



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

**RAFAELA DOS SANTOS SILVA SANCHES**

**ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS NO ESTADO DO AMAPÁ, BRASIL**

**Macapá/AP  
2020**

RAFAELA DOS SANTOS SILVA SANCHES

**ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS NO ESTADO DO AMAPÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Emerson A. Castilho Martins

Macapá-AP  
2020

RAFAELA DOS SANTOS SILVA SANCHES

**ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS NO ESTADO DO AMAPÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaaios Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

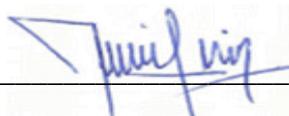
DATA DE APROVAÇÃO: 29/10/2020



Examinador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Stocco de Lima  
Instituto Evandro Chagas – IEC



Examinador: Prof. Dr. Rafael Lima Resque  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP



Examinador: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA



Orientador: Prof. Dr. Emerson A. Castilho Martins  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá  
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Sanches, Rafaela dos Santos Silva.

Espécies de Flebotomíneos no estado do Amapá, Brasil. / Rafaela dos Santos Silva Sanches;  
orientador, Emerson A. Castilho Martins. – Macapá, 2021.  
64 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Insetos. 2. Insetos - Amapá. 3. Flebotomíneo – Vetor biológico. 4. COI. 5. DNA  
Barcoding. I. Martins, Emerson A. Castilho, orientador. II. Fundação Universidade Federal do  
Amapá. III. Título.

595.7 S211e  
CDD. 22 ed

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir estar com saúde e ter força e vontade para alcançar meus objetivos na vida.

Ao meu orientador, Emerson Martins, professor incrível e grande profissional, por ter aceitado me orientar e ter me proporcionado esse grande aprendizado durante os anos do mestrado.

Aos meus pais, Henrique Germano e Jurandir Silva, por todo amor, carinho e educação ao longo da minha vida. Aos meus irmãos, Rafael Silva, Raquel Silva e Rainer Silva por todo amor que temos juntos. À essa família maravilhosa que me foi concebida.

Ao meu marido, companheiro e amigo, Darlan Sanches, por todos esses anos a meu lado, me aconselhando e incentivando. E mais, por termos formado uma família linda, com nosso filho Miguel.

Aos pesquisadores, Tiago Costa e Rodrigo Pereira pela grande contribuição nesta pesquisa.

À toda equipe do laboratório de Imunologia e Biologia Molecular por toda a experiência vivida no laboratório, pelos dias juntos, divertidos e as vezes nem tanto, quando os experimentos não davam certos, normal, é ciência!

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para essa pesquisa!

## RESUMO

Os insetos denominados flebotomíneos têm importância médica por serem os vetores de Leishmanioses. Esses insetos pertencem à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, e são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Os flebotomíneos têm distribuição diferenciada no território brasileiro e no mundo. A diversidade de espécies de flebotomíneos, bem como a composição de uma comunidade, são resultados de interações ecológicas e aspectos geográficos locais. A identificação de uma espécie vetor e a identificação da taxa de infecção natural, principalmente nas regiões endêmicas, é de fundamental importância na entomologia médica. Esta pesquisa visa determinar o padrão de distribuição das espécies de flebotomíneos nos municípios do estado do Amapá, através da identificação dos flebotomíneos a partir da técnica do DNA Barcoding, e ainda, identificar os municípios onde há a presença de Flebotomíneos de importância médica, bem como inferir a relação evolutiva dos espécimes identificados. Os insetos foram coletados com o uso de armadilhas CDC, localizadas a 50m, 100m e 150m da borda da mata, em todos os municípios do Estado do Amapá. Foram armazenados em etanol 70%, e o DNA foi extraído pela Proteinase K seguido pelo método do fenol / clorofórmio. Usamos a subunidade I (COI) da citocromo C oxidase (~700pb) como marcador, que foi sequenciado com o método de Sanger, obtendo uma sequência de 550 a 650pb. A partir disto foi feita a análise comparativa das sequências nos Bancos de Dados do NCBI e BOLD. Como resultado foram coletadas 599 Flebotomíneos, sendo 340 fêmeas e 259 machos. Após amplificação por PCR da região do gene COI do DNA mitocondrial, foi possível obter 332 amostras amplificadas, sendo 103 delas submetidas ao sequenciamento Sanger. Um total de 84 amostras apresentaram sucesso no sequenciamento, e estas foram analisadas junto aos bancos de dados, sendo possível identificar 67 espécimes em nível de espécie e 17 somente em nível de gênero. Nesta pesquisa, identificou-se no total a ocorrência de 15 espécies de flebotomíneos circulante no estado do Amapá, a espécie mais frequente foi *Nyssomyia antunesi*. Os gêneros com mais frequência neste estudo foram *Nyssomyia*, *Trichopygomyia* e *Bichromomyia*. As espécies de importância médica registradas neste estudo foram *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia umbratilis* e *Psychodopygus squamiventris squamiventris*. Nossos resultados mostraram que o gene COI pode ser usado como uma ferramenta eficiente para identificar espécies de flebotomíneos; no entanto, não pode ser usado como única ferramenta, uma vez ainda existe algumas inconsistências na identificação genética, incluindo limitações nos bancos de dados e erros, assim, sugere-se que a identificação molecular seja usada em combinação com a análise morfológica.

**Palavras-chave:** Vetor biológico. COI. DNA Barcoding.

## ABSTRACT

Phlebotomines are insects with medical importance, since they can transmit Leishmania. They are Diptera from Phlebotominae subfamily belonging to the Psychodidae family, popular know as sand flies. The phlebotomines are diferencialy distributed in Brazil as well as in other countries, being their biological diversity a result of interaction between ecological interactions and geographic characteristics. This brings up a medical importance of species distribution across endemic areas of Leishmaniose as occurs in Amapa State, Brazil. This research aimed to identify the ecological phlebotomines distribution in the Amapá State, on the Amazon region of Brazil, as well as to identify in which cities of the State have medical importat phlebotomines. The insects was collected using CDC-type light traps, located at 50m, 100m and 150m far from an forest border, in all cities of Amapá State. They were stored in ethanol 70%, and the DNA was extracted by Proteinase K followed by phenol/chloroform method. We used cytochrome C oxidase subunit I (COI) as template to amplify a 550-650 base pairs fragment, which was sequenced with Sanger's method. The sequences obtained was analysed by BOLD and NCBI databases. As result, it was obtained 599 phlebotomines, with 340 females and 259 males. After the PCR amplification of COI gene, it was possible to obtain 332 positive samples, and 103 of them was submitted to Sanger sequencing. A total of 84 sequenced samples was submitted to databases, and it was possible to identify 67 specimens al specie level and 17 at genera level. There was 15 species of sandflies, with Nyssomyia antunesi as the most frequent. The genera more frequent was Nyssomyia, Trichopygomyia and Bichromomyia. The medical importat speceis colected was Bichromomyia flaviscutellata, Nyssomyia umbratilis and Psychodopygus squamiventris squamiventris. Our results show that the COI gene can be used as an efficient tool to identify sandflies species; however, it can not be used as the only tool, since there was some inconsistencies in the genetic identification, including databases limitations and erros, so we can suggest that molecular identification could be used in combination with morphological analisys.

**Keywords:** Biological vector. COI. DNA Barcoding.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fêmea de flebotomíneo ingurgitada.....	13
<b>Figura 2</b> – Protozoário <i>Leishmania</i> (A – forma Amastigota; B – forma Promastigota). .....	16
<b>Figura 3</b> – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp.....	18
<b>Figura 4</b> – Tubo digestivo de fêmea de Flebotomíneo. ....	19
<b>Figura 5</b> – Estrutura da molécula de LPG. ....	24
<b>Figura 6</b> – Mapa da delimitação dos 16 municípios do estado do Amapá. ....	31
<b>Figura 7</b> – Gráfico das frequências relativas dos flebotomíneos coletados nas diferentes distâncias da mata nos municípios do AP. ....	38
<b>Figura 8</b> – Eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio mostrando produto de amplificação de PCR da região do gene COI de flebotomíneos coletados nos municípios de Laranjal do Jari (1 a 15) e Pracuuba (16 a 18). mpb – Peso Molecular; 0- Controle Negativo. ....	39
<b>Figura 9</b> – Gráfico demonstrativo de amplificação do DNA de flebotomíneos após PCR. ....	39
<b>Figura 10</b> – Distribuição das cinco espécies de flebotomíneos mais frequentes em coletas realizadas com armadilhas tipo CDC nos municípios do estado do Amapá. ....	50
<b>Figura 11</b> – Relações evolutivas de táxons inferida pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages), a análise envolveu 84 sequências nucleotídicas. Teste de bootstrap (500 repetições), com porcentagem mostrados próximos aos ramos.....	52
<b>Figura 12</b> – Relações evolutivas de táxons inferida pelo método Neighbor-Joining, a análise envolveu 84 sequências nucleotídicas. Teste de bootstrap (500 repetições), com porcentagem mostrados próximos aos ramos.....	53
<b>Figura 13</b> – Relações evolutivas de táxons inferida pelo método de Máxima Verossimilhança, baseado no modelo de Tamura-Nei, a análise envolveu 84 sequências nucleotídicas. Teste de bootstrap (500 repetições), com porcentagem mostrados próximos aos ramos. ....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais agentes etiológicos e seus vetores e os tipos de leishmaniose.....	23
<b>Tabela 2</b> – Pontos de coletas realizados nos municípios do estado do Amapá, no ano de 2017. .....	32
<b>Tabela 3</b> – Discriminação dos flebotomíneos quanto ao sexo e o total de espécime coletado em cada município amapaense. Linhas marcadas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em teste do Qui-quadrado de comparação entre os sexos. .....	36
<b>Tabela 4</b> – Distribuição de Flebotomíneo coletado em relação à distância para o ponto de coleta, e sexo. Linhas marcadas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em teste do Qui-quadrado de comparação entre as distâncias de coleta. ....	37
<b>Tabela 5</b> – Frequência absoluta e relativa (entre parênteses) dos machos e fêmeas de flebotomíneos coletados com armadilha do tipo CDC nos 16 municípios do Amapá. Os fatores testados diferem significativamente entre si pelo teste de Qui Quadrado ( $p = 0,01$ ). ....	38
<b>Tabela 6</b> – Comparação das sequências no NCBI e no BOLD, considerando a critério de maior identidade para inferir o nome da espécie. Em negrito estão as amostras identificadas em nível de espécie (Identidade entre 98% a 100%). ....	41
<b>Tabela 7</b> – Espécies identificadas pelo alvo COI do DNA mitocondrial, discriminadas por município do estado do Amapá, pela distância do ponto de coleta em relação a borda da mata e sexo. As espécies em negrito são de importância médica. ....	49
<b>Tabela 8</b> – Composição das espécies de flebotomíneos no estado do Amapá, conforme identificação através do gene COI, do DNA mitocondrial.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Micro litro
ArthroLab	Laboratório de Artrópodes
ATPase	Adenosinatrifosfatase
BDIA	Banco de Dados de Informações Ambientais
CDC	<i>Center on Disease Control</i>
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
COI	Citocrome Oxidase I
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
k <sub>2P</sub>	Kimura2parameter
L.	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
Lu	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose Visceral
M	Mol
MV	Máxima Verossimilhança
MgCl	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocôndrial
NaCl	Acetato de Sódio
NADH	Difosfopiridina Nucleotídeo
NaOAc	Acetato de Sódio
NJ	Neighbor Joining
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde

pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações Por Min
rRNA	RNA Ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação
tRNA	RNA Transportador
UV	Ultravioleta
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	FLEBOTOMÍNEOS - ASPECTOS GERAIS.....	13
1.2	LEISHMANIOSE .....	15
<b>1.2.1</b>	<b>Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
3.1	LEVANTAMENTO ENTOMOLÓGICO .....	22
3.2	IMPORTÂNCIA VETORIAL DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	23
3.3	INTERAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICO .....	24
3.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR .....	26
<b>3.4.1</b>	<b>DNA Mitocondrial</b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
5.1	OBJETIVO GERAL .....	30
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
6.1	ÁREA DE ESTUDO .....	31
6.2	COLETA ENTOMOLÓGICA.....	32
6.3	TRIAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA .....	32
6.4	PCR DE DNA .....	33
6.5	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	34
6.6	PURIFICAÇÃO DE DNA .....	34
6.7	ANÁLISE DE DADOS .....	34
6.8	RELAÇÕES EVOLUTIVAS.....	35
6.9	ESTATÍSTICA .....	35
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
7.1	COLETA E ANÁLISE DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS .....	36
7.2	ANÁLISE MOLECULAR.....	39
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
8.1	FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS .....	55
<b>8.1.1</b>	<b>Vegetação e aspectos geomorfológicos</b> .....	<b>57</b>
8.2	ANÁLISE DNA BARCODING .....	59

8.3	ANÁLISE DAS RELAÇÕES EVOLUTIVAS.....	61
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 FLEBOTOMÍNEOS - ASPECTOS GERAIS

Os insetos denominados flebotomíneos pertencem à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, e são conhecidos popularmente, variando de acordo com a região, como mosquito “palha” e “birigui” na região Sul, como “cangalha”, “cangalhinha”, “asa-dura” no Nordeste e na Amazônia por “Tatuira” (BRASIL, 2007; REY, 2011). São insetos pequenos, muito pilosos que podem ser de cor palha ou castanho-claros (Figura 1), facilmente reconhecidos pela forma como pousam, em que as asas permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso (REY, 2011).

**Figura 1** – Fêmea de flebotomíneo ingurgitada.



Fonte: Brasil (2017)

Seu ciclo de vida envolve uma fase de ovo, quatro estádios larvários, seguindo de pupa e o estágio final de adulto alado, permitindo classificá-los como holometábolos. Os adultos tornam-se diferentes dos demais dípteros Psicodídeos, por apresentarem corpo mais delgado e pernas mais longas e delgadas (KILLICK-KENDRICK, 1999; BRAZIL; BRAZIL, 2003). Durante o dia, se escondem em rachaduras de rochas, madeiras ou parede de casas, tocas de animais, nos ocos de árvores e entrenós de bambus; ou no interior de currais, galinheiros (AGUIAR; VILLELA, 1987). Tanto as fêmeas como os machos se alimentam de fontes de açúcar para produzir energia e manter a homeostasia (SCHLEIN; WARBURG, 1986), no

entanto as fêmeas necessitam de sangue na alimentação para possibilitar a maturação de seus ovos (WILLIAMS, 1970; BRAZIL; BRAZIL, 2003). Os ovos são depositados em ambientes terrestres, ricos em matéria orgânica, apresentando forma elipsoide com coloração escura (SCORZA, 1969; BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Os flebotomíneos são vetores dos protozoários do gênero *Leishmania* spp., sendo estes causadores da leishmaniose, doença endêmica no estado do Amapá, e sua transmissão é marcada por diversos padrões relacionados a espaço e tempo, como a chuva, temperatura e o tipo de vegetação, dos quais podem favorecer ou não uma determinada população. As modificações ocorridas em áreas de floresta acarretam diminuição da fauna de flebotomíneos, bem como de animais silvestres, no entanto, para espécies mais adaptáveis a ambientes modificados, pode ocorrer aumento na densidade populacional (GOMES; GALATI, 1987; AGUIAR *et al.*, 1996).

Os flebotomíneos têm distribuição diferenciada no território brasileiro e no mundo (BRASIL, 2010; WHO, 2015). Atualmente, no mundo, são descritos 1026 táxons, 994 atuais e 32 fósseis; no continente americano soma-se 546 táxons, sendo 529 atuais e 17 fósseis (GALATI, 2019). O padrão de distribuição está diretamente relacionado à riqueza e a diversidade de uma espécie presente em diferentes grupos. Esses insetos ocuparam a maioria das regiões compostas por Savanas, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica e Charco, com exceção das regiões frias e ilhas oceânicas (LEWIS, 1982).

Alterções mínimas nos micro-habitats dos flebotomíneos são suficientes para modificar a atividade das populações de flebotomíneos em determinadas áreas (DIAS *et al.*, 2007). Desta forma, a presença de flebotomíneos em um ambiente pode estar intimamente ligado a fatores climáticos, tais como temperatura, pluviosidade e umidade (SCORZA; ORTIZ; GOMEZ, 1968; MISCEVIC, 1981). Assim, a ecologia vetorial pode sofrer alterações a partir de mudanças ambientais, tais como desmatamento e urbanização. (FOUQUE *et al.*, 2007; XIMENES *et al.*, 2007; MAROLI *et al.*, 2013; BATES *et al.*, 2015).

A diversidade de espécies de flebotomíneos, bem como a composição de uma comunidade, são resultados de interações ecológicas e aspectos geográficos locais (FELICIANGELI, 1987; RANGEL; LAINSON, 2009). A presença de algumas espécies de flebotomíneos em ambientes urbanos dá-se pela capacidade de se adaptarem a locais que sofreram grandes alterações nos seus habitats naturais, ocasionando limitações de espaços ecológicos (AGUIAR *et al.*, 1996; XIMENES *et al.*, 2007).

A densidade populacional pode sofrer grande interferência pela variação das estações do ano (OLIVEIRA *et al.*, 2003, XIMENES *et al.*, 2007). Em áreas tropicais, a densidade

populacional de flebotomíneos aumenta durante ou após períodos chuvosos, pois é a alta umidade resultante das primeiras chuvas que ocasionam a emergência das pupas, bem como é o fato indicativo para previsão de maior atividade destes insetos fora de seus abrigos (ALMEIDA *et al.*, 2010b).

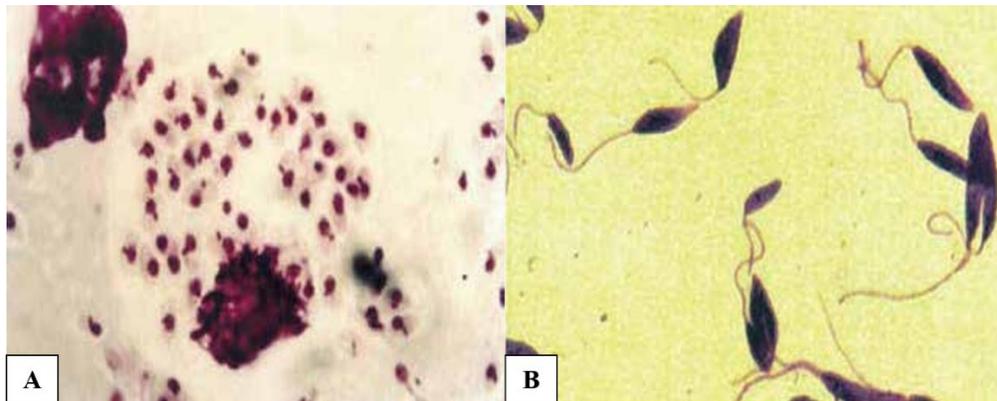
Com relação a classificação taxonômica dos flebotomíneos, no Velho Mundo são relacionados 3 gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* (SECCOMBE; READY; HUDDLESTON, 1993). E para o Novo Mundo, são duas as classificações adotadas entre os pesquisadores: Young e Duncan (1994) que consideram outros 3 gêneros, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileyia*. Considerando a importância desses insetos na transmissão da Leishmaniose, os gêneros de importância médica no Velho Mundo são *Phlebotomus* e *Sergentomyia* e no Novo Mundo o gênero *Lutzomyia*, onde encontram-se todos os vetores de Leishmanioses das Américas, denominadas coletivamente como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (REY, 2011; READY, 2013). E a classificação proposta por Galati (1995; 2003; 2019), que reorganiza a taxonomia dos flebotomíneos no Novo Mundo em 22 gêneros e 20 subgêneros. Nesta dissertação será adotada a classificação proposta por Galati e para a abreviatura dos gêneros e subgêneros será utilizada a proposta por Marcondes (2007) e Galati *et al.* (2017).

## 1.2 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças crônicas e infecciosas com distribuição mundial causadas por parasitos unicelulares, flagelados e digenéticos pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (BRASIL, 2017), que apresenta duas formas de manifestações clínicas: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) caracterizada por manifestações cutâneas, mucocutânea ou cutânea difusa, e Leishmaniose Visceral (LV) que consiste em alterações sistêmicas que eventualmente também podem levar a alterações cutâneas (GARNHAM, 1987; MICHALSKY *et al.*, 2002). Em termos epidemiológico, a leishmaniose pode se manifestar como uma antroponose, quando circula somente entre humanos, ou como uma zoonose, quando circula entre o homem e outros mamíferos (ALVAR *et al.*, 2004). A epidemiologia desta doença é considerada complexa, em decorrência da grande diversidade de espécies de *Leishmania*, assim como de espécies de flebotomíneos envolvidos, e também das várias formas clínicas que esta doença se manifesta (GRIMALDI; TESH, 1993; MAROLI *et al.*, 2013).

Os agentes etiológicos da Leishmaniose são Protozoários do gênero *Leishmania*, que apresentam duas formas principais durante o ciclo de vida (Figura 2): a forma amastigota, aflagelar, imóvel que tem um núcleo relativamente grande e redondo e está presente nos vertebrados (CHANG; FONG; BRAY, 1985), e a forma promastigota, que é flagelada, longa e achatada com cinetoplasto na posição anterior do parasita, próximo ao flagelo, sendo encontrados nos invertebrados (WALTERS *et al.*, 1989; WALTERS, 1993; REY, 2001; MICHALICK; GENARO, 2005).

**Figura 2** – Protozoário *Leishmania* (A – forma Amastigota; B – forma Promastigota).



Fonte: Brasil (2017)

A LTA é uma doença de caráter zoonótico que acomete várias espécies de animais silvestres e domésticos, e ocasionalmente o homem (GRIMALDI; TESH, 1993). A doença se manifesta de diferentes formas clínicas. A forma cutânea apresenta lesões ulcerosas, indolores, única ou múltiplas; a forma mucocutânea é caracterizada por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas; forma disseminada apresenta múltiplas úlceras cutâneas por disseminação hematogênica ou linfática e forma difusa com lesões nodulares que não apresenta úlceras (NEVES, 2005).

A leishmaniose cutânea (LC) e mucocutâneas (LM) são endêmicas em 18 países das Américas, sendo os casos reportados à Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) com exceção da Guiana Francesa, reportados diretamente à França. Em 2016, 17 países endêmicos reportaram 48.915 casos de LC e LM, observando que os maiores números de registros foram feitos pelo Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru que juntos representaram 74,3% do total de casos na região (OPAS/OMS, 2018). Segundo a OPAS/OMS, 2018 os agentes etiológicos da Leishmaniose são as espécies: *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) lindenbergi*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) shawi*.

A leishmaniose visceral (LV) ocorre nas Américas, assim como na Europa, África, Ásia e Oriente Médio (LAINSON; SHAW, 1987). Segundo Lainson; Ward; Shaw (1977), o principal vetor no Novo Mundo, comprovadamente da LV é *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectado com o parasito *L. chagasi*. No entanto, as espécies *Nyssomyia antunesi* (RYAN; SILVEIRA; SHAW, 1984), *Lu. (Lutzomyia) cruzi* (SANTOS *et al.*, 1998; PITA-PEREIRA *et al.*, 2008) e *Lu. (Lutzomyia) forattinii* (PITA-PEREIRA *et al.*, 2008) já foram apontados como potenciais vetores da *L. (Leishmania) chagasi* no Brasil. No homem, a LV em sua forma clássica, caracteriza-se por apresentar sintomas como fadiga, febre de longa duração, perda de peso, aumento do fígado e baço, linfadenopatia e sinais de doença crônica (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

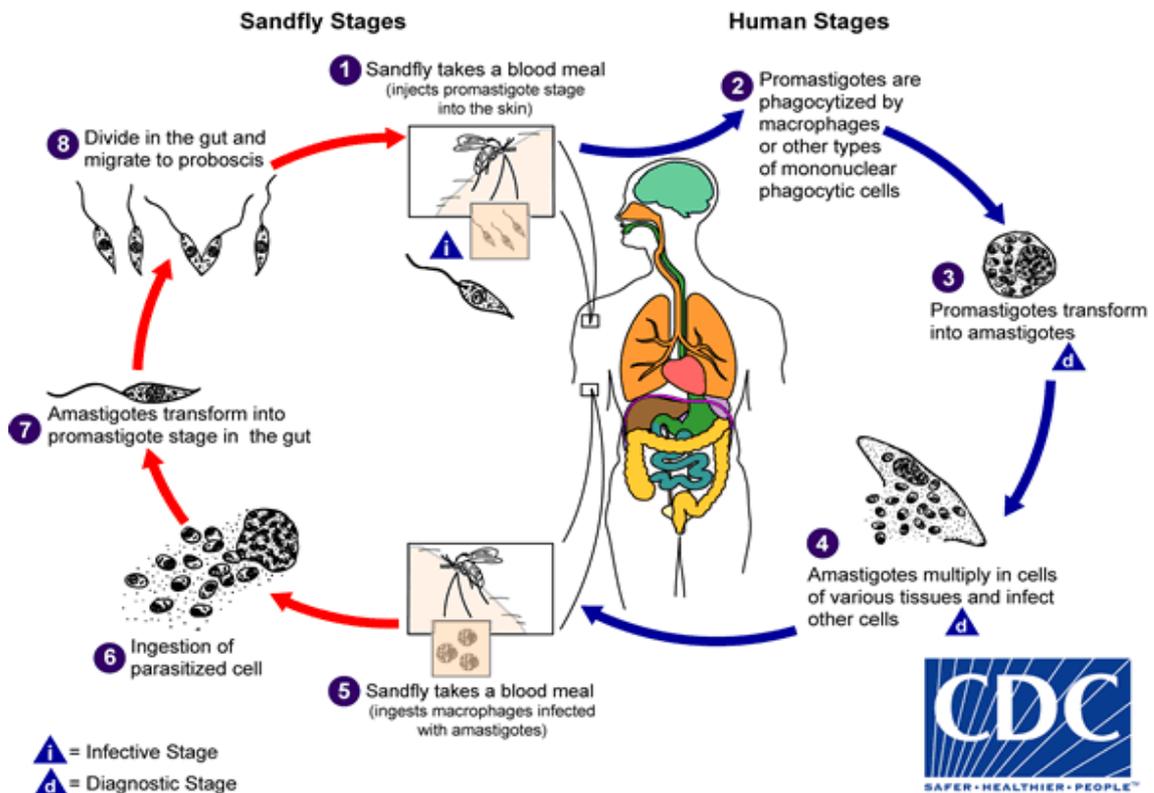
Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – AMAPÁ (SINAN) o município de Macapá foi o que mais teve casos confirmados notificados de LTA no ano de 2018, sendo registrados 208 casos, seguido do município de Pedra Branca do Amapará com 120 casos e Porto Grande com 87 casos notificados; o município de Ferreira Gomes foi o que menos apresentou notificação de LTA, somente um caso notificado. Destaca-se que as forma clínicas registradas no estado são as formas cutânea e a mucocutânea, não sendo notificado nenhum caso de LV no Amapá até o ano de 2017. Porém, no ano de 2018 houve o registro do primeiro caso de LV no estado, na capital Macapá, mas deve-se ressaltar que os casos registrados na capital podem não serem exclusivos de Macapá ou mesmo do estado do Amapá, uma vez que podem englobar os chamados casos importados, ou seja, são casos em que o paciente mora em outro município mas faz o tratamento na capital, por ser o único município que conta com Centro de Referência em Doenças Tropicais (CRDT), atendendo inclusive municípios do arquipélago de Marajó, pertencente ao estado do Pará.

### **1.2.1 Ciclo biológico da *Leishmania* sp.**

Durante o processo de alimentação do flebotomíneo é que ocorre a transmissão das Leishmanias para o hospedeiro vertebrado. Na tentativa da ingestão do sangue, as formas promastigotas são introduzidas no local da picada, onde esses flagelados são posteriormente interiorizados pelos macrófagos teciduais, que estende pseudópodos que envolvem o parasito, introduzindo-o para seu interior, envolto pelo vacúolo fagocitário (NEVES, 2010). As Leishmanias reproduzem-se por divisão binárias simples, longitudinal. Desta forma, o número de parasitos vai crescendo no interior do macrófago parasitado até que, por sua quantidade e capacidade de destruição citoplasmática na célula hospedeira, rompe-se a membrana dos

macrófagos e as amastigotas são liberados no meio intercelular, onde serão fagocitados por outros macrófagos ou poderão ser ingeridos por uma nova fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (Figura 03) (STUART *et al.*, 2008; PIMENTA *et al.*, 2018).

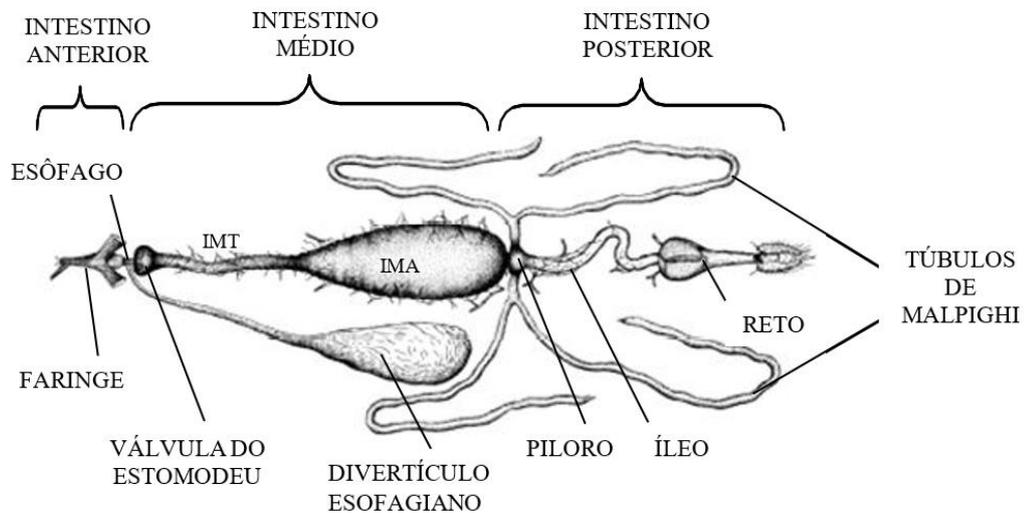
**Figura 3** – Ciclo biológico de *Leishmania* sp.



Fonte: CDC (2020)

A infecção do flebotomíneo ocorre quando a fêmea pica o homem ou o animal parasitado para realizar o repasto sanguíneo e juntamente com o sangue ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior ou ao chegarem ao estômago os macrófagos se rompem liberando as amastigotas (Figura 04), onde ocorre a transformação das amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica, e após esta se romper, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestório, onde se aderem pelo flagelo e se multiplicam. Após sofrerem divisão binária, as formas promastigotas procíclicas passam por um processo de diferenciação, denominado de Metaciclogênese. Durante este processo, os promastigotas apresentam o corpo celular reduzido, tornando-se bastante móveis e altamente infectantes e passam a ser denominados promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide e são regurgitados e transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada, recomeçando o ciclo (SACKS; PERKINS, 1984; NEVES, 2010; PIMENTA *et al.*, 2018).

**Figura 4** – Tubo digestivo de fêmea de Flebotomíneo.



IMT: Intestino Médio Torácico  
 IMA: Intestino Médio Abdominal  
 Fonte: Adaptado de Jobling (1987)

Lainson e Shaw (1987) propuseram uma classificação quanto a posição da forma promastigota das espécies de *Leishmania*, relacionado à distribuição desses parasitos dentro do trato digestivo do vetor: em suprapilárico ou peripilárico. Peripilárico está relacionado aos parasitos que estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento. Esses parasitos pertencem ao subgênero *Viannia*. Na classificação suprapilárico, o desenvolvimento desses parasitos é restrito a porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio, e análogo ao comportamento peripilárico, os parasitos migram para as porções mais anteriores, onde podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado. O subgênero que se enquadra nessa classificação é o *Leishmania*.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos flebotomíneos terem papel determinante no ciclo de transmissão da Leishmaniose, a fauna de flebotomíneos do Estado do Amapá tem sido pouco estudada, principalmente se comparada às regiões vizinhas como o Estado do Pará e a Guiana Francesa. Na maioria dos mapas de distribuição de flebotomíneos, o Amapá se configura como região pouco amostrada e pobre em dados para o grupo. Nesse sentido, é necessário realizar levantamentos da fauna de flebotomíneos, visando expandir o conhecimento das áreas de ocorrência desses vetores, bem como auxiliar projetos conservacionistas, de forma que entender a dinâmica populacional dos flebotomíneos pode se mostrar como importante fator para a aplicação de políticas de controle epidemiológico (MARINHO *et al.*, 2008). Os poucos estudos realizados até o momento se concentraram principalmente em áreas de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) associadas ao garimpo de minérios (FORATTINI 1959, 1960; FREITAS; NAIFF; BARRET, 2002), ou a levantamentos da fauna de flebotomíneo (BRAZIL; ANDRADE FILHO; FALCÃO, 2000; SARAIVA; SOUTO; FERREIRA, 2011).

Grande parte das florestas tropicais nativas da Amazônia tem sido utilizada de forma insustentável, o que significa grande perda da vegetação e, portanto, perda da diversidade de espécies, bem antes que se possa conhecer essa valiosa diversidade (SOUZA *et al.*, 2006). No entanto, o Amapá é reconhecido, dentre os estados da Amazônia brasileira, como o mais preservado quando se trata de questões ambientais, especificamente da conservação florestal. Haja vista que o Amapá dispõe de 72% da área territorial como área protegida por lei (CARVALHO, 2010).

Levando em consideração que o Amapá é um dos estados mais protegidos ambientalmente, pode-se considerar que esta área apresenta possivelmente aumento na variabilidade genética entre as espécies de flebotomíneos. No entanto, o Amapá apresenta poucas pesquisas que visam contribuir com a identificação e na caracterização das espécies de flebotomíneos circulantes no estado.

Portanto, esta pesquisa dispõe de dados que poderão servir para orientar a criação de Políticas públicas que visarem à adoção de métodos de controle para diminuir a densidade da população de flebotomíneos em determinadas áreas, bem como para subsidiar os órgãos da saúde no controle vetorial e na prevenção das Leishmanioses. Colacicco-Mayhugh; Masuoka; Grieco, 2010 expõem que pesquisas visando a identificação e distribuição espacial e temporal das populações de flebotomíneos são essenciais para definir áreas vulneráveis ou favoráveis à

transmissão da leishmaniose e também para melhor compreensão da epidemiologia das outras doenças.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LEVANTAMENTO ENTOMOLÓGICO

O conhecimento da fauna flebotomínica e o estudo do comportamento de algumas espécies vêm sendo objeto de vários estudos (REBÊLO *et al.*, 1999; BARROS; REBÊLO; SILVA, 2000; BARATA *et al.*, 2004; SILVA; FREITAS; FRANCO, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010; ROMERO-RICARDO *et al.*, 2016), no entanto, em algumas regiões brasileira, o conhecimento da fauna destes vetores ainda é escasso.

Estudos realizados por Arias e Freitas (1982), Ready, Lainson e Shaw (1983), Cabanillas e Castellón (1999) e Castellón *et al.* (2000) indicam que a adaptação dos flebotomíneos às áreas urbanas vem ocorrendo devido ao crescimento das cidades, e também das áreas rural, selecionando assim as espécies de flebotomíneos que melhor se adaptaram as alterações ambientais. Rutledge e Ellenwood (1975) indica que o aumento e diminuição da população de flebotomíneos está relacionada com o período de chuvas, tendo em vista que este fator influência na condição do solo, que serve como criadouro. Enquanto que, para Barata *et al.* (2005) há uma relação direta entre a busca por alimento e a densidade populacional dos flebotomíneos, tendo em vista que em alguns ambientes, principalente quando há interferência humana, é necessário que haja adaptação desta população, sendo este um fator determinante para a ocorrência dos flebotomíneos em áres de forte presença humana.

Para Galati (2003) a Região Amazônica é uma das mais diversas em gêneros e espécies do grupo de flebotomíneos. No estado do Amapá, as espécies de flebotomíneos de importância médica registradas são: *Ny. ylephiletor* (FORATTINI, 1959), *Ny. anduzei* (FORATTINI, 1959; FREITAS; NAIFF; BARRET, 2002), *Ny. richardwardi* (BRAZIL; ANDRADE FILHO; FALCÃO, 2000); *Ny. antunesi* (FREITAS; NAIFF; BARRET, 2002), *Ny. whitmani* (FREITAS; NAIFF; BARRET, 2002), *Ny. umbratilis* (FREITAS; NAIFF; BARRET, 2002), *Ny. yuilli pajoti* (FREITAS; NAIFF; BARRET, 2002), *Bichromomyia flaviscutellata* (FURTADO *et al.*, 2016; VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2018).

No levantamento entomológico feito por Freitas, Naiff e Barret (2002) no município de Porto Grande foram identificadas além das espécies de flebotomíneos já caracterizadas em estudos no Pará e Guiana Francesa, espécies sem registro anterior no estado como: *Lu. (Tricholateralis) evangelistai*, *Pintomyia (Pintomyia) damascenoi*, *Evandromyia williamsi*, *Micropygomyia (Micropygomyia) chassigneti*, *Psathyromyia (Xiphopsathyromyia) dreisbachi*, e ainda o primeiro registro de *Trichophoromyia ininii* em território brasileiro. Em um estudo

realizado por Souza *et al.* (2017) no município de Serra do Navio, foram registradas 53 espécies de flebotomíneos, destas, foi identificado pela primeira vez a ocorrência de cinco espécies no estado: *Ev. bacula*, *Pa. runoides*, *Psychodopygus carrerai*, *Br. beaupertuyi*, primeiro registro no Brasil, e *Br. pintoi*.

### 3.2 IMPORTÂNCIA VETORIAL DOS FLEBOTOMÍNEOS

No continente Americano, sabe-se que 56 espécies de flebotomíneos são vetores em potencial de 15 espécies de *Leishmania* (MAROLI *et al.*, 2013). De acordo com Gil *et al.* (2003), na Amazônia as espécies do gênero *Psychodopygus* são comprovadas como importantes vetores de espécies de *Leishmania* causadoras da LC. Segundo Marcondes (2001) e Neves (2010), as espécies *Ny. whitmani*, *Ny. umbratilis* e *Th. ubiquitalis* são vetores de *Leishmania spp.* causadoras da LC (Tabel 01).

**Tabela 1** – Principais agentes etiológicos e seus vetores e os tipos de leishmaniose.

AGENTE ETIOLÓGICO	TIPOS DE LEISHMANIOSES	VETORES
<i>L. guyanensis</i>	Leishmaniose Cutânea	<i>Ny. umbratilis</i> , <i>Ny. anduzei</i> , <i>Ny. Whitmani</i>
<i>L. amazonenses</i>	Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Bi. flaviscutellata</i> , <i>Lu. longipalpis</i> , <i>Bi. Olmeca</i>
<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Mucocutânea	<i>Ny. whitmani</i> , <i>Ny. intermedia</i> , <i>Ps. wellcomei</i> , <i>Ps. complexus</i> , <i>Ny. neivai</i> , <i>Ev. edwardsi</i> , <i>Mi. migonei</i> , <i>Pi. Pessoai</i>
<i>L. infantum</i>	Leishmaniose Visceral	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i> , <i>Lu. almerio</i> , <i>Ev. Salesi</i>
<i>L. lainsoni</i>	Leishmaniose Cutânea	<i>Th. Ubiquitalis</i>
<i>L. shawi</i>	Leishmaniose Cutânea	<i>Ny. Whitmani</i>
<i>L. naiffi</i>	Leishmaniose Cutânea	<i>Ps. squamiventris</i> , <i>Ps. paraensis</i> , <i>Ps. amazonensis</i> , <i>Ps. ayrozai</i>
<i>L. lindenbergi</i>	Leishmaniose Cutânea	<i>Desconhecido</i>

Fonte: Basano e Camargo (2004); WHO (2010); OPAS/OMS (2018)

A espécie *Ny. whitmani*, em pesquisa realizada por Saraiva, Souto e Ferreira (2011) no município de Porto Grande, foi a espécie com maior abundância entre os indivíduos coletados, e em estudo realizado por Souza *et al.* (2017), em Serra do Navio, a espécie *Ny. umbratilis* apareceu como a mais frequente. Segundo Marcondes (2001), *L. (Viannia) braziliensis* e *L. shawi* são espécies que têm sido encontradas infectando *Ny. whitmani*, enquanto que *L. guyanensis*, causadora da LC, é comumente encontrada infectando *Ny.*

*umbratilis*, espécie esta que aparece como o vetor mais importante deste parasita causador da LC (WARD; FRAIHA, 1977).

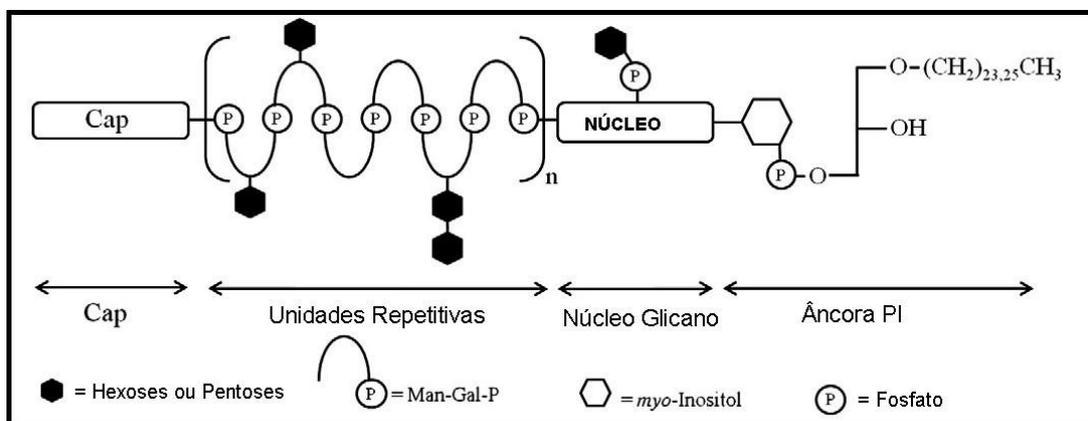
Gomes e Galati (1987) ressaltam que a espécie *Ny. intermedia* ocorre em ambiente com grande influência humana, sendo esta espécie o principal vetor da *L. (V.) braziliensis* e vetor secundário a espécie *Migonemyia (Migonemyia) migonei* (RANGEL; LAINSON, 2009). Em estudos realizados em Rondônia, Grimaldi *et al.* (1991) isolaram parasitas identificados como *L. (Viannia) braziliensis* do flebotomíneo *Ps. davisi*, um flebotomíneo com ocorrência em toda a Amazônia. *Bi. flaviscutellata* é uma espécie zoofílica, cujo habitat são áreas de floresta, e é considerada agente vetor da *L. (Leishmania) amazonensis* responsável pela Leishmaniose Cutânea Difusa (SHAW; LAINSON; WARD, 1972; WARD; FRAIHA, 1977).

### 3.3 INTERAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) a interação do flebotomíneo com as diferentes espécies de *Leishmania* pode ocorrer de forma específica, em que uma espécie de flebotomíneo possibilita a infecção de apenas uma espécie de *Leishmania* ou de forma permissiva, onde este vetor permite a sobrevivência de diferentes espécies do parasito.

Pimenta *et al.* (1994) foram os primeiros a realizarem experimentos atribuindo o conceito de que a adesão ao intestino do flebotomíneo é espécie-específica e dependente do polimorfismo da molécula de lipofosfoglicano (LPG) (Figura 5). O LPG é o glicoconjugado majoritário que está presente em toda a superfície da forma infecciosa da *Leishmania*, formas promastigotas, estando organizado na forma de glicocálix filamentoso (PIMENTA *et al.*, 1989).

**Figura 5** – Estrutura da molécula de LPG.



Fonte: Adaptado de Assis *et al.* (2012)

Desta forma, o polimorfismo inter e intraespecíficos do LPG está relacionado à sua função como ligante do parasito aos receptores do intestino do vetor, que em alguns casos

explica a competência vetorial espécie-específica. Quando o parasito não adere à parede do epitélio do vetor, ao fim da digestão do sangue pelo inseto os parasitos são eliminados. Esta adesão das promastigotas ao epitélio do tubo digestivo do flebotomíneo é ocasionada pelo LPG (PIMENTA *et al.*, 1994; SACKS; PERKINS, 1984; SARAIVA *et al.*, 1995).

Vários estudos demonstraram que o LPG de superfície dominante das promastigotas protege os parasitos contra condições adversas, tais como a necessidade de escapar da matriz peritrófica, a eliminação de parasitos com os produtos sanguíneos digeridos e a necessidade de desenvolver formas infecciosas que possam ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado, evitando a perda do parasito no intestino (BOROVSKY; SCHLEIN, 1987; SACKS, 1992; PIMENTA *et al.*, 1997; KAMHAWI, S. *et al.*, 2000).

Segundo Turco e Descoteaux (1992) e Sacks *et al.* (1994), o polimorfismo na molécula de LPGs ocorre devido a variação na sua composição e frequência dos açúcares das cadeias laterais que estão ligadas à região conservada de unidades repetitivas e “cap”. As análises das estruturas do LPG de diferentes espécies de *Leishmania* revelaram a completa conservação da âncora lipídica, do core e da estrutura básica Gal $\beta$ 1,4 Man $\alpha$ 1-PO<sub>4</sub> da região de unidades repetitivas, exceto as cadeias laterais (ILG *et al.*, 1992; MCCONVILLE *et al.*, 1990; ORLANDI; TURCO, 1987) (Figura 5).

As espécies *L. mexicana* (ILG *et al.*, 1992), *L. chagasi* (SOARES *et al.*, 2002; COELHO-FINAMORE *et al.*, 2011), *L. braziliensis* (MUSKUS *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2005), *L. shawi* (PASSERO *et al.*, 2015) e *L. amazonensis* (NOGUEIRA *et al.*, 2016), já tiveram a estrutura do LPG caracterizado. O LPG presente na espécie *L. chagasi* apresenta uma  $\beta$ -glicose nas cadeias laterais das unidades repetitivas (SOARES *et al.*, 2002; COELHO-FINAMORE *et al.*, 2011). Após a metaciclogênese, esta  $\beta$ -glicose desaparece. Em *L. braziliensis* as formas promastigotas procíclicas não possuem cadeias laterais em suas unidades repetitivas e as metacíclicas possuem 1-2  $\beta$ -glicoses (SOARES *et al.*, 2005). Essas modificações bioquímicas resultam em diferentes padrões de adesão ao intestino médio de alguns vetores (SOARES *et al.*, 2010).

A perda específica de LPG nas espécies *L. major* e *L. donovani* compromete a capacidade dos parasitos de sobreviverem no trato digestivo do flebotomíneo, assim como iniciar infecção em macrófagos (SACKS *et al.*, 2000; PIMENTA *et al.*, 1994; CAPPAL *et al.*, 1994). Desta forma, as moléculas de LPG apresentam como função, dentre outras, além da adesão e especificidade ao intestino médio do flebotomíneo, a resistência à ação das enzimas

digestivas e, no hospedeiro vertebrado, a inibição do processo de maturação dos fagossomos (SACKS; KAMHAWI, 2001; PIMENTA *et al.* 1994, 1997).

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para Ebrahimi, Bordbar e Parvizi (2016) a correta identificação de espécies de flebotomíneos através de análises moleculares é uma ótima alternativa para inferir as características epidemiológicas, assim como a distribuição de populações naturais em áreas ainda não estudadas. Segundo Oliveira-Pereira *et al.* (2006), identificar espécies vetoras, bem como determinar a taxa de infecção natural, representa grande importância para entomologia médica, sobretudo, considerando uma região endêmica.

A identificação de espécies através da identificação molecular pode ser mais rápida e confiável, quando comparada com a identificação morfológica, não necessitando de pré-requisitos como sexo e estágio de desenvolvimento (HEBERT *et al.*, 2003). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica na biologia molecular bastante sensível e específica, sendo possível a partir do uso desta técnica detectar o DNA ou RNA de parasita (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; WILSON, 1995), em diagnóstico humano (SILVA *et al.*, 2004), canino (LACHAUD *et al.*, 2002) e em flebotomíneos (MICHALSKY *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2004, 2007), sendo também útil na caracterização de isolados humanos (PEREIRA *et al.*, 2008).

A técnica de PCR, sendo ela muito sensível e específica, possibilita a identificação independente do número e do estágio de desenvolvimento do parasita, como também da localização deste parasita dentro de intestino do vetor (PEREZ *et al.*, 1994) e tem sido utilizada com sucesso nos estudos de competência vetorial dos flebotomíneos (ARANSAY; SCOULICA; TSELENTIS, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 1999).

Além da PCR, outras variações deste método molecular como PCR multiplex (PITA-PEREIRA *et al.*, 2005, 2008), PCR-RFLP (PCR-polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (TIWARY *et al.*, 2012; MINTER *et al.*, 2013) e RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (SEBLOVA *et al.*, 2013; DE SOUZA ROCHA *et al.*, 2007) podem ser utilizadas para a identificação de espécies de flebotomíneos.

Atualmente há duas técnicas mais utilizadas para identificação molecular de flebotomíneos: a Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição - PCR-RFLP (TERAYAMA *et al.*, 2008; LATROFA *et al.*, 2012; TIWARY *et al.*, 2012; MINTER *et al.*, 2013) e DNA barcoding (KUMAR; SRINIVASAN;

JAMBULINGAM, 2012; CONTRERAS GUTIERREZ *et al.*, 2014; ROMERO-RICARDO *et al.*, 2016; MEJÍA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018).

Para Latrofa *et al.* (2012) a PCR-RFLP é uma ferramenta molecular útil e rápida e em contraponto, ressalta que a identificação pela morfologia precisa de uma grande experiência, bem como bastante conhecimento taxonômico. Esta técnica molecular tem sido usada para a identificação de flebotomíneos em diversas regiões como na Bacia Mediterrânea (LATROFA *et al.*, 2012), o Novo Mundo (TERAYAMA *et al.*, 2008; FUJITA *et al.*, 2012; MINTER *et al.*, 2013; HUGHES *et al.*, 2014) e Índia (TIWARY *et al.*, 2012).

O DNA barcoding está entre as ferramentas mais utilizadas para a identificação molecular, na qual se faz uso de um fragmento do gene codificador de proteína do DNA mitocondrial (mtDNA): Citocromo C Oxidase I (COI). Esta região é de grande importância para facilitar os inventários de biodiversidade, bem como para identificações das espécies (HEBERT *et al.*, 2003).

### 3.4.1 DNA Mitocondrial

A partir das décadas de 1970 e 1980, o DNA mitocondrial (mtDNA) passou a fazer parte de muitos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas, e ainda, como forma de entender os diversos aspectos biológicos e evolutivos de vários organismos (WILSON *et al.*, 1985; AVISE *et al.*, 1987; MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987). O DNA mitocondrial apresenta algumas características, como tamanho relativamente pequeno, a alta taxa de mudança evolutiva e a herança materna, que o torna adequado para a análise de populações, como também sobre a história e a evolução entre táxons estreitamente relacionados (WILSON *et al.*, 1985; SIMON *et al.*, 1994; HARRISON, 1989). Conteúdo gênico conservado, regiões intergênicas pequenas ou ausentes, raramente apresenta sequências repetitivas, pseudogenes, íntrons e elementos transponíveis (MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987).

O genoma mitocondrial é formado por uma molécula circular de DNA dupla fita de aproximadamente 15000 a 20000 pares de bases (pb), exceto em algumas espécies. Apresenta, de forma geral, 13 genes codificadores de proteínas (três para as subunidades da enzima Citocromo oxidase - COI, II e III, um para o Citocromo B, dois para as subunidades da ATPase - 6 e 8 e sete para as subunidades da NADH desidrogenase), 22 genes codificadores de RNA transportador (tRNA), 2 genes de RNA ribossômico (rRNA) e uma região de 1000 pb,

responsável pelo início da replicação e transcrição chamada região controle (DE LA CRUZ; NECKELMANN; SIMPSON, 1984; BOORE, 1999).

Dos 37 genes que formam o genoma mitocondrial, o gene COI mostrou-se como uma região padrão para a identificação de diversas espécies de invertebrados e vertebrados (HEBERT *et al.*, 2003). Sendo este gene um dos maiores genes codificadores de proteínas, e como uma de suas características, apresenta uma sequência de DNA bastante conservada (SIMON *et al.*, 1994). Assim, o COI cada vez mais está sendo utilizado em pesquisas de estrutura filogeográfica e genética populacional de insetos (SIMON, *et al.*, 1994; PRAMUAL *et al.*, 2005; SCARPASSA; CARDOZA; CARDOSO-JÚNIOR, 2008). Destacando portanto, uma região notavelmente promissora na identificação de espécies em insetos (HAJIBABAEI *et al.*, 2006; VIRGILIO *et al.*, 2010). Assim, as pesquisas envolvendo o genoma mitocondrial, vem destacando cada vez mais a sua importância na análise filogenética, como também na identificação biológica e em estudos populacionais, em decorrência à sua rápida taxa evolutiva, baixa recombinação e herança materna (BOORE; LAVROV; BROWN, 1998; BOORE, 1999).

O gene COI, através dos estudos já realizados, aparece como uma ótima ferramenta para estudar insetos de importância médica, bem como para uma identificação rápida e precisa de espécies que estão presentes em uma área de transmissão (BESANSKY; SEVERSON; FERDIG, 2003; JINBO; KATO; ITO, 2011; HEBERT *et al.*, 2003) como por exemplo, os flebotomíneos (ROMERO-RICARDO *et al.*, 2016; SCARPASSA; ALENCAR, 2013; MEJÍA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018).

#### **4 HIPÓTESE**

O estado do Amapá apresenta uma diversidade de ambientes entre municípios que está relacionada a um padrão diferenciado de distribuição de Flebotomíneos entre os diferentes locais, e essa diversidade pode ser avaliada através de técnicas de biologia molecular com precisão e rapidez.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a distribuição das espécies de flebotomíneos nos municípios do estado do Amapá, através da identificação a partir da técnica do DNA Barcoding tendo como alvo a região do COI do DNA mitocondrial.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as espécies de flebotomíneos circulantes no Amapá, utilizando o gene COI do DNA mitocondrial;
- Criar um panorama a respeito dos locais onde há a presença de Flebotomíneos de importância médica.
- Inferir a relação evolutiva das espécies de flebotomíneos coletadas no Amapá.

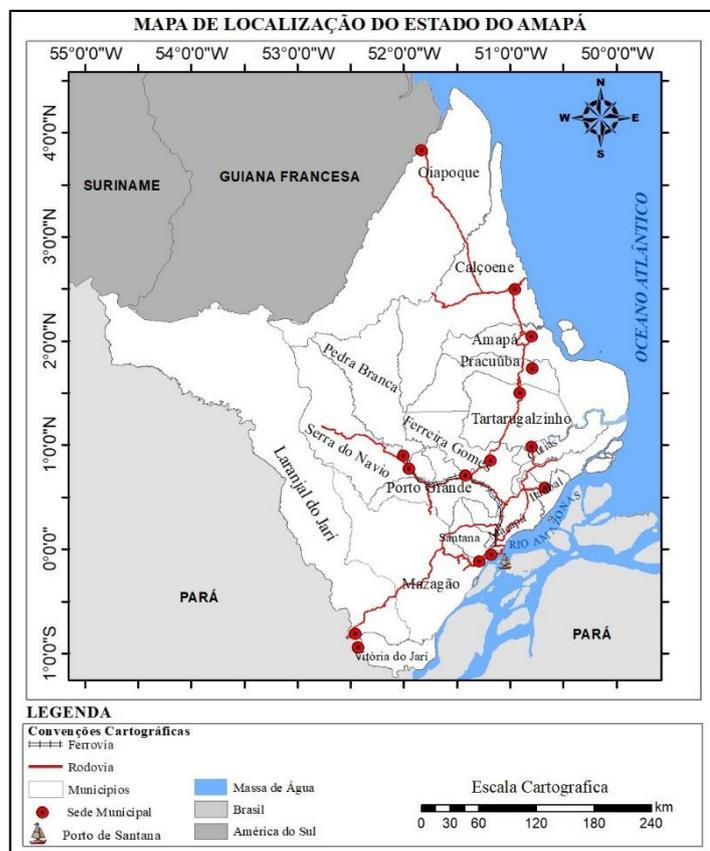
## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 ÁREA DE ESTUDO

O Amapá está localizado na parte setentrional do Brasil, na Amazônia brasileira, na margem esquerda do rio Amazonas. Tendo como fronteira, do norte ao noroeste, margeando o rio Oiapoque, a Guiana Francesa e o Suriname; ao oeste, sul e sudeste, o estado do Pará, através dos rios Jari e Amazonas; e, enquanto nordeste, as fronteiras são marítimas: com o oceano Atlântico e a foz do rio Amazonas (FILOCREÃO, 2015).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2018), o Amapá possui uma extensão territorial de 142.470,762 km<sup>2</sup> e uma densidade demográfica de 4,69 hab/km<sup>2</sup>, tendo seu território dividido em 16 municípios: Oiapoque, Calçoene, Serra do Navio, Laranjal do Jari, Pracuúba, Amapá, Tartarugalzinho, Ferreira Gomes, Cutias do Araguari, Pedra Branca do Amapari, Porto Grande, Itaubal do Piriirim, Macapá, Mazagão, Santana e Vitória do Jari (Figura 6).

**Figura 6** – Mapa da delimitação dos 16 municípios do estado do Amapá.



Fonte: Adaptado de Santos (2019)

## 6.2 COLETA ENTOMOLÓGICA

Os flebotomíneos foram coletados nos 16 municípios do estado do Amapá no período de junho a agosto de 2017 (Tabela 02), durante o período de maior abundância, utilizando-se métodos de captura com armadilhas CDC (SOLOMON *et al.*, 2008). As três ferramentas de capturas foram colocadas, cada uma, a uma distância de 50, 100 e 150 metros da borda da mata, das 18:00h às 06:00h, por três dias consecutivos. Após a coleta, os insetos foram fixados em tubos do tipo Falcon de 50 mL contendo álcool 70% (CASTELLÓN *et al.*, 2000), e encaminhados ao laboratório de artrópodes – ARTROLAB – Universidade Federal do Amapá, para análise.

**Tabela 2** – Pontos de coletas realizados nos municípios do estado do Amapá, no ano de 2017.

MUNICÍPIO	PONTOS DE COLETA	DATA DA COLETA (2017)
Porto grande	Assentamento Nova Canaã	03/04 – 05/04
Itaubal do Pirirí	Curicaca	13/04 – 15/04
Macapá	Fazendinha	18/04 – 20/04
Santana	Ilha de Santana	22/04 – 24/04
Oiapoque	Clevelândia do Norte	08/05 – 10/05
Calçoene	Lourenço	12/05 – 14/05
Amapá	Assentamento Cruzeiro	16/05 – 18/05
Pracuúba	Agroviola	20/05 – 22/05
Tartarugalzinho	Cedro	26/05 – 28/05
Ferreira Gomes	Zona Rural	31/05 – 02/06
Cutias do Araguari	Zona rural	04/06 – 06/06
Serra do Navio	Colônia de Água Branca	15/06 – 17/06
Pedra Branca do Amaparí	Zona Rural	19/06 – 21/06
Mazagão	Camaipi	11/07 – 13/07
Laranjal do Jarí	Comunidade Arapiranga	23/08 – 25/08
Vitoria do Jarí	Igarapé das Pacas	26/08 – 28/08

Fonte: Autora (2020)

## 6.3 TRIAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA

Os insetos foram triados em microscópio estereoscópico (Zeiss), separando-se os flebotomíneos fêmeas e machos, que foram levados ao laboratório de biologia molecular da UNIFAP. O DNA total foi extraído utilizando-se a técnica de digestão com proteinase K, onde cada Flebotomíneo foi macerado em 500 µL de solução de lise (NaCl 5M 22,2µL, SDS 10% 50µL, EDTA 0,5M 1µL, Tris 1M 5µL, Proteinase K 5µL e 416,8 µL de água para injeção), e mantido em Banho Maria *overnight* à 42°C, seguido de extração orgânica com clorofórmio

(SAMBROOK; RUSSELL, 2001), pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  (Clorofórmio) e agitado em vortex por 1 min. Em seguida o material foi colocado na centrífuga por 5 min à 14600g em 4°C; após isto, foi recuperado o sobrenadante e transferido para um novo microtubo do tipo eppendorf, sendo esta primeira etapa da extração orgânica repetida mais uma vez. Após isso, foi adicionado 50 $\mu\text{L}$  de NaOAc 3M e 1mL de Etanol 100% a -20°C, agitado em vortex por 30 s e depois armazenado a -20°C por, no mínimo 1 h. Passado esse tempo, as amostras foram colocadas na centrífuga por 15 min à 14600g à 4°C e posteriormente foi descartado o sobrenadante, adicionado 500 $\mu\text{L}$  de Etanol 70% a -20°C e levados a centrífuga por mais 5 min à 12000 rpm à 4°C, sendo novamente o sobrenadante descartado. Após isto, o material foi mantido aberto em temperatura ambiente por 5 min para secagem e posteriormente ressuspensão do material genético em 100 $\mu\text{L}$  de água para injeção, agitado em vortex por 10 s e armazenado até o processamento a -20°C.

#### 6.4 PCR DE DNA

Os DNAs extraídos das amostras foram submetidos ao processo de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), para amplificar a região do Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do DNA Mitocondrial, utilizando os *primers* LCO 1490 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' e o HCO 2198 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3', descrito por Folmer *et al.*, (1994), apresentando fragmento de aproximadamente 700 pb. As PCRs foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Saiki *et al.* (1986), em que para a reação foram utilizados os seguintes reagentes e concentrações: 5 $\mu\text{L}$  de *Burfffer* 10X, 1 $\mu\text{L}$  de *Primer* LCO 1490 (10mM), 1 $\mu\text{L}$  de *Primer* HCO 2198 (10mM), 4 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 1 $\mu\text{L}$  de dNTP (10mM de cada base nitrogenada), 0,4 $\mu\text{L}$  da enzima Taq DNA Polymerase (Fermentas®) 5U/ $\mu\text{L}$ , 2 $\mu\text{L}$  de DNA da amostra e 35,6 $\mu\text{L}$  de água para injeção, para volume final da reação em 50 $\mu\text{L}$ . Foi utilizado o Termociclador Life Eco da marca Bioer, com as seguintes programações de temperatura: para a desnaturação inicial foi mantido em 94°C por 10 min, seguido de 35 ciclos com desnaturação à 94°C por 20 s, associação dos *Primers* à 58°C por 20 s e extensão à 72°C por 1 min. Ao final do último ciclo a amostra foi mantida a 72°C durante 10 min, para que a enzima finalize a extensão de possíveis fragmentos.

Após visualização das bandas de DNA em gel de agarose como descrito a seguir, as amostras que não amplificaram passaram por nova PCR, porém foi aumentado o volume de amostra, utilizando-se para esta reação até 20 $\mu\text{L}$  de DNA extraído.

## 6.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As amostras obtidas pela PCR foram fracionadas por eletroforese em gel de Agarose 3% para volume de 150mL, em tampão TAE (Tris-Acetato), com uma voltagem de 150 V corado com brometo de etídio e, por fim, verificado em transiluminador UV e fotografado.

## 6.6 PURIFICAÇÃO DE DNA

Para a purificação de DNA foram utilizadas as bandas de DNA mais visíveis após a amplificação e eletroforese em gel de agarose. Com auxílio de bisturi e sob a luz ultravioleta, foram recortadas e colocadas em eppendorf de 1,5ml os fragmentos das bandas amplificadas para posterior pesagem. Em seguida foi utilizado o kit *Zymoclean™Gel DNA Recovery* (ZIMO, USA) para purificação, conforme instrução do fabricante, através da adição do tampão ADB (volume correspondente a 3 vezes o valor do peso de cada banda de DNA) e incubadas a 55°C por 10 min, até o gel dissolver completamente. Em seguida, a solução foi transferida para a coluna e centrifugada por 30s a 14600g, e depois descartada. Posteriormente, iniciou-se a etapa de lavagem do DNA, através da adição de 200µL de *DNA Wash Buffer* e centrifugação por 30 s e novo descarte da solução, etapa esta realizada por 2 vezes. Em seguida, a coluna foi colocada dentro de um eppendorf de 1,5mL e adicionado 15µL de *DNA Elution Buffer* na coluna, permanecendo na bancada por 5 min seguido de centrifugação a 14600g por 1 min. Esta etapa foi realizada 2 vezes, totalizando, portanto, um volume de 30µl de DNA purificado, que foi armazenado em freezer à -20°C. até o envio para sequenciamento por método de Sanger por empresa terceirizada utilizando-se os iniciadores LCO1490 ou HCO2198.

## 6.7 ANÁLISE DE DADOS

As sequências obtidas tiveram seus eletroferogramas em formato ABI analisados visualmente no programa FinchTV v1.4 (Geospiza) para conferir a qualidade do sequenciamento. Posteriormente as sequências “*Forward*” e “*Reverse*” foram alinhadas no programa SeqTrace0.9 (Stucky, 2012) para produzir as sequências consenso, as quais foram comparadas com as sequências disponíveis nos bancos de dados públicos BOLD (*Barcode of Life Data System V4* [<https://www.boldsystems.org/>]) e no banco de dados genético GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do algoritmo *BlastN* para identificação taxonômica. Em seguida as sequências foram editadas (retirada dos iniciadores) e alinhadas no programa MEGA X (TAMURA *et al.*, 2018) pelo algoritmo Clustal W, sucessivamente foi utilizado o software GBLOCKS (CASTRESANA, 2000) para seleção de posições homólogas no conjunto de dados, considerando as posições mais conservadas, as quantidades de gaps e a variabilidade dos sítios que flanqueiam essas posições. Para confirmar a identidade de cada amostra foi usando o critério de maior identidade. Para inferir as espécies foi adotado o valor de identidade entre 98% a 100%, valores inferiores a esta porcentagem foram considerados como classificação somente em nível de gênero.

## 6.8 RELAÇÕES EVOLUTIVAS

Para a análise de relações evolutivas entre os espécimes, foram construídos cladogramas envolvendo 84 sequências nucleotídicas, utilizando: o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) para verificar a similaridade, e os métodos de inferência filogenética *Neighbor Joining* (NJ) utilizando o modelo Kimura2parameter (k2P) para a correção de distâncias nucleotídicas, e Máxima Verossimilhança (MV) que é um método que se baseia em hipóteses com métodos evolutivos biológicos explícitos. As análises e a geração das árvores (*tree*) foram realizadas no programa MEGA X (TAMURA *et al.*, 2018). Para todas as árvores foi realizado o teste de *bootstrap* (500 repetições).

## 6.9 ESTATÍSTICA

Os valores do número de espécies coletadas por área de coleta foram representados por médias e seus respectivos desvios, e a homogeneidade da distribuição foi testada pelo teste do Qui-quadrado para avaliação de possível irregularidade de distribuição entre as diferentes áreas. Foi usado o valor de alfa de 5%, aceitando-se como diferenças significativas aquelas que tiverem então um valor-*p* menor do que 5%.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 COLETA E ANÁLISE DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS

Após as coletas realizadas no estado do Amapá, nos 16 municípios, foram coletadas 599 Flebotomíneos, conforme a Tabela 03. O município que teve o maior número de espécimes coletados foi Laranjal do Jari, com 137 flebotomíneos fêmeas e 127 machos, com um total de 264 espécimes, seguidos dos municípios de Porto Grande com 159 espécimes e Oiapoque com 71 espécimes coletadas. Os municípios de Mazagão e Ferreira Gomes, foram os únicos municípios em que não foram coletados nenhum flebotomíneo. Um número estatisticamente significativo maior de fêmeas foi coletado, e esta diferença significativa também foi encontrada nas coletas de Porto Grande e Serra do Navio.

**Tabela 3** – Discriminação dos flebotomíneos quanto ao sexo e o total de espécime coletado em cada município amapaense. Linhas marcadas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em teste do Qui-quadrado de comparação entre os sexos.

MUNICÍPIO	M	F	TOTAL
Mazagão	0	0	0
Porto Grande*	53	106	159
Itaubal do Pírim	2	1	3
Macapá	2	3	5
Santana	1	0	1
Oiapoque	30	41	71
Calçoene	6	6	12
Amapá	0	1	1
Pracuúba	7	3	10
Tartarugalzinho	3	2	5
Serra do Navio*	5	18	23
Pedra Branca do Amaparí	0	1	1
Ferreira Gomes	0	0	0
Vitoria do Jarí	21	18	39
Laranjal do Jarí	127	137	264
Cutias do Araguari	2	3	5
<b>TOTAL*</b>	<b>259</b>	<b>340</b>	<b>599</b>

M: Macho

F: Fêmea

Fonte: Autora (2020)

Na distribuição dos flebotomíneos no estado, tomando-se como base a coleta deste estudo, observou-se que os locais em que as armadilhas estavam a 50 m da borda da mata

apresentaram o maior número de espécimes coletados, sendo registrado 311 espécimes nestes pontos, o que representa 52% do total de flebotomíneos coletados, significativamente maior que os valores de 29% e 19% encontrados a 100 m e 150 m respectivamente, quando avaliados por teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%. A diferença significativa também foi encontrada nos municípios de Porto Grande, Serra do Navio, Vitória do Jari e Laranjal do Jari, todos estes com o ponto mais próximo da borda da mata (50 m) apresentando o maior número de insetos coletados. Ressalta-se que no município de Oiapoque houve a ocorrência inversa em relação aos outros municípios, apresentando o maior número de insetos coletado na distância de 150 m da borda da mata. Este ocorrido pode ser explicado pelo fato de que, antes da instalação das armadilhas na localidade de Oiapoque, obtivemos relatos de moradores de que havia sido realizada dedetização com fumacê na vila, próximo da mata onde foi realizada a coleta. (Tabela 4).

**Tabela 4** – Distribuição de Flebotomíneo coletado em relação à distância para o ponto de coleta, e sexo. Linhas marcadas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em teste do Qui-quadrado de comparação entre as distâncias de coleta.

MUNICÍPIO	50 m		100 m		150 m		TOTAL
	M	F	M	F	M	F	
Macapá	2	1	0	2	0	0	5
Santana	0	0	1	0	0	0	1
Porto Grande*	43	70	6	10	4	26	159
Itaubal	2	0	0	0	0	1	3
Oiapoque*	0	4	18	6	12	31	71
Calçoene	2	1	3	3	1	2	12
Amapá	0	1	0	0	0	0	1
Pracuuba	2	1	0	2	5	0	10
Tartarugualzinho	1	1	1	0	1	1	5
Serra do Navio*	3	13	0	0	2	5	23
Pedra Branca	0	1	0	0	0	0	1
Ferreira Gomes	0	0	0	0	0	0	0
Vitória do Jari*	10	9	11	7		2	39
Laranjal do Jari*	81	59	36	69	10	9	264
Cutias do Araguaí	2	2	0	1	0	0	5
Mazagão	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total*</b>	<b>148</b>	<b>163</b>	<b>76</b>	<b>100</b>	<b>35</b>	<b>77</b>	<b>599</b>
<b>Porcentagem</b>	<b>25%</b>	<b>27%</b>	<b>13%</b>	<b>17%</b>	<b>6%</b>	<b>13%</b>	
<b>Porcentagem Total</b>	<b>52%</b>		<b>29%</b>		<b>19%</b>		

M: Macho

F: Fêmea

Fonte: Autora (2020)

Avaliando-se a distribuição dos insetos coletados na interação entre o sexo e a distância da mata, o teste do Qui quadrado retorna um valor de 8,96, indicando um valor de  $p = 0,01$  e demonstrando que há efeito positivo da distância de coleta no número de indivíduos em ambos os sexos, bem como um número significativamente maior de fêmeas do que de machos independente da distância coletada (Tabela 5).

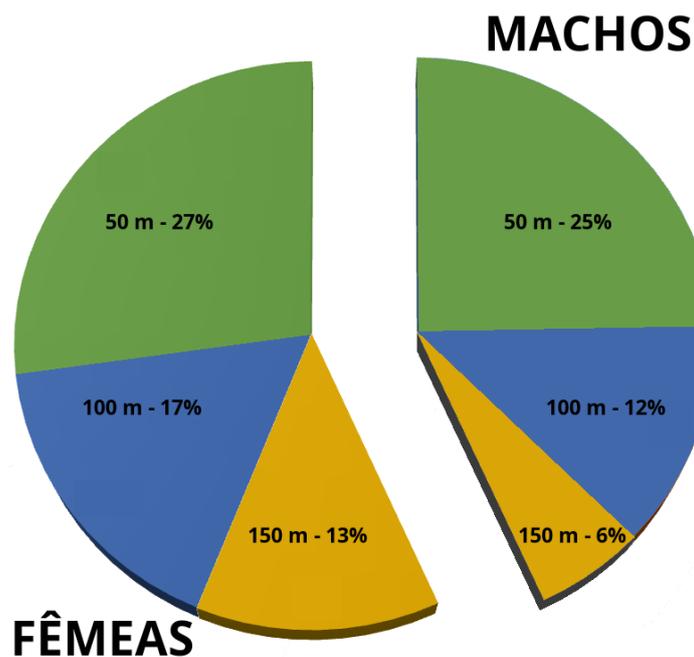
**Tabela 5** – Frequência absoluta e relativa (entre parênteses) dos machos e fêmeas de flebotomíneos coletados com armadilha do tipo CDC nos 16 municípios do Amapá. Os fatores testados diferem significativamente entre si pelo teste de Qui Quadrado ( $p = 0,01$ ).

	50 m	100 m	150 m	Total
<b>Fêmeas</b>	163 (27%)	100 (17%)	77 (13%)	340 (57%)
<b>Machos</b>	148 (25%)	76 (13%)	35 (6%)	259 (43%)
<b>Total</b>	<b>311 (52%)</b>	<b>176 (29%)</b>	<b>112 (19%)</b>	<b>599 (100%)</b>

Fonte: Autora (2020)

A Figura 7 permite comparar as frequências relativas dos insetos coletados nas diferentes distâncias da mata. Ramos *et al.* (2014) destacam que a cobertura florestal e a densidade populacional humana influenciam a diversidade e a abundância da população de flebotomíneo; observam ainda que, quando há a junção desses dois fatores, os efeitos podem ser maiores.

**Figura 7** – Gráfico das frequências relativas dos flebotomíneos coletados nas diferentes distâncias da mata nos municípios do AP.

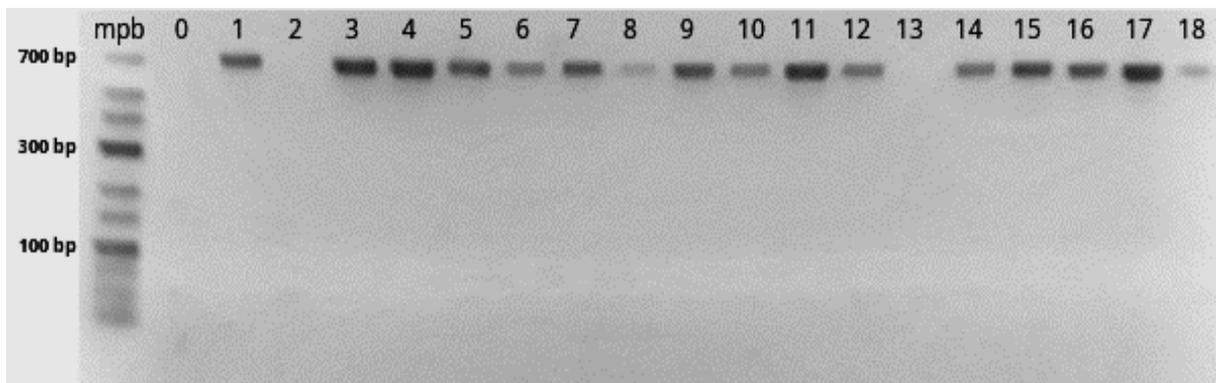


Fonte: Autora (2020)

## 7.2 ANÁLISE MOLECULAR

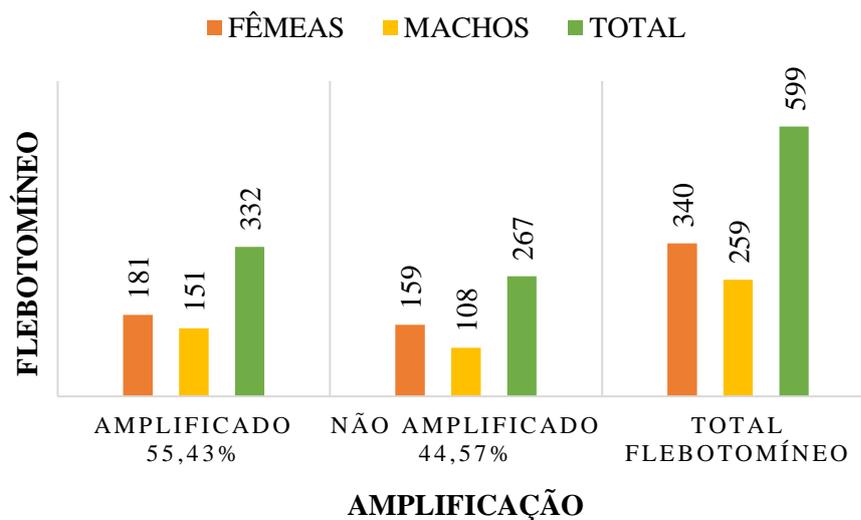
Foi realizada a extração do DNA genômico individualmente dos 599 flebotomíneos coletados, utilizando a técnica de extração orgânica com clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), e posteriormente, foi amplificada a região do gene COI (Citocromo Oxidase Subunidade 1) do DNA mitocondrial, com aproximadamente 700pb (Figura 8), sendo possível obter 332 amostras amplificadas, o que representa 55,43% do total de flebotomíneos coletados (Figura 9).

**Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio mostrando produto de amplificação de PCR da região do gene COI de flebotomíneos coletados nos municípios de Laranjal do Jari (1 a 15) e Pracuuba (16 a 18). mpb – Peso Molecular; 0- Controle Negativo.



Fonte: Autora (2020)

**Figura 9** – Gráfico demonstrativo de amplificação do DNA de flebotomíneos após PCR.



Fonte: Autora (2020)

A observação da PCR das amostras amplificadas em gel de agarose permitiu a identificação de bandas de DNA nítidas para a maioria dos insetos coletados. Algumas bandas apareceram, no entanto, como bandas fracas (Figura 8, amostras 8, 10 e 18), enquanto que em outras amostras não foi possível a identificação de qualquer banda (Figura 8, amostras 2 e 13).

Do total de amostras amplificadas, foram encaminhadas para sequenciamento, na sede da empresa Macrogen, 103 amostras que apresentaram bandas fortes quando visualizadas em gel de agarose; destas, 84 apresentaram sucesso no sequenciamento. Os eletroferogramas foram visualizados e editados no *CLC Genomics Workbench* (QIAGEN®). Cada sequência foi comparada com todas as seqüências disponíveis no banco de dados NCBI usando o BLASTn, com o algoritmo megablast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e também com o banco de dados *BOLD SYSTEMS* ([http://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)) como forma de confirmar a identidade de cada amostra, fazendo uma comparação entre os dois bancos, usando o critério de maior identidade na ocorrência de discordância entre os bancos de dados.

Para inferir os nomes das espécies foi adotado o valor de identidade entre 98% a 100%, valores inferiores a esta porcentagem foram considerados como classificação somente em nível de gênero, tendo em vista que, tanto o NCBI quanto o BOLD dão segurança para a identificação no nível de gênero (Tabela 06).

**Tabela 6** – Comparação das seqüências no NCBI e no BOLD, considerando a critério de maior identidade para inferir o nome da espécie. Em negrito estão as amostras identificadas em nível de espécie (Identidade entre 98% a 100%).

(Continua)

Nº	Seq.	Tamanho do fragmento	Principais matches	Max identidade	Fonte	Nº Acesso	Principal referência*
1	LJ1M6	652pb	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	97.30%	NCBI	KF467553.1	Scarpassa e Alencar, 2013
			<b><i>Nyssomyia delsonatali</i></b>	<b>98.56%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.12%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
2	LJ1M7	609pb	<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.31%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Nyssomyia delsonatali</i></b>	<b>98.67%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.3%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
3	LJ1M8	533	<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.74%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.93%	BOLD	Privado	-
4	LJ4M23	651	<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	97.54%	NCBI	KX356039.1	NP
			<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	97.53%	BOLD	KX356039	NP
5	LJ4M24	651	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.63%	NCBI	MG234390.1	NP
			<b><i>Nyssomyia antunesi</i></b>	<b>100%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
6	MCP1M4	648	<b><i>Sciopemyia fluviatilis</i></b>	<b>98.30%</b>	<b>NCBI</b>	<b>KX356039.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	98.15%	BOLD	KX356039	NP
7	MCP2F5	621	<i>Sciopemyia microps</i>	87.92%	NCBI	KP113040.1	NP
			NE	-	BOLD	-	-
8	PTG1M19	663	<i>Psathyromyia pascali</i>	89.35%	NCBI	KP112943.1	Pinto <i>et al.</i> , 2015
			<b><i>Psathyromyia dreisbachi</i></b>	<b>99.21%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
9	PTG1M21	654	<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	98.77%	NCBI	KX356035.1	NP
			<b><i>Trichopygomyia trichopyga</i></b>	<b>98.77%</b>	<b>BOLD</b>	<b>KX356035</b>	<b>NP</b>
10	SN1M1	646	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.45%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Nyssomyia antunesi</i></b>	<b>99.84%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
11	SN1M2	654	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.63%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Nyssomyia antunesi</i></b>	<b>99.84%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
12	LJ4M25	644	<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	96.51%	NCBI	KP113057.1	Pinto <i>et al.</i> , 2015
			<b><i>Trichophoromyia flochi</i></b>	<b>98.86%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-

(Continuação)

Nº	Seq.	Tamanho do fragmento	Principais matches	Max identidade	Fonte	Nº Acesso	Principal referência*
13	LJ4M26	650	<i>Brumptomyia travassosi</i>	97.69%	NCBI	KX356030.1	NP
			<i>Brumptomyia travassosi</i>	97.67%	BOLD	KX356030	NP
14	LJ5F14	638	<i>Psychodopygus panamensis</i>	88.03%	NCBI	MN257598.1	Dutari e Loaiza, 2019
			<i>NE</i>	-	BOLD	-	-
15	LJ5F2	642	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	99.52%	NCBI	KF467532.1	Scarpassa e Alencar, 2013
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	<b>99.68%</b>	<b>BOLD</b>	<b>KF467532</b>	<b>Scarpassa e Alencar, 2013</b>
16	LJ5F3	619	<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>99.22%</b>	NCBI	<b>MG234388.1</b>	<b>Rodrigues et al., 2018</b>
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.21%	BOLD	MG234388.1	Rodrigues et al., 2018
17	LJ5F5	644	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.26%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues et al., 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>99.68%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
18	LJ5F6	637	<i>Psychodopygus squamiventris</i>	<b>99.68%</b>	NCBI	<b>MH281925.1</b>	<b>Godoy et al, 2018</b>
			<i>Psychodopygus squamiventris</i>	99.52%	BOLD	Privado	-
19	LJ5F7	651	<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	<b>99.23%</b>	NCBI	<b>KX356035.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	99.22%	BOLD	KX356035	NP
20	LJ5F8	526	<i>Psychodopygus panamensis</i>	89.96%	NCBI	MN257599.1	Dutari e Loaiza, 2019
			<i>NE</i>	-	BOLD	-	-
21	LJ2F4	659	<i>Psathyromyia lutziana</i>	95.42%	NCBI	KP112939.1	Pinto et al, 2015
			<i>Psathyromyia elizabethdorvalae</i>	<b>99.84%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
22	LJ2F7	625	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	97.23%	NCBI	KF467553.1	Scarpassa e Alencar, 2013
			<i>Nyssomyia delسیونatali</i>	<b>98.51%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.05%	BOLD	MG234390	Rodrigues et al., 2018
23	LJ2F8	653	<i>Brumptomyia travassosi</i>	<b>98.46%</b>	NCBI	<b>KX356030.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Brumptomyia travassosi</i>	98.46%	BOLD	KX356030	NP
24	LJ3F10	613	<i>Brumptomyia travassosi</i>	<b>98.21%</b>	NCBI	<b>KX356030.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Brumptomyia travassosi</i>	98.20%	BOLD	KX356030	NP
25	LJ3F9	626	<i>Psathyromyia aragaoi</i>	97.92%	NCBI	KX356042.1	NP
			<i>Psathyromyia aragaoi</i>	<b>99.05%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
26	LJ5F18	649	<i>Viannamyia furcata</i>	97.23%	NCBI	KX356034.1	NP
			<i>Viannamyia furcata</i>	97.62%	BOLD	Privado	-

(Continuação)

Nº	Seq.	Tamanho do fragmento	Principais matches	Max identidade	Fonte	Nº Acesso	Principal referência*
27	LJ5F19	627	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	96.91%	NCBI	KF467553.1	Scarpassa e Alencar, 2013
			<i>Nyssomyia delسیونatali</i>	<b>98.19%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.67%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
28	LJ6F12	639	<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.16%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>98.48%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
29	LJ6F13	650	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.63%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>100%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
30	LJ6F15	650	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	97.18%	NCBI	KF467553.1	NP
			<i>Nyssomyia delسیونatali</i>	<b>98.56%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.14%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
31	LJ625	533	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.06%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>99.44%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
32	CLN4M5	648	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	96.55%	NCBI	KF467553.1	Scarpassa e Alencar, 2013
			<i>Nyssomyia delسیونatali</i>	<b>98.17%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.78%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
33	CLN9M7	648	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.63%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>100%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
34	ITB3M7	610	<i>Phlebotomus cf. lesleyae</i>	86.08%	NCBI	KR020550.1	NP
			<i>Evandromyia saulensis</i>	<b>98.67%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Chinius barbazani</i>	86.84%	BOLD	Privado	-
35	OPQ4M14	647	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	98.71%	NCBI	MG234290.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	<b>99.36%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
36	OPQ5M14	649	<i>Trichophoromyia ininii</i>	<b>98.92%</b>	NCBI	<b>KX356040.1</b>	NP
			<i>Trichophoromyia ininii</i>	98.92%	BOLD	KX356040	NP
37	OPQ5M16	634	<i>Trichophoromyia ininii</i>	98.74%	NCBI	KX356040.1	NP
			<i>Trichophoromyia ininii</i>	<b>99.04%</b>	<b>BOLD</b>	<b>KX356040</b>	NP
38	OPQ7F13	477	<i>Trichophoromyia ininii</i>	98.32%	NCBI	KX356040.1	NP
			<i>Trichophoromyia ininii</i>	<b>98.94%</b>	<b>BOLD</b>	<b>KX356040</b>	NP

(Continuação)

Nº	Seq.	Tamanho do fragmento	Principais matches	Max identidade	Fonte	Nº Acesso	Principal referência*
39	OPQ7F14	649	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	98.52%	NCBI	MG234290.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Bichromomyia flaviscutellata</i></b>	<b>99.20%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
40	OPQ8F5	635	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	98.53%	NCBI	MG234290.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Bichromomyia flaviscutellata</i></b>	<b>99.51%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
41	OPQ8F9	648	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	98.34%	NCBI	MG234290.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Bichromomyia flaviscutellata</i></b>	<b>99.04%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
42	OPQ8M3	553	<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	<b>98.73%</b>	NCBI	<b>KX356035.1</b>	NP
			<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	98.72%	BOLD	KX356035	NP
43	OPQ8M4	502	<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	97.41%	NCBI	KX356035.1	NP
			<b><i>Trichopygomyia trichopyga</i></b>	<b>98.58%</b>	<b>BOLD</b>	<b>KX356035</b>	<b>NP</b>
44	PCB3M9	640	<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	98.59%	NCBI	KX356035.1	NP
			<b><i>Trichopygomyia trichopyga</i></b>	<b>98.75%</b>	<b>BOLD</b>	<b>KX356035</b>	<b>NP</b>
45	PCB8M17	485	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.31%	NCBI	JN845549.1	NP
			<b><i>Nyssomyia antunesi</i></b>	<b>99.77%</b>	<b>BOLD</b>	<b>JN845549</b>	<b>NP</b>
46	PCB8M19	465	<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.49%	NCBI	JN845549.1	NP
			<b><i>Nyssomyia antunesi</i></b>	<b>99.10%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
47	PTG6M17	375	<i>Psathyromyia aragoi</i>	97.60%	NCBI	KX356042.1	NP
			<b><i>Psathyromyia aragoi</i></b>	<b>98.37%</b>	<b>BOLD</b>	<b>KX356042</b>	<b>NP</b>
48	VJ2M2	606	<i>Psychodopygus panamensis</i>	89.35%	NCBI	GU001748.1	Azpurua <i>et al.</i> , 2010
			NE	-	BOLD	-	-
49	VJ2M7	462	<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.55%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Nyssomyia delsonatali</i></b>	<b>98.90%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
50	VJ3M8	644	<i>Brumptomyia travassosi</i>	97.82%	NCBI	KX356030.1	NP
			<i>Brumptomyia travassosi</i>	97.66%	BOLD	KX356030	NP
51	VJ5M12	609	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.08%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<b><i>Nyssomyia antunesi</i></b>	<b>99.83%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
52	VJ5M13	645	<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>99.08%</b>	NCBI	<b>MG234390.1</b>	<b>Rodrigues <i>et al.</i>, 2018</b>
			<i>Nyssomyia delsonatali</i>	98.83%	BOLD	Privado	-

(Continuação)

Nº	Seq.	Tamanho do fragmento	Principais matches	Max identidade	Fonte	Nº Acesso	Principal referência*
53	VJ5M14	638	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	98.95%	NCBI	KM407082.1	Souza Freitas <i>et al.</i> , 2015
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	<b>99.05%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
54	VJ5M15	533	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	<b>99.24%</b>	NCBI	<b>KF467535.1</b>	<b>Scarpassa e Alencar, 2013</b>
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	99.23%	BOLD	Privado	-
55	VJ5M16	648	<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.16%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia delsiusnatai</i>	<b>98.50%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.15%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
56	VJ5M18	647	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	96.86%	NCBI	KF467553.1	Scarpassa e Alencar, 2013
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>98.53%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.33%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
57	CLN2M2	630	<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.97%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia delsiusnatai</i>	<b>98.34%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.965	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
58	CTA2M1	626	<i>Trichophoromyia ininii</i>	97.76%	NCBI	KX356040.1	NP
			<i>Trichophoromyia ininii</i>	97.56%	BOLD	KX356040	NP
59	OPQ4M11	632	<i>Trichophoromyia ininii</i>	<b>98.89%</b>	NCBI	<b>KX356040.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Trichophoromyia ininii</i>	98.88%	BOLD	KX356040	NP
60	OPQ4M12	630	<i>Trichophoromyia ininii</i>	<b>98.89%</b>	NCBI	<b>KX356040.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Trichophoromyia ininii</i>	98.87%	BOLD	KX356040	NP
61	OPQ7F19	623	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	<b>98.53%</b>	NCBI	<b>MG234289.1</b>	<b>Rodrigues <i>et al.</i>, 2018</b>
			<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	98.52%	BOLD	MG234289	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
62	OPQ7F22	576	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	98.67%	NCBI	MG234289.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	<b>98.85%</b>	<b>BOLD</b>	<b>MG234289</b>	<b>Rodrigues <i>et al.</i>, 2018</b>
63	OPQ8M10	625	<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	<b>99.68%</b>	NCBI	<b>KX356035.1</b>	NP
			<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	99.68%	BOLD	KX356035	NP
64	OPQ8M9	625	<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	<b>99.52%</b>	NCBI	<b>KX356035.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	99.51%	BOLD	KX356035	NP
65	PCB1M8	626	<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	<b>98.08%</b>	NCBI	<b>KX356039.1</b>	<b>NP</b>
			<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	98.05%	BOLD	KX356039	NP

(Continuação)

Nº	Seq.	Tamanho do fragmento	Principais matches	Max identidade	Fonte	Nº Acesso	Principal referência*
66	PCB8M18	628	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.63%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>100%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
67	PTG1F2	629	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.63%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>100%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
68	PTG1F5	627	<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.34%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia delsonatali</i>	<b>98.63%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.33%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
69	PTG1F6	625	<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.61%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia delsonatali</i>	97.95%	BOLD	Privado	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.58%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
70	VJ2M3	648	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	<b>99.26%</b>	<b>NCBI</b>	<b>MG234289.1</b>	<b>Rodrigues <i>et al.</i>, 2018</b>
			<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	99.26%	BOLD	MG234289	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
71	PTG2F13	626	<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.16%	NCBI	MG234389.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia delsonatali</i>	<b>98.53%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.15%	BOLD	MG234389	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
72	PTG2F16	618	<i>Nyssomyia antunesi</i>	99.45%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>100%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
73	PTG6F3	625	<i>Lutzomyia hartmanni</i>	88.78%	NCBI	KC921257.1	Contreras-Gutierrez <i>et al.</i> , 2014
			NE	-	BOLD	-	-
74	PTG6F16	630	<i>Lutzomyia guyanensis</i>	96.54%	NCBI	GU001736.1	Azpurua <i>et al.</i> , 2010
			<i>Psychodopygus geniculatus</i>	<b>99.43%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
75	PTG8F21	622	<i>Lutzomyia robusta</i>	96.13%	NCBI	FJ437280.1	Cohnstaedt <i>et al.</i> , 2011
			NE	-	BOLD	-	-
76	SNV2F5	626	<i>Psychodopygus ayrozai</i>	88.61%	NCBI	KP112961.1	Pinto <i>et al.</i> , 2015
			NE	-	BOLD	-	-
77	VJ1F3	628	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	<b>99.02%</b>	<b>NCBI</b>	<b>KF467539.1</b>	<b>Scarpassa e Alencar, 2013</b>
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	99.00%	BOLD	KF467539	Scarpassa e Alencar, 2013
78	VJ1F5	630	<i>Nyssomyia antunesi</i>	97.97%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	<b>98.30%</b>	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-

(Conclusão)

Nº	Seq.	Tamanho do fragmento	Principais matches	Max identidade	Fonte	Nº Acesso	Principal referência*
79	VJ1M1	623	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	99.67%	NCBI	<b>KF467532.1</b>	<b>Scarpassa e Alencar, 2013</b>
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	99.67%	BOLD	KF467532	Scarpassa e Alencar, 2013
80	VJ3M10	530	<i>Nyssomyia umbratilis</i>	99.25%	NCBI	<b>KF467562.1</b>	<b>Scarpassa e Alencar, 2013</b>
			<i>Nyssomyia umbratilis</i>	99.24%	BOLD	KF467562	Scarpassa e Alencar, 2013
81	VJ4M10	623	<i>Brumptomyia sp.</i>	89.26%	NCBI	GU909507.1	NP
			<i>Brumptomyia guimaraesi</i>	89.14%	NCBI	KC921224.1	Contreras-Gutierrez <i>et al.</i> , 2014
			NE	-	BOLD	-	-
82	VJ5M17	620	<i>Brumptomyia sp.</i>	88.87%	NCBI	GU909507.1	NP
			<i>Brumptomyia guimaraesi</i>	88.71%	NCBI	KC921224.1	Contreras-Gutierrez <i>et al.</i> , 2014
			NE	-	BOLD	-	-
83	VJ6M19	620	<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.16%	NCBI	MG234390.1	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
			<i>Nyssomyia delsonatali</i>	98.78%	<b>BOLD</b>	<b>Privado</b>	-
			<i>Nyssomyia antunesi</i>	98.15%	BOLD	MG234390	Rodrigues <i>et al.</i> , 2018
84	VJ9F18	541	<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	97.60%	NCBI	KX356039.1	NP
			<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	97.57%	BOLD	KX356039	NP

NP: Trabalho ainda não publicado

NE: Não encontrado

\*Alguns números de acesso no banco de dados BOLD aparecem com o número de acesso PRIVADO, não sendo possível recuperar este número, por conseguinte.

Fonte: Autora (2020)

Após a análise das sequências nos bancos de dados, NCBI e BOLD, foi possível inferir 67 sequências de DNA em nível de espécie, que apresentaram o valor estimado para a identidade, e 17 sequências que foram identificadas somente em nível de gênero, devido a identidade ter apresentado um valor a baixo do estimado. O município mais amostrado foi Laranjal do Jari com 25 sequências analisadas sendo identificadas 9 espécies diferentes: *Ny. delsonatali*, *Pa. elizabethdorvalae*, *Br. travassosi*, *Pa. aragaoi*, *Ny. antunesi*, *Th. flochi*, *Ny. umbratilis*, *Ps. squamiventris squamiventris* e *Ty. trichopyga*, seguido do município de Vitória do Jari com 18 sequências analisadas e apenas 4 espécies identificadas: *Ny. delsonatali*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Ny. umbratilis* e *Ny. antunesi*, assim como Oiapoque que teve 15 sequências analisadas e sendo registrado somente a ocorrências de 3 espécies: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Th. ininii* e *Ty. trichopyga*. Destacando o município de Porto Grande que apesar de ser o quarto município mais amostrado, com 11 sequências analisadas nos bancos de dados, foi que mais se mostrou diversificado quanto as espécies identificadas, registrando a ocorrência de 6 espécies diferentes: *Pa. dreisbachi*, *Ty. trichopyga*, *Ny. antunesi*, *Ny. delsonatali*, *Pa. aragaoi*, *Ps. geniculatus* (Tabela 07).

Nesta pesquisa, identificou-se no total a ocorrência de 15 espécies de flebotomíneos circulante no estado do Amapá. A espécie mais frequente foi *Ny. antunesi* com 18 espécimes identificados, dos quais a metade foi coletada a 100m da borda da mata, seguido da espécie *Ny. delsonatali* com 12 ocorrências no estado, destas, sete foram coletadas a 50m da borda da mata e a terceira espécie mais frequente no estado do Amapá foi *Bi. flaviscutellata* juntamente com a espécie *Ty. trichopyga*, ambas tiveram sete ocorrências no estado, sendo as duas espécies mais coletas a 150m da borda da mata (Tabela 08). A figura 10 mostra a distribuição das cinco espécies mais coletadas nos municípios do estado do Amapá.

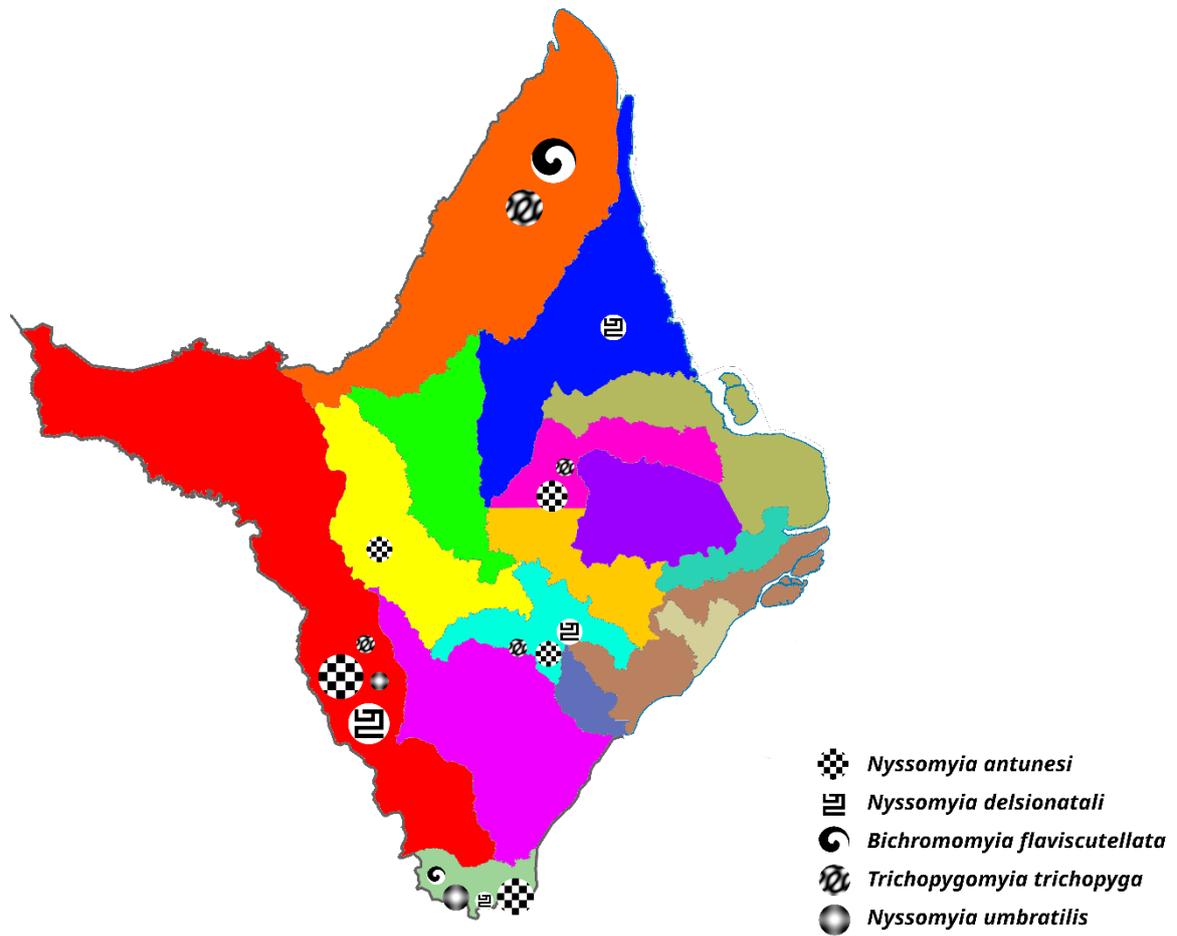
**Tabela 7** – Espécies identificadas pelo alvo COI do DNA mitocondrial, discriminadas por município do estado do Amapá, pela distância do ponto de coleta em relação a borda da mata e sexo. As espécies em negrito são de importância médica.

MUNICÍPIO	50M		100M		150M		TOTAL	TOTAL DE ESPÉCIES
	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA		
<b>Oiapoque</b>	-	-	<b>Bichromomyia flaviscutellata</b> (1) <i>Trichophoromyia ininii</i> (4)	-	<i>Trichopygomyia trichopyga</i> (4)	<i>Trichophoromyia ininii</i> (1) <b>Bichromomyia flaviscutellata</b> (5)	15	3
<b>Laranjal do Jari</b>	<i>Nyssomyia delsonatali</i> (2) <i>Nyssomyia sp.</i> (1)	<i>Psathyromyia elizabethdorvalae</i> (1) <i>Nyssomyia delsonatali</i> (1) <i>Brumptomyia travassosi</i> (2) <i>Psathyromyia aragaoi</i> (1)	<i>Sciopemyia sp.</i> (1) <i>Nyssomyia antunesi</i> (1) <i>Trichophoromyia flochi</i> (1) <i>Brumptomyia sp.</i> (1)	<i>Psychodopygus sp.</i> (2) <b>Nyssomyia umbratilis</b> (1) <i>Nyssomyia antunesi</i> (5) <b>Psychodopygus squamiventris</b> (1) <i>Trichopygomyia trichopyga</i> (1) <i>Viannamyia sp.</i> (1) <i>Nyssomyia delsonatali</i> (2)	-	-	25	9
<b>Vitoria do Jarí</b>	<i>Psychodopygus sp.</i> (1) <i>Nyssomyia delsonatali</i> (1) <i>Brumptomyia sp.</i> (1) <b>Bichromomyia flaviscutellata</b>	<i>Nyssomyia umbratilis</i> (1) <i>Nyssomyia antunesi</i> (1)	<i>Nyssomyia antunesi</i> (3) <i>Nyssomyia umbratilis</i> (2) <i>Nyssomyia delsonatali</i> (2)	-	--	<i>Sciopemyia sp.</i> (1)	18	4
<b>Porto Grande</b>	<i>Psathyromyia dreisbachi</i> (1) <i>Trichopygomyia trichopyga</i> (1)	<i>Nyssomyia antunesi</i> (2) <i>Nyssomyia delsonatali</i> (2) <i>Nyssomyia sp.</i> (1)	<i>Psathyromyia aragaoi</i> (1) <i>Psychodopygus geniculatus</i> (1)	<i>Lutzomyia sp.</i> (1)	-	<i>Lutzomyia sp.</i> (1)	11	6
<b>Pracuúba</b>	<i>Trichopygomyia trichopyga</i> (1) <i>Sciopemyia fluviatilis</i> (1)	-	-	-	<i>Nyssomyia antunesi</i> (3)	-	5	3
<b>Serra do Navio</b>	<i>Nyssomyia antunesi</i> (2)	<i>Psychodopygus sp.</i> (1)	-	-	-	-	3	1
<b>Calçoene</b>	<i>Nyssomyia delsonatali</i> (1)	-	<i>Nyssomyia delsonatali</i> (1)	-	<i>Nyssomyia antunesi</i> (1)	-	3	2
<b>Macapá</b>	<i>Sciopemyia fluviatilis</i> (1)	<i>Sciopemyia sp.</i> (1)	-	-	-	-	2	1
<b>Itaubal do Piriri</b>	<i>Evandromyia saulensis</i> (1)	-	-	-	-	-	1	1
<b>Cutias do Araguari</b>	<i>Trichophoromyia sp.</i> (1)	-	-	-	-	-	1	1

Fonte: Autora (2020)

Nota: Os valores dentro do parêntese correspondem ao número de espécimes.

**Figura 10** – Distribuição das cinco espécies de flebotomíneos mais frequentes em coletas realizadas com armadilhas tipo CDC nos municípios do estado do Amapá.



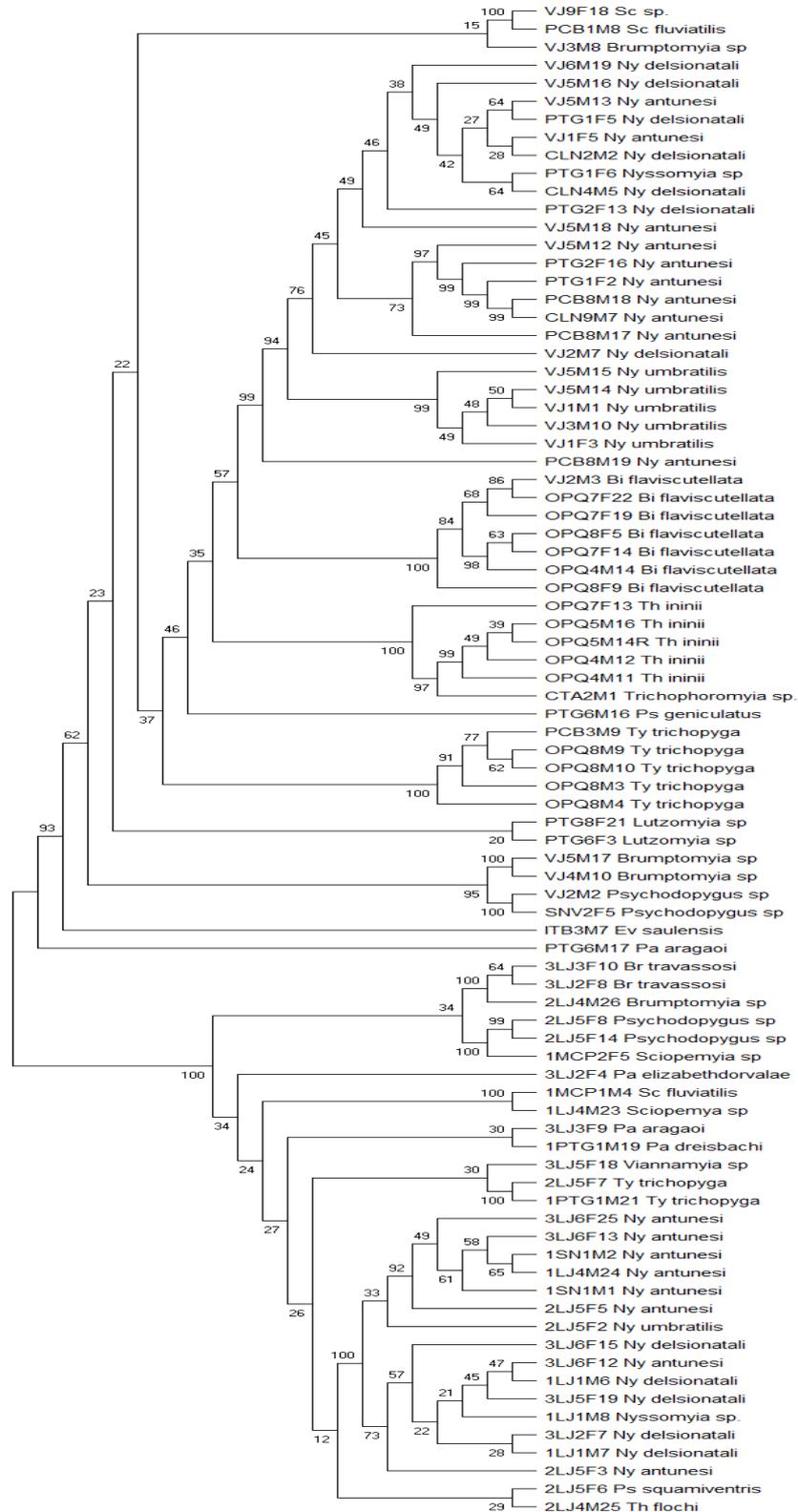
Fonte: Autora (2020)

**Tabela 8** – Composição das espécies de flebotomíneos no estado do Amapá, conforme identificação através do gene COI, do DNA mitocondrial.

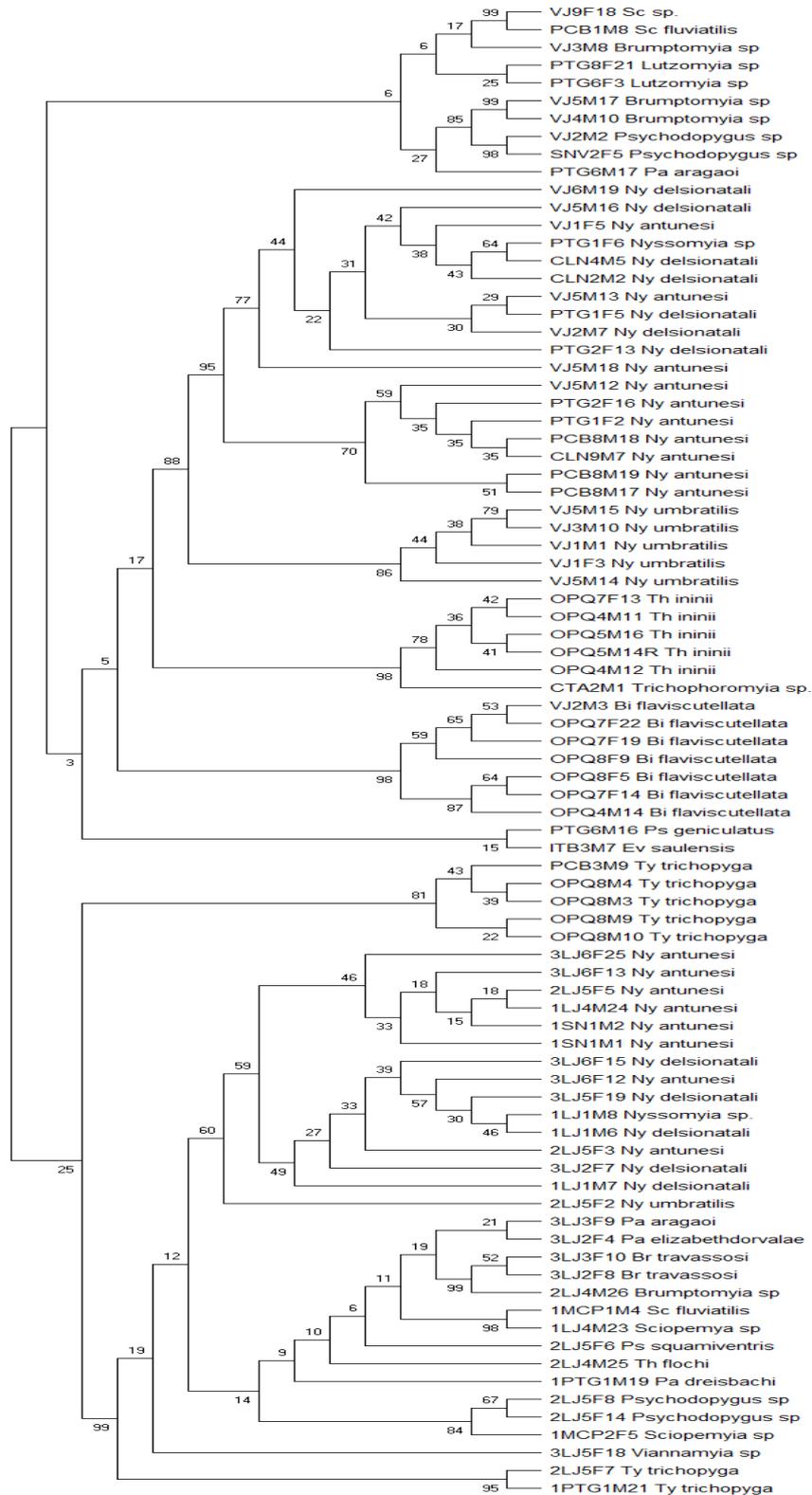
Espécie	50M		100M		150M		Total
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
<i>Nyssomyia antunesi</i>	2	3	4	5	4	0	18
<i>Nyssomyia delsonatali</i>	4	3	3	2	0	0	12
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	1	0	1	0	0	5	7
<i>Nyssomyia umbratilis</i>	2	1	2	1	0	0	6
<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	2	0	0	1	4	0	7
<i>Trichophoromyia ininii</i>	0	0	4	0	0	1	5
<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	2	0	0	0	0	0	2
<i>Brumptomyia travassosi</i>	0	2	0	0	0	0	2
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	1	1	0	0	0	2
<i>Psathyromyia dreisbachi</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Evandromyia saulensis</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia elizabethdorvalae</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Trichophoromyia flochi</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Psychodopygus geniculatus</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Psychodopygus squamiventris</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Nyssomyia sp.</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>Psychodopygus sp.</i>	1	1	0	2	0	0	4
<i>Brumptomyia sp.</i>	1	0	3	0	0	0	4
<i>Sciopemyia sp.</i>	0	1	1	0	0	1	3
<i>Lutzomyia sp.</i>	0	0	0	1	0	1	2
<i>Trichophoromyia sp.</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Viannamyia sp.</i>	0	0	0	1	0	0	1
<b>TOTAL</b>	19	14	21	14	8	8	<b>84</b>
	<b>33</b>		<b>35</b>		<b>16</b>		

Fonte: Autora (2020)

**Figura 11** – Relações evolutivas de táxons inferida pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages), a análise envolveu 84 sequências nucleotídicas. Teste de bootstrap (500 repetições), com porcentagem mostrados próximos aos ramos.

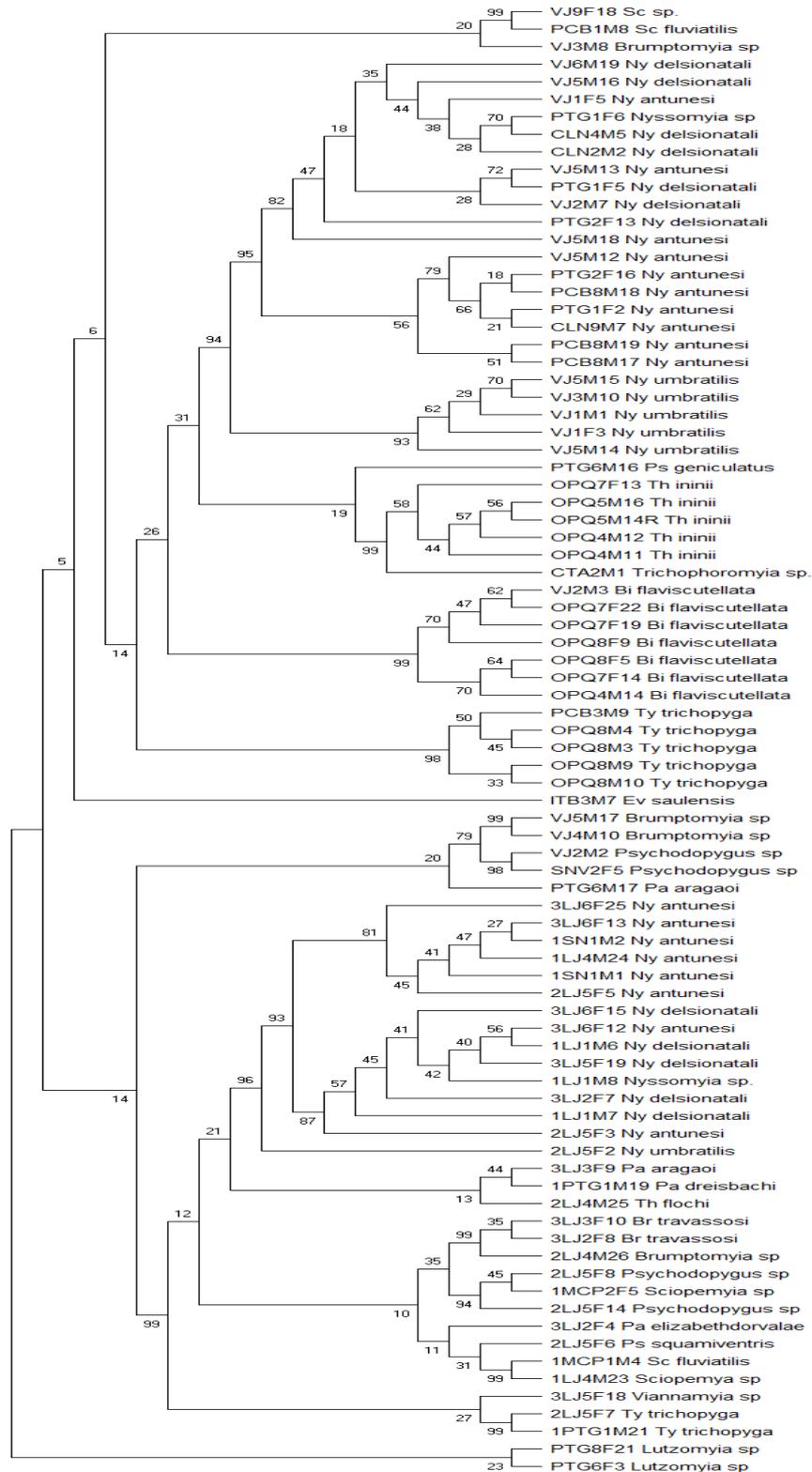


**Figura 12** – Relações evolutivas de táxons inferida pelo método Neighbor-Joining, a análise envolveu 84 sequências nucleotídicas. Teste de bootstrap (500 repetições), com porcentagem mostrados próximos aos ramos.



Fonte: Autora (2020)

**Figura 13** – Relações evolutivas de táxons inferida pelo método de Máxima Verossimilhança, baseado no modelo de Tamura-Nei, a análise envolveu 84 sequências nucleotídicas. Teste de bootstrap (500 repetições), com porcentagem mostrados próximos aos ramos.



Fonte: Autora (2020)

## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS

A região Norte apresenta uma grande diversidade de espécies de flebotomíneos já descritas. Sendo uma região que ganha destaque, devido a grande riqueza de espécies aqui encontrada, conforme ressaltado por Aguiar e Vieira (2018) quando destaca que das 106 espécies de flebotomíneos com ocorrência em apenas uma região do país, 64 ocorrem somente no Norte, seguido da região Sudeste com 23, Centro Oeste com 11, Nordeste com 5 e a região Sul com 3 espécies. A região Norte tem 204 espécies conhecida, distribuídas nos estados da seguinte forma: Amazonas com 141 espécies, Pará com 135, Rondônia com 125, Acre com 95, Roraima com 83, Tocantins com 73, e o Amapá 70 espécies.

Nesta pesquisa, a taxonomia molecular utilizando o gene COI do DNA Mitocondrial permitiu a identificação de 15 espécies de flebotomíneos pertencentes a 9 gêneros, bem como, 17 espécimes que foram identificados como pertencentes a 7 gêneros de flebotomíneos, onde estes só foi possível a identificação somente em nível de gênero, tendo em vista a baixa porcentagem de similaridade nos dois bancos de DNA analisados, NCBI e BOLD, não sendo desta forma, possível a identificação em nível de espécie com segurança. No entanto, podemos destacar a grande diversidade da fauna de flebotomíneos no Amapá considerando o grande número de gêneros que foi possível identificar, corroborando com várias pesquisas como Forattini (1959), Freitas, Naiff e Barret (2002), Brazil, Andrade Filho e Falcão (2000), Furtado *et al.* (2016), que ressaltam essa grande diversidade de espécies que o estado do Amapá apresenta.

Pesquisas realizadas por Pessoa, Medeiros e Barret (2007), Rosário *et al.* (2017) e Silva *et al.* (2010) apontam em seus resultados a grande diversidade de espécies de flebotomíneos, bem como evidenciam através de suas coletas que esta diversidade é composta por algumas espécies dominantes e por muitas espécies com pouquíssimos espécimes representados, o que condiz com esta pesquisa, tendo em vista as sequências de DNA dos 67 espécimes analisados pertencem a 15 espécies diferentes de flebotomíneos, destacando as espécies *Ny. antunesi* e *Ny. delsonatali* que foram as espécies dominantes, representando 35,71% do total sequências analisadas, os 64,29% restantes incluem as outras espécies e os gêneros com espécie não identificada que tiveram ocorrência no estado, os quais foram representados por poucos espécimes.

Os gêneros com mais frequência neste estudo foram *Nyssomyia*, *Trichopygomyia* e *Bichromomyia*. Segundo Ward *et al.* (1973), Grimaldi *et al.* (1991), Rangel e Lainson (2003) as espécies pertencentes aos gêneros *Psychodopygus* e *Nyssomyia* são as mais abundantes, como também são as mais importantes quando se fala em Leishmaniose na região Amazônica, devido ao papel de vetor desta doença. As espécies de importância médica registradas neste estudo foram *Bi. flaviscutellata*, *Ny. umbratilis* e *Ps. squamiventris squamiventris*. Segundo Galati (2003) os gêneros responsáveis pela transmissão das espécies de *Leishmania* no continente Americano são *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia*.

Nesta pesquisa a espécie *Bi. flaviscutellata* teve ocorrência nos municípios de Oiapoque e Vitoria do Jari, sendo a terceira espécie mais frequente, assim como na pesquisa realizada por Furtado *et al.* (2016). Freitas, Naiff e Barret (2002), Vasconcelos dos Santos *et al.* (2018) também relatam a ocorrência desta espécie no estado e destacam sua importância como vetor da Leishmaniose. Segundo Freitas, Barrett e Naiff (1989), Lainson *et al.* (1994), Gontijo e Carvalho (2003) e Rangel e Lainson (2009), esta espécie é o principal vetor da *L. (Le.) amazonensis*, agente etiológico da forma difusa da leishmaniose cutânea.

Considerando que o gênero *Nyssomyia* foi dominante nesta pesquisa, ressalta-se a importância deste gênero na transmissão da Leishmaniose na região Amazônica através das espécies vetoras: *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei*, *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* (OPAS/OMS, 2018). Destas espécies, somente *Ny. umbratilis* foi coletada nesta pesquisa, sendo uma das espécies de importância médica identificadas como nosso resultado.

Desta forma, a espécie *Ny. umbratilis* não ficou entre as espécies mais frequentes, tendo ocorrência no município de Vitoria do Jari e Laranjal do Jari. No entanto, merece destaque devido sua importância na transmissão no ciclo da Leishmaniose como principal vetor da *Leishmania guyanensis*. Vários estudos têm ressaltado a importância epidemiológica desta espécie na região norte do Rio Amazonas, nos estados do Pará (LAINSON *et al.*, 1979, 1981), Amazonas (ARIAS; FREITAS, 1978; ARIAS *et al.*, 1981), no Amapá (FREITAS; NAIFF; BARRET, 2002; SOUZA *et al.*, 2017; VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2018), na Guiana Francesa (GENTILE *et al.*, 1981; PAJOT *et al.*, 1982). Algumas pesquisas realizadas no Amapá apontam o registro desta espécie no estado, como o estudo que foi realizada no município de Serra do Navio por Souza *et al.* (2017), em que a espécie *Ny. umbratilis* foi a mais abundante entre as espécies coletadas no município, além de outras pesquisas em que esta espécie também se destacou como a mais frequente ou entre as mais frequentes, como Furtado *et al.* (2016), Freitas, Barrett e Naiff (2002) e Vasconcelos dos Santos *et al.* (2018).

A espécie *Ps. squamiventris squamiventris* tem ocorrência em três regiões do país: Norte, Nordeste e Centro Oeste, sendo encontrada em ambiente de floresta, casas de animais tais como galinheiro, porco e currais, e ainda em habitações humana (AGUIAR, VIEIRA, 2018). Nesta pesquisa foi registrada a ocorrência desta espécie no município de Laranjal do Jari. Na pesquisa de Souza *et al.* (2017) espécie *Ps. squamiventris* foi encontrada infectada com *L. (V.) naiffi*, ressaltando a importância como vetor na transmissão deste agente etiológico, causador da leishmaniose cutânea.

Observa-se que os municípios de Oiapoque, Laranjal do Jari e Vitória do Jari foram os que apresentaram, dentre as espécies identificadas neste trabalho, as espécies de importância médica. Estas espécies tem destacada relevância na transmissão da leishmaniose no estado do Amapá, sendo espécies vetoras dos parasitos *Leishmania spp.* causadores da Leishmaniose Cutânea e Cutânea Difusa. Dados do Ministério da Saúde/SINAN mostram casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana nesses municípios. Dos casos notificados de leishmaniose, observou-se que o município de Oiapoque registrou 126 casos notificados no ano de 2016, 89 casos no ano de 2017 e 82 em 2018, apontando diminuição dos casos notificados de leishmaniose no município. No entanto, Laranjal de Jari houve aumento dos casos notificados de leishmaniose, 54 casos em 2016, 66 em 2017 e 83 casos em 2018. Já no município de Vitória do Jari, nos respectivos anos, foram registrados 10 casos, 09 casos e novamente 10 casos notificados de leishmaniose (SINAN).

### **8.1.1 Vegetação e aspectos geomorfológicos**

O Amapá é um estado que apresenta grande parte do seu território protegido por lei. Segundo BDIA/IBGE (2021) a vegetação marcante no estado é a Floresta Ombrófila Densa, representada pela Floresta Amazônica, sendo a maioria do subtipo submontana, seguida de terras baixas e uma porção menor do tipo aluvial, que juntas totalizam 75% de toda a vegetação do estado. O cerrado é outro tipo de vegetação presente no Amapá, representado por uma porção bem menor em relação a floresta de terra firme, sendo em média 5%, o restante está distribuído em agricultura, pecuária (pastagem), reflorestamento.

De modo geral o Amapá apresenta três grandes paisagens marcantes, segundo a natureza, sendo elas: área inundável, abrangendo todo o litoral e adjacência, em sentido norte à sul; área savanística, representado pelo cerrado estendendo-se do município de Calçoene até Macapá e outra porção de extensão menor situado no município de Mazagão e Laranjal do Jari

e a área de floresta de terra firme, que compreende a maior área no estado, mais de 2/3 de todo o território amapaense, caracterizado pela presença de floresta de alto porte (RABELO *et al.*, 2008).

Considerando as unidades geomorfológica presentes no estado, segundo Banco de Dados de Informações Ambientais – BDIA/IBGE, destacamos as Colinas do Amapá (53,44%), sendo esta a de maior representação no estado, caracterizado como relevos de topos aguçados e convexos; temos ainda Depressão Periférica da Amazônia Setentrional (6,55%) apresentando superfície rebaixada dissecada em colinas intercalada por vales; Planalto do Uatumã (3,18%) que constitui uma superfície dissecada no trecho central e suavizada a leste, apresentando ainda relevos residuais; Planalto Setentrional da Bacia Sedimentar do Amazona (1,97%) que em geral as feições predominantes são tabulares, intercaladas por vales encaixados e alargados, com encostas abruptas marcadas por rebordos erosivos e escarpas; Planaltos Residuais do Amapá (7,52%) marcada por uma superfície essencialmente dissecada, com declives muito fortes; Planície Amazônica (2,85%) apresenta vários níveis de terraços e as várzeas recentes contêm diques e paleocanais; Planície Fluvio-lacustre do Amapá (7,25%) caracterizada por área de relevo muito plano onde os processos deposicionais associados a sistemas fluviais e lacustres desenvolveram extensa planície quaternária. Compreende toda a região sul da costa do Amapá, abrangendo a faixa entre a margem direita do rio Araguari e adjacências do rio Calçoene; Planície Fluvio-marinha do Amapá (7,09%), geologicamente, é a unidade mais recente e se caracteriza principalmente pela formação de cabos lamosos: os cabos Norte, Cassiporé e Orange, compreendendo toda a faixa litorânea amapaense entre a foz do rio Amazonas e o extremo norte, situado na foz do rio Oiapoque; Tabuleiros Costeiros do Amapá (7,59%) predominância de colinas de topos aplainados com pequeno aprofundamento da drenagem, revestidas por crosta ferruginosa. A maior parte desta unidade está compreendida no domínio morfoclimático das superfícies aplainadas e colinosas recobertas por cerrado.

Diante disso, destacamos os municípios de Oiapoque, Laranjal do Jari e Vitória do Jari onde foi registrado espécies de importância médica. Assim, considerando os pontos de coleta desses municípios, observamos que, quanto a vegetação, são do tipo Floresta Ombrófila Densa, sendo que Oiapoque apresenta subtipo de vegetação Submontana; Vitória do Jari e Laranjal do Jari do subtipo Terras Baixas (BDIA/IBGE, 2021). De modo geral, são floresta de terra firme, que ocupa a maior parte do estado, tendo como principais características desta vegetação a alta precipitação ao longo do ano, presença de uma grande diversidade de espécies vegetais com alto potencial econômico, como por exemplo angelins, acapu, sucupira, castanha-do-brasil, sapucaias, matamatás, breus, louros, maçaranduba (RABELO *et al.*, 2008). Quanto a

geomorfologia, Laranjal do Jari e Vitória do Jari tiveram seus pontos de coletas em unidades geomorfológicas do tipo Planalto do Uatumã e Oiapoque em Colinas do Amapá.

## 8.2 ANÁLISE DNA BARCODING

O sequenciamento de DNA destacou-se nos últimos anos como uma ferramenta bastante útil para estudos que visam conhecer a diversidade biológica e classificação de espécies de flebotomíneos no continente Americano. Para Araki *et al.* (2009), Depaquit (2014), devido as diferenças morfológicas entre algumas espécies serem mínimas, a utilização de chaves para a identificação morfológica de espécies não seja o mais adequado, como forma única, sendo necessário o uso de técnicas moleculares, baseados no sequenciamento de pequenas regiões de DNA.

As técnicas de DNA para caracterização de vetores vêm sendo utilizadas cada vez mais, através da amplificação por PCR e sequenciamento de genes mitocondriais, geralmente Cyt b (ESSEGHIR *et al.*, 1997) e citocromo oxidase 1 (AZPURUA *et al.*, 2010), e genes nucleares, incluindo 28S ribossomal e ITS2 (DEPAQUIT *et al.*, 2002, 1998) e EF-1 $\alpha$  (ESSEGHIR; READY; BEN-ISMAIL, 2000). Segundo Depaquit (2014), em seu artigo de revisão, os marcadores moleculares mais utilizados para sistemática de flebotomíneos são do DNA mitocondrial, apontando a região do Cyt b o mais utilizado, seguido do COI, que vem sendo utilizado pelos pesquisadores mais recentemente.

O gene COI, do DNA mitocondrial, tem sido alvo em muitos estudos de DNA barcoding de flebotomíneos no Panamá, Colômbia, Brasil e Peru, com propósito de identificação taxonômica e, em alguns casos, para definir relações filogenéticas ao nível das espécies, levando em consideração à sua alta taxa evolutiva e à sua baixa recombinação (ARRIVILLAGA *et al.*, 2002; AZPURUA *et al.*, 2010; BEATI; CÁCERES; LEE, 2004; COHNSTAEDT *et al.*, 2011; CONTRERAS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2014; DEPAQUIT, 2014; PINTO *et al.*, 2015). Desta forma, o DNA barcoding vem sendo utilizado para a identificação, classificação e análise da diversidade de espécies, utilizando como alvo o gene mitocondrial COI (JORDAENS *et al.*, 2013; HEBERT *et al.*, 2003; BOEHME; AMENDT; ZEHNER, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2018; MEJÍA *et al.*, 2018).

Assim, ressalta-se a importância desta técnica para a identificação das espécies de flebotomíneos através de pesquisas realizadas na América do Sul, tais como Contreras-Gutiérrez *et al.* (2014) que avaliaram a eficácia do uso do DNA Barcoding no gene COI para a

identificação de flebotomíneos na Colômbia. Ressaltando ainda que o perfil do gene COI encontrado para flebotomíneos confirmou a grande variação que ocorre nos genomas mitocondriais desses insetos. No Brasil, Scarpassa; Alencar., (2013) realizaram uma pesquisa envolvendo a taxonomia molecular de duas espécies de flebotomíneos na região da Amazônia brasileira: *Ny. umbratilis* e *Ny. anduzei*, como resultado, os pesquisadores apontam o DNA Barcoding do gene COI como um grande marcador para diferenciar espécies de flebotomíneos, e consideraram ser um instrumento importante para pesquisas epidemiológicas e para programas de controle de leishmaniose na América do Sul.

Pinto *et al.* (2015) testaram o uso do DNA Barcoding como forma de identificar as espécies de flebotomíneos, utilizando metodologia semelhante a que foi desenvolvida nesta pesquisa, a partir da extração individual do DNA genômico dos flebotomíneos, seguido de PCR para obtenção de um amplicon com 658pb e sequenciamento dos 576 flebotomíneos coletados em 19 municípios distribuídos em cinco estados brasileiros. Assim, os dados mostraram ser possível o uso do DNA Barcoding para a discriminação de espécies de flebotomíneos no Brasil, assim como a descoberta de espécies.

Em pesquisa mais recente, Rodrigues *et al.* (2018) realizaram no estado do Maranhão – Brasil um estudo no qual, identificou as espécies de flebotomíneo utilizando tanto a identificação morfológica, como o gene COI do DNA mitocondrial, em que disponibilizaram pela primeira vez, a partir do sequenciamento, a sequência deste gene para quatro espécies de flebotomíneos: *Br. avellari*, *Ev. infraspinosa*, *Ev. evandroi* e *Ps. complexus* que poderão ser utilizadas para estudos futuros que visam a identificação molecular dessas espécies. Segundo Hebert e Gregory (2005), o DNA Barcoding é uma ferramenta capaz de obter a identificação de espécie de forma rápida, e eficaz, baseando na análise padrão de regiões curtas de genes para assim permitir a identificação de espécie. Bem como afirma Pinto *et al.* (2015), o DNA Barcoding é uma opção útil para determinar amostras com poucas diferenças morfológicas.

Portanto, assim como nas pesquisas citadas acima, o gene COI mostrou-se eficiente na identificação das espécies de flebotomíneos nesta pesquisa, sendo possível a identificação de 79,76% em nível de espécie, e em alguns casos que houve divergência nos bancos de DNA, foi possível a identificação em nível de gênero, 20,24%. Todavia, o gene COI como único marcador para diferenciar as espécies de flebotomíneos ainda se apresenta com limitações, uma vez que a quantidade de sequências depositadas no banco de dados de sequências genéticas ainda é limitado e apresenta inconsistências. Por isso, várias pesquisas como Mejía *et al.* (2018), Lozano-Sardaneta *et al.* (2020), Contreras Gutierrez *et al.* (2014), Pinto *et al.* (2015) e Romero-Ricardo *et al.* (2016) vêm utilizando o gene COI juntamente com a identificação morfológica,

para melhor diferenciar as espécies de flebotomíneos. Conforme Mejía *et al.* (2018) e Contreras Gutierrez *et al.* (2014), que ressalta a eficácia da abordagem do DNA barcoding para diferenciar espécies de flebotomíneos, no entanto, como uma ferramenta adicional para a identificação baseada em características morfológicas. Assim, sugere-se que estudo sistemático de revisão da classificação e sequências depositadas poderia esclarecer as inconsistências e tornar a identificação molecular suficiente para estudos de distribuição de espécies.

### 8.3 ANÁLISE DAS RELAÇÕES EVOLUTIVAS

Galati *et al.* (2017) destaca que os taxonomistas de flebotomíneos estão diante de um relevante desafio, considerando a ideia de uma taxonomia em conjunto com outros pontos além do morfológico, tendo em vista que características morfológicas e morfométricas são de grande importância, porém outros pontos precisam ser analisados, como por exemplo, comportamento da espécie, dados bioquímicos, ecológicos, e dados moleculares. Ressaltando ainda que é necessário fazer a padronização dos marcadores moleculares utilizados para identificar espécies, bem como as sequências obtidas sejam depositadas em bancos de dados com livre acesso, permitindo análises futuras. Nesta pesquisa foi utilizado o gene COI para diferenciar as espécies de flebotomíneos, e apesar de apresentar algumas limitações, foi possível identificar a maioria das amostras em nível de espécies.

A análise evolutiva através dos métodos de inferências filogenéticas destas espécies foi analisada através do método de distância, UPGMA e NJ, e pelo método de MV. Observando-se as árvores geradas baseadas pelo método de distância, podemos observar que a árvore de UPGMA (Figura 09) apresenta-se relativamente resolvida, em que as espécies do mesmo gênero se agrupam no mesmo clado, com poucos cladogramas duplicados para alguns gêneros, como é o caso do gênero *Nyssomyia*, *Brumptomyia* e *Psychodopygus*. A árvore gerada pelo método de NJ apresentou similaridade com a árvore de UPGMA. No entanto, entre estas duas árvores optamos por considerar melhor o método NJ, pois considera não somente a similaridade para a construção da árvore, como é o caso do método UPGMA, como também o padrão de distância das sequências para sua construção.

Desta forma, o gênero *Nyssomyia* na árvore gerada pelo método NJ (Figura 10) se apresenta em dois cladogramas, reunindo todas as espécies deste gênero, em que se observa que no primeiro clado das *Nyssomyia* estão agrupados os espécimes deste gênero coletadas nos municípios de Vitória do Jari, Porto Grande, Calçoene e Pacuíba, com valor de Bootstrap de 88%. Já no segundo clado, Bootstrap de 60%, agrupam os espécimes dos municípios de

Laranjal do Jari e de Serra do Navio identificados como sendo deste gênero. O mesmo ocorre para as espécies de *Ty. trichopyga*, tendo o primeiro clado sustentado com um Bootstrap de 81%, em que agrupa quatro espécimes de Oiapoque e um de Pracuúba e o segundo clado, formado por apenas dois espécimes, com alto valor de *Bootstrap*, 95%. As espécies *Bi. Flaviscutellata* ficaram todas reunidas em um único clado, sustentado com bootstrap de 99%, sendo a única espécie que ficou em um clado bem resolvido, juntamente com os dois espécimes identificados como *Lutzomyia sp.*, no entanto o valor de *bootstrap* muito baixo, 25%.

Na análise a partir da árvore gerada pelo método de MV (Figura 11), baseado em modelo evolutivo probabilístico de substituição de nucleotídeos, podemos observar, assim como apresentada na árvore NJ, as *Nyssomyia* reunidas em dois cladogramas, o primeiro com valor de bootstrap de 94% e o segundo com 96%. Tanto no primeiro como no segundo clado, as espécies *Ny. antunesi* e *Ny. delsonatali* aparecem isoladas em cladogramas internos, no entanto, em ramos próximos. Isto pode ser justificado por serem espécies muito semelhantes morfologicamente, tendo em vista que Galati e Ovallos (2012) descreveram duas novas espécies de flebotomíneos: *Ny. delsonatali* e *Ny. urbinattii*, que apresentam características morfológicas semelhantes a *Ny. antunesi*, sendo assim consideradas um conjunto de espécies intimamente relacionadas. Uma vez que estas espécies se apresentam como um complexo, sendo elas muito similares com detalhes pequenos que as diferenciam, há certa dificuldade na identificação morfológica. Assim, destaca-se a importância em identificar as espécies não somente considerando a morfologia delas, mas também através de dados moleculares das espécies, através de uma identificação integrativa como ressaltado por Galati *et al.* (2017), considerando outros fatores, além do morfológico para identificar as espécies de flebotomíneos.

Considerando a recente classificação da espécie *Ny. delsonatali* e sua semelhança com a espécie *Ny. antunesi*, quatro espécimes chamaram atenção na árvore gerada pelo método de MV, os espécimes VJ1F5 e VJ5M13, identificados como *Ny. antunesi*, estarem localizados no primeiro clado das *Ny. delsonatali*, assim como os espécimes LJ6F12 e LJ5F3, também identificados como *Ny. antunesi*, estarem no segundo clado das *Ny. delsonatali* (Figura 11). Isto pode ser explicado pelo fato que a sequência com maior similaridade usada para identificar os espécimes em questão (depositada no banco de dados NCBI com o código MG234390.1) foi identificada morfolologicamente segundo Galati (2003), classificação esta que não consta a espécie *Ny. delsonatali*, pois esta espécie somente foi classificada em 2012 por Galati e Ovallos. Desta forma, Rodrigues *et al.* (2018) em seus resultados consideraram somente *Ny. antunesi* e depositaram a sequência MG234390.1 assim identificada, no entanto, nossos

resultados, com base na árvore de MV, sugere que estes espécimes sejam *Ny. delsonatali* e não *Ny. antunesi*.

As *Ny. umbratilis* ficaram agrupadas em um único clado interno ao primeiro clado, sustentado com bootatrap de 93%, com exceção de um único exemplar, 2LJ5F2 *Ny. umbratilis*, que ficou agrupado no segundo clado das *Nyssomyias*, em um ramo sustentado com bootstrap de 96%, o que nos possibilita dizer que possivelmente não seja a espécie *Ny. umbratilis*. Scarpassa e Alencar (2012) em sua pesquisa usando o gene COI, ressaltaram que a espécie *Ny. umbratilis* é um complexo de espécie que apresenta um grau de dificuldade para descrição taxonômica, e que esta espécie estar intimamente relacionada com a espécie *Ny. anduzei*.

As amostras identificadas molecularmente como *Th. ininii* ficaram todas juntas no mesmo clado com alto valor de bootstrap, 99%, com exceção da única espécie identificada como *Th. flochi*, que ficou em clado diferente. Esta espécie foi identificada de acordo com banco de dados BOLD, tendo em vista que apresentou maior similaridade, 98,96%, levando em consideração que é uma espécie sem registro no estado do Amapá, sugere-se um estudo mais aprofundado no município de Laranjal do Jari, localidade onde este espécime foi coletado. As *Ty. trichopyga* ficaram de certa forma agrupadas, no entanto, duas espécimes ficaram em clado diferente, sustentadas por um ramo com *bootstrap* de 99%. Assim como na árvore gerada pelo método de NJ, a espécie *Bi. flaviscutellata* ficou agrupada em um único clado, sustentado com bootstrap de 99%. Os espécimes identificados como sendo dos gêneros *Brumptomyia* e *Psychodopygus* ficaram agrupados próximos, com exceção de um ou dois espécimes.

Desta forma, a análise das relações evolutivas realizadas neste estudo serve como apoio para a análise feita no banco de dados do GenBank e do BOLD, como forma de identificação das espécies de flebotomíneos. Assim, a árvore gerada pelo método de NJ em conjunto com o teste de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) apresentou-se como a forma mais adequada para analisar árvores usando método de distância (NEI; KUMAR; TAKAHASHI, 1998). No entanto, a árvore gerada pelo método da MV, é a que oferece maior confiança na disposição da árvore, juntamente com a análise de bootstrap, que na maioria dos clados apresentou valor alto. Portanto, quando se têm dados suficientes, bem como um modelo evolutivo adequado, o método da MV pode oferecer a topologia de árvore mais completa (CHANG, 1996; ROGERS, 1997).

## 9 CONCLUSÃO

- A técnica de DNA *barcoding* permitiu a identificação de 15 espécies de flebotomíneos pertencentes a 9 gêneros, demonstrando assim a grande diversidade de espécies que circulam no estado do Amapá;
- O DNA *barcoding* se mostra como uma ferramenta útil na identificação de flebotomíneos, principalmente em nível de gênero, mas também em nível de espécie, embora com algumas limitações. Assim, sugere-se que a identificação molecular seja feita em combinação com a análise morfológica;
- As espécies de importância médica registradas nesta pesquisa foram *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia umbratilis* e *Psychodopygus squamiventris squamiventris*, sendo estas espécies encontradas nos municípios de Oiapoque, Vitória do Jari e Laranjal do Jari, ressaltando a importância de estudos epidemiológicos nestes município, tendo em vista o papel destas espécies de flebotomíneos na transmissão da Leishmaniose no estado;
- Para a inferência filogenética das espécies identificadas nesta pesquisa, o método de Máxima Verossemelhança foi o que apresentou uma árvore com os espécimes do mesmo gênero mais agrupados e com valores altos de bootstrap;
- Um espécime identificado como *Th. flochi* foi coletado no presente estudo, sendo esta uma espécie sem registro anterior no estado do Amapá. Portanto, sugere-se um estudo mais aprofundado no município de Laranjal do Jari, localidade onde este espécime foi coletado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M.; MARCO, T. S.; *et al.* Ecologia dos Flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I - A Fauna Flebotomínica e Prevalência pelo Local e Tipo de Captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Públ.**, 12(2):195-206, 1996.
- AGUIAR, G. M.; VIEIRA, V. R. Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species. *In*: RANGEL, E.F.; SHAW, J.J. **Brazilian Sand Flies**. Rio de Janeiro: ED. Fiocruz. p. 251-298. 2018.
- AGUIAR, G. M.; VILLELA, M. L. Aspects of the ecology of sandflies at the Serra dos Órgãos Park, State of Rio de Janeiro. VI. Shelters and breeding places (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 82:585-586, 1987.
- ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NOGUEIRA, P. M.; *et al.* Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1820(9):1354-1365, 2012.
- ALMEIDA, P. S.; NASCIMENTO, J. C.; FERREIRA, A. D.; *et al.* Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Bras Entomol**, 54: 304-310, 2010a.
- ALMEIDA, P. S.; MINZÃO, E. R.; MINZÃO, L. D.; *et al.* Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 43(6):723-727, 2010b.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; *et al.* Canine Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, 57:1-88, 2004.
- ARAKI, A. S.; VIGODER, F. M.; BAUZER, L. G.; *et al.* Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 3:e365, 2009.
- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66:1933-1938, 2000.
- ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. Sobre os vetores da leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebotomos selváticos. **Acta Amazônica**, 8:387-396, 1978.
- ARIAS, J. R.; NAIF, R. D.; MILES, M. A.; SOUZA, A. A. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 75:537-541, 1981.

- ARIAS, J. R.; FREITAS R. A. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in Central Amazon of Brasil. 3. Phlebotomine sandfly stratification in a terra firme forest. **Acta Amazonica**. 12: 599-603, 1982.
- ARRIVILLAGA, J.; NORRIS, D. E.; FELICIANGELI, M. D.; LANZARO, G. C. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Infect. Genet. Evol.**, 2(2):83-95, 2002.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18:489-522, 1987.
- AZPURUA, J.; DE LA CRUZ, D.; VALDERAMA, A.; WINDSOR, D. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 4:e627, 2010
- BARATA, R. A.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; *et al.* Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an endemic area of American Visceral Leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99:481-487, 2004.
- BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38(5):421-425, set-out, 2005.
- BARROS, V. L. L., REBÊLO, J. M. M.; SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) de capoeira do município de Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área de transmissão de leishmaniose. **Cadernos de Saúde Pública**, 16:265-270, 2000.
- BASANO, S. A; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose Tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia.**, 7(3), 2004.
- BATES, P. A.; DEPAQUIT, J.; GALATI, E. A. B.; *et al.* Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasit Vectors**, 8(131), 2015.
- BEATI, L.; CÁCERES, A. G.; LEE, J. A.; MUNSTERMANN, L. E. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. **Int. J. Parasitol.**, 34:225-234. 2004
- BESANSKY, N.; SEVERSON, D. W.; FERDIG, M. T. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: What you don't know can hurt you. **Trends Parasitol**, 19:545-546, 2003.
- BOORE, J. L. Animal Mitochondrial Genomes. **Nucleic Acids Researches**, 27:1767-1780. 1999.
- BOORE, J. L.; LAVROV, D. V.; BROWN, W. M. Gene translocation links insects and crustaceans. **Nature**, 392(6677):667-668, 1998.

BOEHME, P.; AMENDT, J.; ZEHNER, R. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. **Parasitol Res**, 110(6):2325-2332, 2011.

BOROVSKY, D.; SCHLEIN, Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, 1(3):235-242, 1987.

BRASIL. Banco de Dados de Informações Ambientais – BDIA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Geomorfologia**. 2021. Disponível em: <https://bdiaweb.ibge.gov.br/#/consulta/geomorfologia>. Acesso em 19 de outubro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação –SINAN. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/ltaap.def>. Acesso em 19 de março de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [recurso eletrônico] Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2017, 189 p.

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

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

BRAZIL, R. P.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L. Notes on phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae) from Amapá State, North Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 16:40-41, 2000.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia: Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (org.) **Flebotomíneos do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 257-274.

CABANILLAS, M. R. S.; CASTELLÓN, E. G. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) on tree-trunks in a non-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94:289-296, 1999.

CARVALHO, A. C. A. **Economia dos produtos florestais não madeiros no Estado do Amapá: sustentabilidade e desenvolvimento endógeno**. 174 f. Tese de Doutorado – Núcl. de Alt. Estud. Amaz., Universidade Federal do Pará. Belém, 2010.

CAPPAI, R.; MORRIS, L.; AEBISCHER, T.; *et al.* Ricin-resistant Mutants of *Leishmania* Major Which Express Modified Lipophosphoglycan Remain Infective for Mice. **Parasitology**, 108:397-405, 1994.

CASTELLÓN, E. G.; FÉ, N. F.; BURHNHEIM, P. F.; FÉ, F. A. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) na Amazônia. II. Listagem das espécies coletadas na Bacia Petrolífera no Rio Urucu, Amazonas, Brasil, utilizando diferentes armadilhas e iscas. **Rev. Bras. Zool.**, 17:455-462, 2000.

CDC. Centers for disease control and prevention. **Parasites - Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em 18 de novembro de 2020.

COELHO-FINAMORE, J. M. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **Int J Parasitol.**, 41:333-342, 2011.

COLACICCO-MAYHUGH, M. G.; MASUOKA, P. M.; GRIECO, J. P. Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. **International Journal of Health Geographics**, 9(2):1-9, 2010.

COHNSTAEDT, L. W.; BEAT, L.; CACERES, A. G.; *et al.* Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group *Verrucarum* (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 84:913-922, 2011.

CONTRERAS-GUTIÉRREZ, M. A.; VIVERO, R. J.; VÉLEZ, I. D.; PORTER, C. H.; URIBE, S. DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. **PLoS ONE.**, 9:e85496. 2014.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, 5(11):873-882, 2007.

CHANG, K. P.; FONG, D.; BRAY, R. S. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis, p. 1-30. In: CHANG, K.P.; BRAY, R.S. (ed.). **Leishmaniasis**. London: Elsevier, 1985.

CHANG, J. T. Full reconstruction of Markov models on evolutionary trees: identifiability and consistency. **Math. Biosci.**, 137:51-73, 1996.

DEPAQUIT, J.; FERTÉ, H.; LÉGER, N.; *et al.* ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera: Psychodidae): possible consequences in the irability to transmit *Leishmania tropica*. **Int. J. Parasitol.**, 32:1123-31, 2002.

DEPAQUIT, J.; PERROTEY, S.; LECOINTRE, G.; *et al.* Molecular systematics of Phlebotominae: apilotstudy. Paraphyly of the genus *Phlebotomus*. **C.R. Acad. Sci. III**, 321:849-55, 1998.

DEPAQUIT, J. Molecular systematics applied to phlebotomine sandflies: review and perspectives. **Infect. Genet. Evol.**, 28:744-756, 2014.

DE LA CRUZ, V. F., NECKELMANN, N.; SIMPSON, L. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. **Journal of Biological Chemistry**, 259(15):136-147, 1984.

DE SOUZA ROCHA, L.; FALQUETO, A.; SANTOS, C. B.; *et al.* Genetic structure of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 76:559-565, 2007.

- DIAS, E. S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40:49-52, 2007.
- DUTARI, L.; LOAIZA, J. R. Molecular validation of anthropophilic Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) in Central Panama. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 114:e190034, 2019.
- ESSEGHIR, S.; READY, P. D.; KILLICK-KENDRICK, R.; BEN-ISMAIL, R. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of Phlebotomus vectors of Leishmania major. **Insect Mol. Biol.**, 6(3):211-25, 1997.
- ESSEGHIR, S.; READY, P. D.; BEN-ISMAIL, R. Speciation of Phlebotomus sandflies of the subgenus Larrousius coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. **Biol. J. Linn. Soc.**, 70:189-219, 2000.
- EBRAHIMI, S.; BORDBAR, A.; PARVIZI, P. Genetic dynamics in the sand fly (Diptera: Psychodidae) nuclear and mitochondrial genotypes: evidence for vector adaptation at the border of Iran with Iraq. **Parasites & Vectors**, 9:319, 2016.
- FELICIANGELI, M. D. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in Northern Venezuela: III. Seasonal fluctuation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 82(2):167-6, 1987.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39(4):783-791, 1985.
- FILOCREÃO, A. S. M. (org.) **Amapá 2000-2013**. São Paulo: Editora Fundação Perseu Abramo, 2015, p. 9.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology**, 3:294-299, 1994.
- FOUQUE, F.; GABORIT, P.; ISSALY, J.; *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102:35-40, 2007.
- FORATTINI, O. P. Notas sobre Phlebotomus do território do Amapá, Brasil (Diptera:Psychodidae). **Stud Entomol**, 3:467-48, 1960.
- FORATTINI, O. P. Sobre os flebótomos do território do Amapá, Brasil. **Ar Hig.**, 13:159-164, 1959.
- FREITAS, R. A.; BARRETT, T. V.; NAIFF, R. D. *Lutzomyia reducta* Feliciangeli *et al.*, 1988, A host of *Leishmania amazonensis*, Sympatric with two other members of the *Flaviscutellata* complex in southern Amazonas and Rondonia, Brazil (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 84(3):363-369, 1989.
- FREITAS, R. A.; NAIFF, R. D.; BARRET, T. V. 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. 2002.

FUJITA, M.; KATO, H.; CÁCERES, A. G.; *et al.* Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic. **Acta Trop.**, 121:93-98, 2012.

FURTADO, N. V. R.; GALARDO, A. K. R.; GALARDO, C. D.; *et al.* Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a hydroelectric system affected area from Northern Amazonian Brazil: Further insights into the effects of environmental changes on vector ecology. **Journal of Tropical Medicine**, 9819723:12, 2016.

GALATI, E. A. B. Classificação dos Phlebotominae. *In*: RANGEL, E.F; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003. p. 23-51.

GALATI, E. A. B.; GALVES-OVALLOS, F.; LAWYER, P.; *et al.* An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite**, 24:26, 2017.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas**. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2019. 133p. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/egalati>. Acesso em 26 de setembro de 2020.

GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematics of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. (*II Intern. Symp. Phlebotomine Sandflies*). **Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental**, 35(supl.1):133-142, 1995.

GALATI, E. A. B.; OVALLOS, F. G. Description of Two New Sand Fly Species Related to *Nyssomyia antunesi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **J. Med. Entomol.**, 49(2):238-252, 2012.

GARNHAM, P. C. C. Introduction. *In*: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. 1987. p. 13-25.

GENTILE, B.; LE PONT, F.; PAJOT, F. X.; BESNARD, R. Dermal leishmaniasis in French Guiana: the sloth (*Choloepus didactylus*) as reservoir host. **Trans Roy Soc Trop Med Hygiene**, 75:612-613, 1981.

GIL, L. H. S.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; *et al.* Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: The importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98:751-755, 2003.

GOMES, A. C.; GALATI, E. A. B. Aspectos da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5. Estratificação da Atividade Espacial e Estacional de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) em Áreas de Cultura Agrícola da Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82(4):467-473, 1987.

GODOY, R. E.; SHIMABUKURO, P. H. F.; SANTOS, T. V.; *et al.* Geometric morphometry of the head in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an alternative approach to taxonomy Studies. **Zootaxa.**, 26;4504(4):566-576, 2018.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, 36(1):71-80, 2003.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, 6(3):230-50, 1993.

GRIMALDI, G. JR.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 44:645-661, 1991.

HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D. H.; BURNS, J. M.; *et al.* DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103:968-971, 2006.

HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends Ecol Evol.**, 4(1):6-11, 1989.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci.**, 270(1512):313-21, 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Syst Biol**, 54:852-859, 2005.

HUGHES, G. L.; SAMUELS, S. K.; SHAIKH, K.; *et al.* Discrimination of the Plasmodium mexicanum vectors Lutzomyia stewarti and Lutzomyia vexator by a PCR-RFLP assay and Wolbachia infection. **J. Vector Ecol.**, 39(1):224-227, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades e Estados**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ap.html?>. Acesso em 25 de março de 2019.

ILG, T.; ETGES, R.; EVERATH, P.; *et al.* Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. **J Biol Chem.**, 267:6834-6840, 1992.

JINBO, U.; KATO, T.; ITO, M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. **Entomol Sci**, 14:107-124, 2011.

JOBLING, B. **Anatomical drawings of biting flies**. British Museum (Natural History). 1987. p. 17-46.

JORDAENS, K.; SONET, G.; RICHEL, R.; *et al.* Identification of forensically important Sarcophaga species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene. **Int J Legal Med**, 127(2):491-504, 2013.

KAMHAWI, S.; MODI, G. B.; PIMENTA, P. F.; ROWTON, E.; SACKS, D. L. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. **Parasitology**, 121(1):25-33, 2000.

- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**, 17: 279-289, 1999.
- KUMAR, N. P.; SRINIVASAN, R.; JAMBULINGAM, P. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. **Molecular Ecology Resources**, 12:414-420, 2012.
- LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(1):210-215, 2002.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; READY, P. D.; MILES, M. A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies wild mammals and man in north Pará State with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* agente of “pian-bois”. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 75:530-536, 1981.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; WARD, R. D.; READY, P. D.; NAIFF, R. D. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará state. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 73:239-242, 1979.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 12-120.
- LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, 266:628-30, 1977.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; *et al.* The dermal Leishmaniasis of Brazil, with special reference to the Eco- epidemiology of the disease in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89(3):435-443, 1994.
- LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; DANTAS-TORRES, F.; *et al.* Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region. **Vet. Parasitol.**, 184:267-270, 2012.
- LEWIS, D. J. A. Taxonomic Review of the Genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Ent)**, 45(2):121-209, 1982.
- LOZANO-SARDANETA, Y. N.; PATERNINA, L. E.; SÁNCHEZ-MONTES, S.; *et al.* DNA barcoding and fauna of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. **Acta Tropica**, 201:105220, 2020.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia médica**. Rio de Janeiro:Atheneu, 2001. 432 p.
- MARCONDES, C. B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. **Entomological News**, 118:351-356, 2007.

MARINHO, R. M.; FONTELES, R. S.; VASCONCELOS, C.; *et al.* Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Rev Bras Entomol**, 52:112-116, 2008.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med Vet Entomol.**, 27:123-147, 2013.

MCCONVILLE, M. J.; THOMAS-OATS, J. E.; FERGUSON, M. A.; HOMANS, S. W. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.**, 265(32):19611-23, 1990.

MEJÍA, A.; MATAMOROS, G.; FONTECHA, G.; SOSA-OCHOA, W. Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. **Parasites & Vectors**, 11(15), 2018.

MICHALICK, M. S. M; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. *In*: NEVES, D.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 56-72.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; *et al.* Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 5:255-259, 2002.

MISCEVIC, Z. Dependence of the flight of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in artificial light on the temperature and relative humidity. **Acta Veterinaria** (Beograd) 31: 32-39, 1981

MINTER, L. M.; YU, T.; FLORIN, D. A.; *et al.* Molecular identification of sand flies (Diptera: psychodidae) in Eastern North America by using PCR-RFLP. **J. Med. Entomol.**, 50:920-924, 2013.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18:269-292, 1987.

MUSKUS, C.; SEGURA, I.; ODDONE, R.; *et al.* Carbohydrate and LPG expression in *Leishmania Viannia* subgenus. **J. Parasitol**, 83:671-678, 1997.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo:Atheneu, 2010. 494 p.

NEI, M.; KUMAR, S.; TAKAHASHI, K. The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95:12390-12397, 1998.

NOGUEIRA, P. M.; ASSIS, R. R.; TORRECILHAS, A. C.; *et al.* Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* strains display immunomodulatory properties via TLR4 and do not affect sand fly infection. **Plos Negl Trop Dis**, 10:e0004848, 2016.

OLIVEIRA, A. G.; FILHO, J. D. A.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cad Saúde Pública**, 19(4):933-944, 2003.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S.R.F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39(6):540-543, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: **Leishmanioses**: Informe Epidemiológico nas Américas. Informe de Leishmanioses Nº 6 - Fevereiro, 2018. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Disponível em: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Acesso em 10 de agosto 2020.

ORLANDI, P. A.; TURCO, S. J. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **J. Bioi. Chem.**, 262:10384-91, 1987.

PAIVA, B. R.; PASSOS, L. N.; FALQUETO, A.; *et al.* Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 46(6):335-338, 2004.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; *et al.* Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). **Cadernos de Saúde Pública**, 23(1):87-94, 2007.

PAJOT, F. X.; LE PONT, F.; GENTILE, B.; BESNARD, R. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 76:112-113, 1982.

PASSERO, L. F. D. *et al.* Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania* (*Viannia*) shawi. **Parasitology International**, 64:32-35, 2015.

PESSOA, F. A. C.; MEDEIROS, J. F.; BARRET, T. V. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102:593-9, 2007.

PEREIRA, E. F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LIMA, H. C.; *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Parana´state of southern Brazil. **Experimental Dermatology**, 17:1024-1030, 2008.

PEREZ, J. E.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; *et al.* Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 88(2):161-4, 1994.

PIMENTA, P. F.; SILVA, R. P.; SACKS, D. L.; SILVA, P. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. **Eur J Cell Biol**, 48(2):180-190, 1989.

PIMENTA, P. F.; SARAIVA, E. M.; ROWTON, E.; *et al.* Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proc Natl Acad Sci USA**, 139(19):9155-9156, 1994.

PIMENTA, P. F. P.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; *et al.* A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. **Parasitology**, 115:359-369, 1997.

PIMENTA, P. F. P.; *et al.* Biology of the *Leishmania* - Sand Fly Interaction. In: RANGEL, E.F.; SHAW, J.J. **Brazilian Sand Flies**. Rio de Janeiro: ED. Fiocruz, 2018. p. 319-339.

PINTO, I. S.; CHAGAS, B. D.; RODRIGUES, A. A. F.; *et al.* DNA barcoding of neotropical sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): species identification and discovery within Brazil. **PLoS ONE**, 10:e0140636, 2015.

PITA-PEREIRA, D.; CARLOS, R. A.; SOUZA, M. B.; *et al.* Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99(12):905-913, 2005.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, 107:66-69, 2008.

PRAMUAL, P.; KUVANGKADILOK, C.; BAIMAI, V.; WALTON, C. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. **Mol Ecol**, 14:3989-001, 2005.

RABELO, B. V.; PINTO, A. C.; SIMAS, A. P. S.; *et al.* **Macrodiagnóstico do Estado do Amapá: primeira aproximação do ZEE / Equipe Técnica do ZEE – AP**. 3. ed. rev. ampl. Macapá: IEPA, 2008.

RAMOS, W. R.; MEDEIROS, J. F.; JULIÃO, G. R.; *et al.* Anthropic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. **Acta Trop**, 139:44-52, 2014.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2003. 368 p.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104:937-954, 2009.

READY, P. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of "enzootic rodent leishmaniasis" (*Leishmania mexicana amazonensis*), and apparent absence of "pian bois" (*Le. Braziliensisguyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forests in eastern Amazônia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 77:775-785, 1983.

READY, P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, 58:227-250, 2013.

REBÊLO, J. M. M.; LEONARDO, F. S.; COSTA, J. M.; OLIVEIRA-PEREIRA, Y.; SILVA, F. Sandflies (Diptera: Psychodidae) from an endemic leishmaniasis area in the cerrado region of the State of Maranhão, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 15:623-630, 1999.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RODRIGUES, B. L.; CARVALHO-COSTA, L. F.; PINTO, I. S.; REBÊLO, J. M. M. DNA Barcoding Reveals Hidden Diversity of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Fine and Broad Spatial Scales in Brazilian Endemic Regions for Leishmaniasis. **J Med Entomol.**, 55(4):893-901, 2018.

RODRÍGUEZ, N.; AGUILAR, C. M.; BARRIOS, M. A.; BARKER, D. C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, 93:47-49, 1999.

ROGERS, J. S. On the consistency of maximum likelihood estimation of phylogenetic trees from nucleotide sequences. **Syst. Biol.**, 46:354-357, 1997.

ROMERO-RICARDO, L.; LASTRE-MESA, N.; PÉREZ-DORIA, A.; BEJARANO, E. E. DNA barcoding to identify species of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) in the mixed leishmaniasis focus of the Colombian Caribbean. **Acta Tropica**, 159:125-31, 2016.

ROSÁRIO, I. N.; ANDRADE, A. J.; LIGEIRO, R.; *et al.* Evaluating the adaptation process of sand fly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. **J Med Entomol.**, 54:450-9, 2017.

RYAN, L.; SILVEIRA, F. T.; SHAW, J. J. Leishmanial infections in *Lu. longipalpis* and *Lu. Antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajo, Para State Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 78:547-8, 1984.

RUTLEDGE, L. C.; ELLENWOOD, D. A. Production of plebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The Species. **Environmental Entomology**, 4:71-77, 1975.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of infective stage of *Leishmania* promastigotas. **Science**, 223:1417-1419, 1984.

SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Infect Agents Dis.**, 1(4):200-206, 1992.

SACKS, D. L.; SARAIVA, E. M.; ROWTON, E.; *et al.* The role of lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. **Parasitology**, 108:55-62, 1994.

SACKS, D. L.; MODI, G.; ROWTON, E.; *et al.* The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 97(1):406-411, 2000.

SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, (55):453-83, 2001.

SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T. L.; HORN, G. T.; *et al.* Analysis of enzymatically amplified betaglobin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, 324(6093):163-6, 1986.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; *et al.* Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, 12:315-7, 1998.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **J Med Ent.**, 23(1):11-5, 1986.

SANTOS, R. **Atributos naturais da paisagem do estado do Amapá: abordagem multiescalar**. Tese (Doutorado) – Campinas, SP: [s.n.], 2019.

SARAIVA, E. M.; PIMENTA, P. F.; BRODIN, T. N.; *et al.* Changes in lipophosphoglycan and gene expression. Associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, 111:275-287, 1995.

SARAIVA, J. F.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) coletados em um assentamento rural no Estado do Amapá, Brasil. **Biota Amazonia**, 58-62, 2011.

SEBLOVA, V.; VOLFOVA, V.; DVORAK, V.; *et al.* *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 7:e2187, 2013.

SCARPASSA, V. M.; CARDOZA, T. B.; CARDOSO-JÚNIOR, R. P. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 78:895-903, 2008.

SCARPASSA, V. M.; ALENCAR, R. B. *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of *Leishmania guyanensis*, represents a novel species complex? **PloS One**, 7:1-10, 2012.

SCARPASSA, V. M.; ALENCAR, R. B. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. **Parasit Vectors**, 6:258, 2013.

SCORZA, J. V.; ORTIZ, I.; GOMEZ, I. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 6- Sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomofauna de “Rancho Grande”. **Acta Biologica Venezuelica**, 6:76-83, 1968.

SCORZA, J. V. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela) 2. Microhabitats de *Phlebotomus* sp. (Diptera, Psychodidae). **Acta Biol. Venezuela**, 6:1-27, 1969.

SECCOMBE, A. K.; READY, P. D.; HUDDLESTON, L. M. A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *In*: LANE, R.P.; BARNARD, P.C. (eds.). **The Natural History Museum**. Occas Pap Syst Ent: 1-57, 1993.

SHAW, J. J.; LAINSON, R.; WARD, R. D. Leishmaniasis in Brazil. VII. Further observations on the feeding habitats of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) with particular reference to its biting habits at different heights. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 66:718-723, 1972.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, 2:251-257, 2004.

SILVA, D. F.; FREITAS, R. A.; FRANCO, A. M. R. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. **Neotropical Entomology**, 36(1):138-144, 2007.

SILVA, P. E. S.; FREITAS, R. A.; SILVA, D. F.; ALENCAR, R. B. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma reserva de campina no Estado do Amazonas, e sua importância epidemiológica. **Rev Soc Bras Med Trop**, 43(1):78-81, 2010.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; *et al.* Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann Entomol Soc Am**, 87:651-701, 1994.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, 49:55-60, 2003.

SOARES, R. P. P.; MACEDO, M. E.; ROPERT, C.; *et al.* Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 121(2):213-24, 2002.

SOARES, R. P. P.; CARDOSO, T. L.; BARRON, T.; *et al.* Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**, 35(3):245-253, 2005.

SOARES, R. P.; MARGONARI, C.; SECUNDINO, N. C.; *et al.* Differential midgut attachment of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*. **J BiomedBiotechnol.**, 439174:1-7, 2010.

SOLOMON, O.; ROSA, J. R.; STEIN, M.; *et al.* Phlebotominae (Díptera: Psychodidae) fauna in the Chaco region and Cutaneous Leishmaniasis transmission patterns in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 103(6):578-584, 2008.

SOUZA FREITAS, M. T.; RÍOS-VELASQUEZ, C. M.; COSTA JR., C. L. R.; *et al.* Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. **Parasites & Vectors.**, 8:448, 2015.

SOUZA, A. A. A.; BARATA, I. R.; SILVA, M. G. S.; *et al.* Natural *Leishmania* (*Viannia*) infections of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) indicate classical and alternative

transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis in the Guiana Shield, Brazil. **Parasite.**, 24:13, 2017.

SOUZA, R. S.; SOUZA, A. L.; LEITE, H. G.; YARED, J. A. G. Análise estrutural em Floresta Ombrófila Densa de terra firme não explorada, Amazônia Oriental. **Rev. Árvore.** 30(1):75-87, 2006.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, 118:1301-1310, 2008.

TERAYAMA, Y.; KATO, H.; GOMEZ, E. A.; *et al.* Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. **J. Vet. Med. Sci.**, 70(9):907-913, 2008.

TIWARY, P.; KUMAR, D.; RAI, M.; SUNDAR, S. PCR-RFLP based method for molecular differentiation of sand fly species *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus papatasi*, and *Sergentomyia babu* found in India. **J. Med. Entomol.**, 49(6):1515-1518, 2012.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol.** 46:65-94, 1992.

VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; PRÉVOT, G.; GINOUVÈS, M.; *et al.* Ecological aspects of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) and the transmission of American cutaneous leishmaniasis agents in an Amazonian/ Guianan bordering área. **Parasites & Vectors**, 11(612), 2018.

VIRGILIO, M. L.; BACKELJAU, T.; NEVADO, B.; MEYER, M. Comparative performances of DNA barcoding across insets orders. **BMC Bioinforma.** 11(206), 2010.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **J. Euk. Microbiol.**, 40:196-206, 1993.

WALTERS, L. L.; CHAPLIN, G. L.; MODI, G. B.; TESH, R. B. Ultrastructural biology of *Leishmania* (Viannia) *panamensis* (= *Leishmania braziliensis braziliensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 40:19-39. 1989

WARD, R. D.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; FAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotomine fauna of an area of highly endemic cutaneous leishmaniasis in the Serra dos Carajás, Pará state. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 67(2):174-83, 1973.

WARD, R.; FRAIHA H. *Lutzomyia umbratilis* a new species of sandfly from Brazil (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, 14:3131-3317, 1977.

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 89:95-100, 1995.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; CARR, S. M.; *et al.* Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of Linnean Society**, 26:375-400, 1985.

WILLIAMS, P. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 64:317-368, 1970.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**: background information. 2015 Disponível em: [www.who.int/topics/leishmaniasis/en](http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en) 2015. Acesso em

XIMENES, M. F. F. M.; SILVA, V. P. M.; QUEIROZ, P. V. S.; *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - Reflexos do Ambiente Antropico. **Neotrop Entomol**, 36(1):128-137, 2007.

YOUNG, D. G; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, 54:1-881, 1994.