400

Wolstenholme, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol.* 141:173-216.

World Health Organization (WHO). 2015. Leishmaniasis: background information. Disponível em: [www.who.int/topics/leishmaniasis/en](http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en) 2015; Acesso em 22 jan de 2015.

World Health Organization. 2010. Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series:22–26.

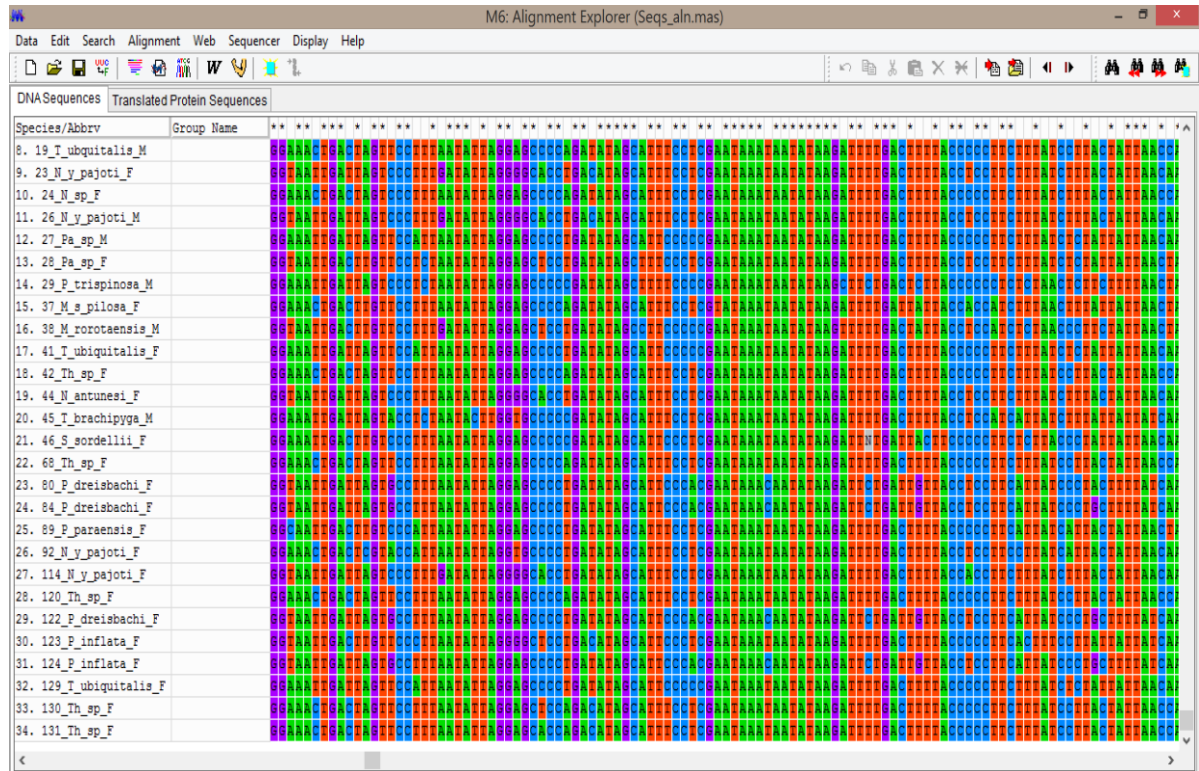
## ANEXO I

The image shows a screenshot of the MEGA6 Alignment Explorer window. The window title is "MEGA: Alignment Explorer (Seqs\_aln.mas)". The menu bar includes "Data", "Edit", "Search", "Alignment", "Web", "Sequencer", "Display", and "Help". The toolbar contains various icons for file operations and alignment functions. The main window displays a DNA sequence alignment for 34 taxa, with the "Translated Protein Sequences" tab selected. The alignment is color-coded by base pair (A, C, G, T) and includes asterisks above the alignment to indicate homologous regions. The taxa listed are:

Species/Abbrv	Group Name
8. 19_T_ubiquitalis_M	
9. 23_N_y_pajoti_F	
10. 24_N_sp_F	
11. 26_N_y_pajoti_M	
12. 27_Pa_sp_M	
13. 28_Pa_sp_F	
14. 29_P_trispinosa_M	
15. 37_M_s_pilosa_F	
16. 38_M_rorotaensis_M	
17. 41_T_ubiquitalis_F	
18. 42_Th_sp_F	
19. 44_N_antunesi_F	
20. 45_T_brachipyga_M	
21. 46_S_sordellii_F	
22. 68_Th_sp_F	
23. 80_P_dreisbachi_F	
24. 84_P_dreisbachi_F	
25. 89_P_paraensis_F	
26. 92_N_y_pajoti_F	
27. 114_N_y_pajoti_F	
28. 120_Th_sp_F	
29. 122_P_dreisbachi_F	
30. 123_P_inflata_F	
31. 124_P_inflata_F	
32. 129_T_ubiquitalis_F	
33. 130_Th_sp_F	
34. 131_Th_sp_F	

Trecho do alinhamento das sequencias de COI produzidas neste trabalho. Os asteriscos mostram as regiões homólogas. Este alinhamento é composto por 34 táxons e 581 posições (pares de base). O alinhamento foi realizado no programa MEGA6, como algoritmo ClustalW.

## ANEXO II



Trecho do alinhamento das sequencias de COI produzidas neste trabalho. Os asteriscos mostram as regiões homólogas. Este alinhamento é composto por 34 táxons e 581 posições (pares de base). O alinhamento foi realizado no programa MEGA6, como algoritmo ClustalW.

