



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

THIAGO DE ALMEIDA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E
ESTRUTURA POPULACIONAL POR MEIO DA REGIÃO DE
CYT B DO DNA MITOCONDRIAL DE *Nyssomyia whitmani*
(Diptera, Psychodidae), EM DIFERENTES REGIÕES
FITOGEOGRÁFICAS NO ESTADO DO MARANHÃO**

São Luís – MA

2018

THIAGO DE ALMEIDA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E
ESTRUTURA POPULACIONAL POR MEIO DA REGIÃO DE
CYT B DO DNA MITOCONDRIAL DE *Nyssomyia whitmani*
(Diptera, Psychodidae), EM DIFERENTES REGIÕES
FITOGEOGRÁFICAS NO ESTADO DO MARANHÃO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Maranhão,
como requisito para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. José Manuel Macário Rebêlo

Co-orientador: Prof. Luís Fernando Costa

São Luís - MA

2018

CARACTERIZAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL POR MEIO DA REGIÃO DE CYT B DO DNA MITOCONDRIAL DE *Nyssomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae), EM DIFERENTES REGIÕES FITOGEOGRÁFICAS NO ESTADO DO MARANHÃO.

Thiago de Almeida Bezerra

Aprovado em / /2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Silma Regina Ferreira Pereira
(Examinadora)

Prof. Dr. Francinaldo Soares Silva
(Examinador)

Prof.^a Dr.^a Patrícia Maia Correia de Albuquerque
(Suplente)

Prof.^a Dr.^a Mayara Ingrid Sousa Lima
(Suplente)

de Almeida Bezerra, Thiago.

CARACTERIZAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL POR MEIO DA REGIÃO DE CYT B DO DNA MITOCONDRIAL DE *Nyssomyia whitmani* Diptera, Psychodidae, EM DIFERENTES REGIÕES FITOGEOGRÁFICAS NO ESTADO DO MARANHÃO / Thiago de Almeida Bezerra. - 2018.

60 f.

Coorientador(a): Luís Fernando Carvalho Costa.

Orientador(a): José Manuel Macário Rebêlo.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Filogeografia. 2. Flebotomíneo. 3. Genética de Populações. 4. Insetos Vetores. 5. *Nyssomyia whitmani*.
I. Carvalho Costa, Luís Fernando. II. Macário Rebêlo, José Manuel. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A primeira grande etapa da minha vida acadêmica está sendo concluída com esta monografia. Em todos esses anos o curso de Ciências Biológicas me ensinou o cerne da biologia. A vivência acadêmica na universidade me ensinou a ser um arauto da ciência e os professores que participaram efetivamente da minha formação me ensinaram a ser um eterno aprendiz. Entre aulas, provas, trabalhos, palestras e alguns percalços se passaram seis anos. Anos estes que tive o prazer e a honra de conhecer excelentes profissionais da ciência, entre eles o fundador do curso que me formou, Professor Kerr, que um dia me disse que estudar era o único caminho e que deu o pontapé neste caminho que trilhei. Caminho este que tive meu Pai, José Mauricio Dias Bezerra, como meu guia. Como doutor em genética me ajudou a desenvolver este trabalho e como pai me deu apoio e incentivo em todas as minhas decisões. Com certeza o período que estive na biologia está repleto de boas memórias, amizades e aprendizados que levarei sempre na minha vida.

As primeiras memórias de minha vida universitária me remetem à Secretaria Regional da SBPC, onde fui primeiramente acolhido pela secretária Andrea Viegas e pelo Professor Luís Alves, e, tenho muito a agradecer por isso. Na SBPC foi meu primeiro contato com as pesquisas acadêmicas realizadas no mundo universitário, tendo a possibilidade de participar de vários eventos científicos e um espaço para estudar com tranquilidade nos intervalos entre as aulas.

A minha primeira experiência em um laboratório de pesquisa foi no LabGeM, tendo sido acolhido pela Professora Silma Regina que me concedeu a primeira oportunidade de ter contato com as pesquisas em genética. Agradeço por isso. Também tenho a agradecer ao meu orientador, Professor Macário Rebêlo, por ter depositado em mim confiança de que eu poderia realizar os trabalhos de pesquisa propostos por ele; pelo incentivo, persistência e dedicação que teve por mim neste presente trabalho, mesmo com a minha vagareza; pelos conselhos, ensinamentos e amizade durante todos estes anos da minha vida acadêmica; e por ter me inserido na área de vetores e infectologia, que se transformou na minha paixão de estudo. Gostaria de agradecer também ao técnico do LEV, Jorge Moraes, pelas coletas realizadas, pois sem elas não seria possível realizar este trabalho. Não posso deixar de mencionar a participação do Professor Luís Fernando Carvalho pela oportunidade de realizar este trabalho no LabGeM, sob sua orientação, dando grande auxílio na análise dos dados.

Também devo agradecer aos meus colegas de laboratório Erick Barros, Joao Manoel, Jesiel Pablo e Bruno Leite pela amizade, pelos momentos compartilhados e pelas diversas vezes que me ajudaram a realizar algum procedimento laboratorial. Aos meus colegas do LabGeM, que diversas vezes me auxiliaram em experimentos, em especial à Santana. Aos meus amigos Felipe Jordão, Rodrigo Frias, Guilherme Baima, André Felipe, João Pedro e Fernando Fontes pelos conselhos, amizade, apoio e cumplicidade; que me ajudaram em alguns momentos da minha vida.

À minha mãe, que neste último ano tem me ajudado muito e me apoiado nas decisões que tive; a minha irmã, Mariana, que me ajudou por 15 minutos neste trabalho e a minha namorada, Maendra, que sempre apoia as minhas decisões, me encoraja e me ajuda sempre que preciso.

A todos os funcionários da UFMA, às instituições de fomento à pesquisa científica, professores e colegas que a biologia me proporcionou. E também gostaria de agradecer a Deus, pois Ele me proporcionou todas estas coisas, também saúde e forças para poder concluir esta etapa da minha vida.

Lista de Ilustrações:

Figura 1: Localizações dos pontos de coleta de N. whitmani no estado do Maranhão.

Figura 2: Distribuição de haplótipos e suas frequências nos locais amostrados neste estudo no estado do Maranhão.

Figura 3: Rede de haplótipos baseada no loco Cytb (B) de 164 pb para Nyssomyia whitmani. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. A cor do haplótipo representa cada amostra, da seguinte forma: azul: Barreirinhas; amarelo: Caxias; Marrom: Codó; verde: Colinas; preto: Ilhéus; lilás: Nyssomyia intermedia; rosa; São Domingos; azul claro: Senador La Roque; laranja: Presidente Dutra; cinza: o grupo externo; e vermelho: Urbano Santos. A linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional, os retângulos pretos representam uma mutação ocorrida e os haplótipos ausentes são indicados como círculos menores (em vermelho).

Figura 4: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança inferida a partir de 164 nucleotídeos do citocromo b de **N. whitmani**. Uma amostra de **P. panamensis** foi utilizada como grupo externo. Os valores de bootstrap são dadas acima dos nós (1000 réplica)

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Parâmetros de diversidade genética para o fragmento do gene do citocromo b de *Nyssomyia whitmani* de biomas do Maranhão e Mata Atlântica.

Tabela 2: Divergência genética (distância p) estimada usando o fragmento do gene do citocromo b de *N. whitmani* de biomas do Maranhão e Mata Atlântica. Valores abaixo da diagonal representam as distâncias genéticas entre os biomas e valores em negrito representam as distâncias dentro dos biomas.

Tabela 3: Divergência genética (distância p) estimada usando o fragmento do gene do citocromo b de *N. whitmani* de biomas do Maranhão separados por localidade e Mata Atlântica. Valores abaixo da diagonal representam as distâncias genéticas entre as localidades e valores em negrito representam as distâncias dentro de cada localidade. (Re) restinga; (Co) Mata de Cocais; (Ce) Cerrado; (Am) Floresta Amazônica; (Ma) Mata Atlântica.

Tabela 4: Divergências genéticas (distância p) entre *N. whitmani* e outras espécies do gênero estimadas usando o fragmento do gene do citocromo b. Valores abaixo da diagonal representam as distâncias genéticas interespecíficas e valores em negrito representam as intraespecíficas. Grupo externo: *Psychodopygus panamensis*.

CARACTERIZAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL POR MEIO DA REGIÃO DE CYT B DO DNA MITOCONDRIAL DE *Nyssomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae), EM DIFERENTES REGIÕES FITOGEOGRÁFICAS NO ESTADO DO MARANHÃO

Sumário

- 1. Abstract**
- 2. Introdução**
- 3. Metodologia**
 - 3.1. *Coleta do material de estudo***
 - 3.2. *Análises do DNA mitocondrial***
 - 3.2.1. *Técnica de extração de DNA total***
 - 3.2.2. *Quantificação e Qualificação do DNA***
 - 3.2.3. *Amplificação parcial do gene mitocondrial do citocromo b***
 - 3.2.4. *Análise dos dados***
- 4. Resultados**
- 5. Discussão**
- 6. Referencias**
- 7. Anexos**

José Manuel Macário Rebêlo. Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão. Avenida dos Portugueses 1966, Campus Dom Delgado, 65080-805, São Luís, Maranhão, Brasil.

Email: macariorebelo@uol.com.br Phone: +55 98 988057783

CARACTERIZAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL POR MEIO DA REGIÃO DE CYT B DO DNA MITOCONDRIAL DE *Nyssomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae), EM DIFERENTES REGIÕES FITOGEGRÁFICAS NO ESTADO DO MARANHÃO

THIAGO DE ALMEIDA BEZERRA¹, LUIS FERNANDO CARVALHO^{1,3}, JOSÉ MAURÍCIO DIAS BEZERRA², JORGE PINTO MORAES^{1,3}, JOSÉ MANUEL MACÁRIO REBÊLO^{1,3,4,5},

¹Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão.

²Departamento de Química e Biologia da Universidade Estadual do Maranhão

³Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte da Universidade Federal do Maranhão.

⁵Corresponding author, e-mail: macariorebelo@uol.com.br

ABSTRACT. Phylogenetic analysis of 15 mitochondrial DNA haplotypes of the cytochrome b *Nyssomyia whitmani* gene demonstrated that the sequences collected from Maranhão biomes have been genetically homogeneous with each other. However, a sampled population of Cocais region presented with a greater difference, being able to suggest a genetic drift applied on it, as an anthropization of this ecosystem for example. The Brazilian savanna region in the state of Maranhão may be a repository of genetic diversity and a gene flow between those of *N. whitmani* of the Amazon and the semi-arid northeast. An example is the case is the probable hybridization between Amazon *N. intermedia* and *N. whitmani* of the Brazilian savana found in this work.

KEYWORDS: *Nyssomyia whitmani*, Phlebotomines, Biodiversity, Phylogeography, Population genetics.

Os flebotomíneos constituem uma subfamília cosmopolita de dípteros nematóceros da família dos piscodídeos, muito diversificada e amplamente distribuída nas regiões faunísticas do mundo, tendo, aproximadamente, 800 espécies descritas. Recentemente, Galati (2003) propôs um estudo das relações filogenéticas dos flebotomíneos do Novo Mundo. A autora subdividiu a subfamília Phlebotominae em duas tribos: Hertigini, que inclui o gênero *Warileya*, *Hertigia*, e *Chinius*; e Phlebotomini, que foi subdividido em seis subtribos: Phlebotomina; Australophlebotomina; Brumptomyiina; Sergentomyiina; Lutzomyina e Psychodopygina. Alguns grupos e subgêneros anteriores à classificação foram elevados a gênero, sendo assim, os subgêneros da subtribo Psychodopygina foram elevados ao nível de gênero (*Psathyromyia*, *Viannamyia*, *Nyssomyia*, *Trichophoromyia* e *Psychodopygus*), resultando em uma nova organização sistemática. Outras grandes mudanças ocorreram, de modo que as 530 espécies ocorrentes passaram a ser distribuídas em 23 gêneros (Shimabukuro et al., 2017).

Além de sua importância como componentes da biodiversidade, os flebotomíneos se destacam pelo papel que desempenham no ciclo biológico de inúmeros parasitas. Nesse aspecto, é de grande interesse a sua função como vetores biológicos de protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), transmitindo-os para mamíferos por meio do repasto sanguíneo. Estes protozoários frequentemente comportam-se como patógenos causadores de leishmanioses visceral e tegumentar para o homem e outros mamíferos.

Uma das espécies mais conhecidas de flebotomíneos americanos é a *Nyssomyia whitmani*, não apenas por ser um dos principais vetores da leishmaniose tegumentar, como, também, devido a sua grande distribuição geográfica. Ela distribui-se em todas as regiões brasileiras, com registros em 720 municípios de 26 estados, com exceção do estado de Santa Catarina, onde ainda não foi encontrada. Os estados de Roraima, Acre, Tocantins e Mato Grosso do Sul apresentam o maior número de municípios com registros desta espécie (Costa, 2007; Aguiar & Medeiros, 2003). No Maranhão já foi encontrada em, pelo menos, 43 municípios, em áreas de floresta amazônica, cerrado, mata de cocais, restinga, entre outras (Rebêlo et al., 2010).

Esta espécie é considerada o principal vetor da *L. brasiliensis* nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil. É notável que a *N. whitmani* possui a ocorrência registrada na maioria desses locais, sugerindo assim que a *L. brasiliensis* possui como principal vetor esta espécie de flebotomíneo. No estado do Maranhão, a *N. whitmani* foi

registrada em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no município de Barreirinhas, Santo Amaro e Caxias, onde foi encontrada infectada por várias leishmânias, inclusive *L. brasiliensis* (Guimarães-Silva et al., 2017; Pereira Filho et al., 2018; Fonteles et al., 2017). Contudo, no Nordeste e Sudeste brasileiros, a transmissão de *L. brasiliensis* está associada também com outras espécies de flebotomíneos, entre elas *N. antunesi* (Rangel, 1996; Lainson & Shaw, 2005; Rangel & Lainson, 2003). Rodrigues (2018) demonstra a possibilidade de *N. antunesi* e *N. whitmani* estarem na mesma unidade taxonômica operacional. Pois, utilizando a região COI do DNAm de estas espécies verificou-se que elas são as espécies do gênero que possuem as menores distâncias interespecíficas. Estudos realizados com o gene COI mostram que estas espécies formam duas unidades taxonômicas operacionais distintas no Maranhão, a distância genética entre elas é duplamente inferior à média das distâncias interespecíficas entre as outras espécies de flebotomíneos. Este padrão foi mostrado em outro estudo com o gênero *Nyssomyia*, envolvendo *N. whitmani* e *N. intermedia*, os quais ocorrem nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil, e estão agrupados na mesma unidade taxonômica operacional (Pinto, 2015), enquanto *N. umbratilis* e *N. anduzei* observados na Amazônia brasileira apresentaram uma distância interespecífica baixa para os padrões de espécies de flebotomíneos (Scarpassa & Alencar 2013).

A extensa distribuição geográfica no continente americano mostra um exemplo notável de alta tolerância de um inseto a mudanças ecológicas (Peterson & Shaw, 2003). No Brasil, o desmatamento restringe os seus habitats e vem selecionando populações com potencial de infestar os peridomicílios (Rebêlo & Leonardo, 2007). Este comportamento explica a situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar nos dias atuais (Martins et al., 1978; Young & Duncan, 1994; Aguiar & Medeiros 2003; Rangel & Lainson, 2003).

Devido ao seu amplo padrão de distribuição e o seu papel como vetor da leishmaniose tegumentar, Ready et al. (1997) buscou compreender o comportamento genético de *N. whitmani* em diferentes regiões biogeográficas do Brasil. A idéia era determinar se diferenças genéticas entre as populações de *N. whitmani* eram as responsáveis pelas diferentes distribuições de infecção de leishmaniose pelo Brasil. Estes autores estudaram populações amazônicas (no estado do Pará), do Nordeste (nos estados do Piauí, Bahia e Pernambuco), Sudeste (nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo) e Sul (Paraná). Na ocasião, foram identificados 18 haplótipos, provenientes de um único grupo monofilético, formando dois grupos que se subdividem em três clados. Um clado é proveniente das populações do Nordeste (com exceção de Teresina), o segundo vem das

populações do Sul, Sudeste e Teresina, e, o último clado, é exclusivamente amazônico, esses autores sugerem que provavelmente uma população se subdividiu em duas: uma exclusivamente amazônica e outra que colonizou o resto do Brasil. Porém, estas diferenças genéticas entre as populações não explicam os padrões de transmissão da leishmaniose no Brasil.

Ishikawa et al. (1999) identificaram em populações de *N. whitmani*, no estado de Rondônia, um novo grupo de haplótipos, o qual pertence provavelmente à população ancestral do clado amazônico. Este achado não apóia a teoria de que a espécie *N. whitmani* seria na verdade composta de duas espécies alopátricas crípticas, uma na região amazônica e outra na região Nordeste do Brasil. Portanto, eles concluíram que provavelmente ocorre, ou, ocorreu, em um passado recente, um intenso fluxo gênico entre estas duas populações nas regiões sub amazônicas, como este autor supõe, que aconteça nesta do Estado do Maranhão, que é uma área de transição entre a amazônia, a caatinga e o cerrado.

O Maranhão se localiza em uma região de transição entre a Floresta Amazônica, o cerrado e o Nordeste semi-árido, existindo no estado uma composição heterogênea de biomas como, por exemplo, a floresta amazônica, o cerrado, restinga, cocal, manchas de caatinga e zona mistas dessas vegetações (Silva, 2016). Esta condição única coloca o estado do Maranhão como um possível local de fluxo gênico entre as populações de *N. whitmani* encontradas por Ready (1997) e Ishikawa (1999), além de ser um possível local de hibridização entre espécies de flebotomíneos.

Este trabalho exposto propõe-se estudar a caracterização de variabilidade genética e estrutura populacional por meio da região de *Cyt b* do DNAm de *Nyssomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae), em diferentes regiões fitogeográficas no estado do Maranhão que possuem registro de leishmaniose tegumentar americana (LTA).

METODOLOGIA

Área de estudo

Foram coletados espécimes de *N. whitmani* em oito municípios localizados em diferentes biomas do Estado do Maranhão, Brasil: restinga (Barreirinhas), cerrado (Caxias, Codó Colinas e Urbano Santos), Mata de Cocais (Presidente Dutra e São Domingos), floresta amazônica maranhense (Senador La Roque) (Figura 1). As áreas de ocorrência das populações foram mapeadas com a finalidade de serem determinadas as distâncias

geográficas em linha reta (km), suas latitudes e longitudes, obtidas com o auxílio de um aparelho de GPS (Global Position System).

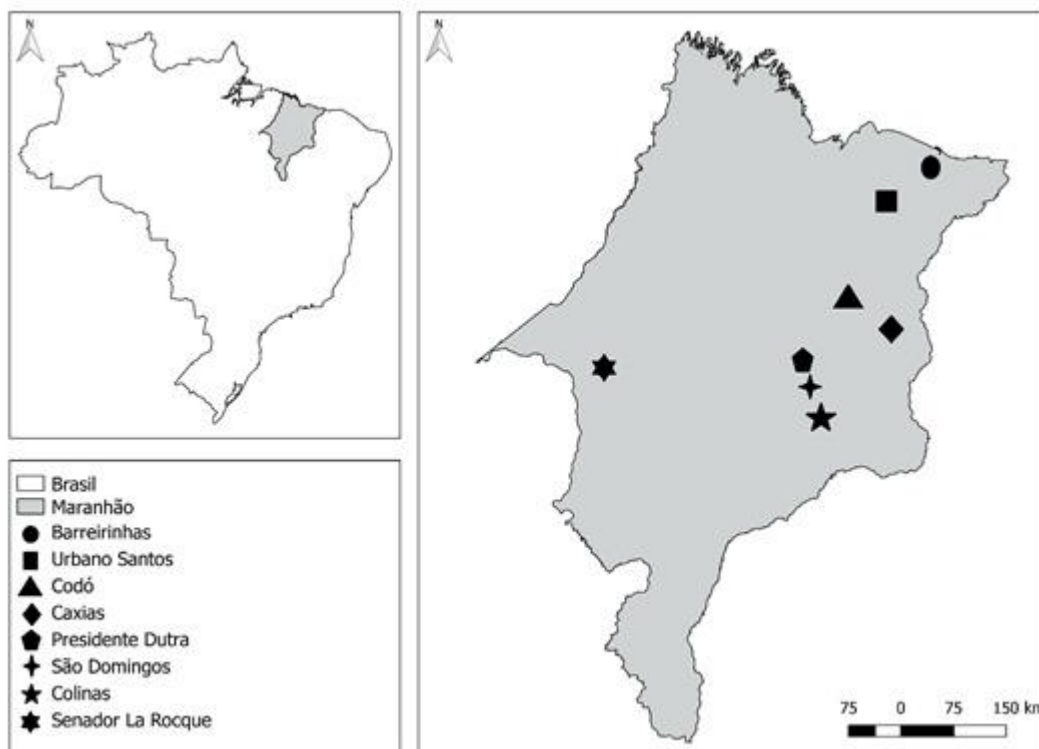
Os municípios selecionados foram aqueles que notificaram casos de leishmaniose tegumentar (Ministério da Saúde, 2017) e que contribuíram com o número mínimo de exemplares para o estudo e que os mesmos fossem representativos do ponto de vista fitogeográfico.

Amostragem

Em cada município foram selecionadas localidades com registros de caso de leishmaniose tegumentar, sugestivo da ocorrência de *N. whitmani*. Nessas localidades foram selecionadas cinco casas que continham abrigos de animais domésticos por possibilitar maior probabilidade de serem positivas para a presença de flebotomíneos. Em cada casa, instalou-se duas armadilhas luminosas tipo CDC, sendo uma no peridomicílio (abrigo de animais doméstico) e a outra no extradomicílio (capoeira adjacente). As armadilhas foram instaladas uma vez em cada localidade a 1,5m de altura, das 18:00 às 6:00 horas da manhã seguinte, entre os meses de abril/16 e junho/17.

Os insetos retidos nas armadilhas foram transportados para o Laboratório de Entomologia e Vetores (LEV), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e colocados em refrigerador à 4°C. Posteriormente, foram colocados em placa de Petri e submetidos à triagem sob estereomicroscópio para separar os flebotomíneos de outros insetos e também as fêmeas dos machos. Os flebotomíneos machos foram processados com hidróxido de potássio, ácido acético, água destilada e lactofenol, e, após esse procedimento, montados em líquido de Berlese entre a lâmina e lamínula. Todos os indivíduos machos foram identificados com auxílio de microscópio e da chave dicotômica proposta por Young e Duncan (1994). As fêmeas foram identificadas, principalmente, pelo exame das espermatecas.

Figura 2: Localizações dos pontos de coleta de *N. whitmani* no estado do Maranhão.



Análises do DNA mitocondrial

Após a triagem e a identificação dos flebotomíneos realizada no LEV, as amostras foram colocadas em álcool absoluto e levadas ao Laboratório de Genética e Biologia (LabGeM), do Departamento de Biologia na Universidade Federal do Maranhão, e mantidas em *freezer* -20°C até a extração do DNA total. Foi analisado a região de *Cyt b* do DNA mitocondrial (mtDNA) de 30 indivíduos de *N. whitmani* em cada população amostrada.

Técnica de extração de DNA total

O protocolo de Sambrook & Russell (2001) foi utilizado para realizar a extração de DNA total das amostras de flebotomíneos, com algumas modificações em relação aos volumes e concentrações das substâncias utilizadas. Este protocolo é baseado no método de extração utilizando fenol-clorofórmio.

Com o auxílio de um macerador, os espécimes foram macerados, individualmente, dentro de um tubo eppendorf até a exposição completa dos tecidos presentes no interior de

seu exoesqueleto. Posteriormente, foi acrescentado ao eppendorf 150 µl de tampão de lise (NaCl 5 M, EDTA 25 mM, SDS 0,5%, Tris-HCl 100 mM e H₂O pH 7) e 5µl de proteinase K o qual foi agitado no vortex a fim de homogeneizar a solução no eppendorf, e, incubado *overnight* em banho-maria a 55°C. Após concluir esta etapa, foi adicionado ao eppendorff 150µl de Fenol-Clorofórmio, o qual foi homogeneizado por 10 minutos, e, centrifugado, a 15000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Após esta etapa, o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf de 1,5 ml, e, adicionado, 360µl de etanol absoluto gelado, e, 16 µl de Acetato de sódio. Novamente a solução foi homogeneizada e centrifugada, a 15000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e, armazenada em *freezer -20°C overnight*, para a precipitação do DNA. Posteriormente, no dia seguinte, a solução foi centrifugada por 10 minutos, a 15000 rpm, a 4°C, descartou-se o sobrenadante. Em seguida foi adicionando 200µl de etanol 70%, resfriado a -20°C. O tubo foi invertido várias vezes para que o etanol lavasse o *pellet* e retirasse o máximo de impurezas. Após essa etapa, centrifugou-se os tubos por 10 minutos, a 15000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, para evitar a perda de DNA. O eppendorf foi colocado em uma estufa, a 37°C, a para secar bem o pellet e evaporar o resíduo de etanol. Depois de secar o *pellet* de DNA, este foi dissolvido em 35µl de TE (Tris-HCl, EDTA), colocado em banho-maria por uma hora a 55°C. O DNA extraído foi estocado em *freezer -20°C*.

Quantificação e Qualificação do DNA

Após a extração, a solução resultante foi qualificada e quantificada a fim de verificar a integridade e a existência de possíveis contaminantes. Para isso, um volume de 1 µl de DNA foi aplicado em gel de agarose a 1%, como propôs Sambrook et al. (1989). Em seguida, as amostras foram quantificadas no equipamento espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 por meio de análise de absorbância (260/280nm) para quantificar o DNA contido na amostra extraída. Uma alíquota de 2 µl de DNA foi inserido, no equipamento.

Amplificação parcial do gene mitocondrial do citocromo b

Foi amplificado um fragmento do gene do citocromo b utilizando-se os *primers* 11226F (5'-GAATGATATTTTTTATTTGTC-3') e 11587R (5'-CTTATGTTTTCAAGACATATGC-3') Ready *et al.*, 1997 .Cada reação de amplificação foi composta de

2,5 µl de *Buffer*, 15,05 µl de água ultrapura, 1,25 µl de MgCl₂ a 50mM, 3µl de DNA genômico total, 0,5 µl de dNTP's a 1,25 mM, 1,25 µl de cada *primer* a 10 µM e 0,2 U de *TaqDNA* polimerase, totalizando 25µl de volume de reação. Posteriormente, as reações em cadeia no termociclador foram programadas para realizar os seguintes ciclos: um ciclo inicial de desnaturação à 98°C, por 5 minutos; 10 ciclos de 95°C, por 1 minuto, 38°C por, 1 minuto e 72°C, por 2 minutos; seguido de 35 ciclos à 95°C, por 1 minuto, 42°C por, 1 minuto e 72°C, por 2 minutos e um período de extensão final de 72°C, por 3 minutos.

Cada conjunto de reação possuía um controle negativo, contendo todos os componentes da PCR, exceto DNA. Com isso é possível determinar se os produtos gerados pela reação representam o mtDNA, ou, contaminações. Para verificar o sucesso da reação, o produto amplificado foi aplicado em gel de agarose a 2%, num volume de 100 ml de gel, abrangendo uma superfície de 11 cm x 14 cm, e, uma espessura de 8 mm. A cada alíquota de 3µl de DNA, foi acrescentado 2 µl de LOAD e corante GelRed™. A eletroforese foi realizada a 90 V, entre 25 a 30 minutos. Os géis foram observados em transluminador de luz UV, e, posteriormente fotografados.

Para a produção das sequências de nucleotídeos, os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP- IT™, seguindo o seguinte protocolo: 1) foi misturado 5 µL de produto de reação pós-PCR com 2 µL de ExoSAP- IT™; 2) a mistura foi incubada a 37° C por 15 minutos em banho maria; 3) por último, utilizando um termociclador, a mistura foi incubada a 80° C, por 15 minutos, para inativar o reagente ExoSAP- IT™. A seguir, o produto purificado foi submetido a uma PCR de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (ThermoFisher), precipitado com Etanol-EDTA, ressuspendido em Formamida HIDI e injetado em sequenciador automático ABI 3500, localizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Campus de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão.

Análise dos dados

A visualização, alinhamento e edição das sequências foram feitos no programa BioEdit 7.0.4 (Hall,2005). O programa DnaSPv6 (Librado & Rozas et al., 2009) foi utilizado para: 1) determinar o número de haplótipos, sítios polimórficos e o número de substituições de pares de bases entre cada haplótipo; 2) para estimar a diversidade haplotípica e nucleotídica, a fim de medir a variedade populacional; 3) para determinar o número de sítios polimórficos e de mutações presentes nas amostras analisadas; 4) para

realizar os Testes de Neutralidade Tajima D (Tajima, 1989) e Fu & Li (Fu, 1997) a fim de determinar se as mutações existentes estão de acordo com a teoria neutra da evolução molecular.

O programa MEGA X (Kumar et al., 2018) foi usado para: 1) determinar a proporção de A+T em relação a C+G; 2) para calcular o número de substituições nucleotídicas, determinando, assim, a distância genética entre grupos e 3) para estimar o grau de diferenciação populacional, visualizando a subdivisão da população. Neste programa também foi testado o modelo de evolução que melhor descreve a transformação de uma sequência em outra. Como grupo externo foi usada uma sequência de *Psychodopygus panamensis* (GenBank cód. KM054609). Além disso, foram usadas sequências de outras espécies do gênero *Nyssomyia*, como *Nyssomyia umbratilis* (GenBank cód. KM054621), *Nyssomyia yulipatoji* (GenBank cód. KM054624), *Nyssomyia antunesi* (GenBank cód. KM054616), *Nyssomyia intermedia* (GenBank cód. KM054617) e uma sequência proveniente de Ilhéus (GenBank cód. U80966.1).

As relações genealógicas entre os haplótipos foram ilustradas pelo *software* Network Publisher v.2.0.0.1 (Fluxus Technology Ltd, England).

RESULTADOS

Foram obtidos um total de 48 sequências nucleotídicas do citocromo b de *N. whitmani*, obtidos de oito localidades do Maranhão, que representam diversas regiões fitogeográficas do estado: Barreirinhas (Br, dois indivíduos), Restinga; Senador La Roque (Slr, três indivíduos), Amazônia; Caxias (Cx, 10 indivíduos), Codó (Co, dois indivíduos), Colinas (Cl, 10 indivíduos) e Urbano Santos (US, sete indivíduos), Cerrado; Presidente Dutra (Pd, dois indivíduos) e São Domingos (Sd, 12 indivíduos), Mata dos Cocais; e uma sequência de Ilhéus representando a Mata Atlântica.

O alinhamento das sequências gerou um fragmento de 164 pares de base, com 21 sítios polimórficos e com 141 sítios monomórficos; 12 destes sítios polimórficos são singletons e nove são sítios de mutações parcimoniosas realmente informativas; 76,7 % deste conteúdo é A+T e 23,3 % de conteúdo G+C. Os testes de neutralidade geral foram significativos sob a avaliação de Tajima ($D = 1,940$, $p < 0,05$) e testes de Fu e Li ($D = -2,547$; $F = -2,772$, $p < 0,05$), o valor positivo do teste estatístico de Tajima é significativo para uma população com estabilidade populacional; e os valores negativos do teste de Fu e Li indicam um valor negativo, com um excesso de singletons, mutações que aparecem

apenas uma vez entre as sequências analisadas, além de indicar que a população está, ou, esteve, em uma expansão recente. Um total de 15 haplótipos foram identificados, variando de um a nove haplótipos por bioma. Os valores de diversidade haplotípica variaram de 0,545 a 0,950 com média de 0,551; e os valores de diversidade nucleotídica variaram de 0,006 a 0,009, com média de 0,006 (Tabela 1).

Comparando-se as divergências genéticas e agrupando as amostras por biomas, observa-se que os biomas apresentaram em sua totalidade uma divergência intrapopulacional de 1% (Tabela 2).

Os grupos da Mata Atlântica e a Amazônia Maranhense apresentaram os maiores valores de divergência genética (3,5%). Entre os biomas maranhenses, a menor divergência deu-se entre Restinga e Amazônia (0,7%) e, a maior, entre Mata de Cocais e Amazônia (0,9%) (Tabela 2). A divergência média entre os grupos das regiões fitogeográficas do Maranhão foi de 0,8%.

Tabela 1: Parâmetros de diversidade genética para de uma região do gene do citocromo b do DNAm de *Nyssomyia whitmani* de diversos biomas do Maranhão e Mata Atlântica.

BIOMAS	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular		Testes de Neutralidade			
				HD	π	Tajima's D	D*	F*	p
Amazônia	03	02	02	0.667	0.008	-	-	-	-
Cerrado	28	09	11	0.545	0.008	-	-	-	-
Cocais	14	05	07	0.593	0.009	-	-	-	-
Restinga	02	02	01	0.950	0.006	-	-	-	-
Mata Atlântica	01	01	00	-	-	-	-	-	-
Total	49	15	21	0.575	0.011	1.940	-2.547	-2.772	< 0.05

N = número amostral; NH = número de haplótipos, S = sítios polimórficos; HD = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, Tajima's D test, D*: Fu and Li's D* test, F*: Fu and Li's F* test, p = valor de significância. Nível de significância (p < 0,05).

Tabela 2: *Divergência genética (distância p) estimada usando uma região do gene do citocromo b do DNAm de N. whitmani de diversos biomas do Maranhão e Mata Atlântica.*

Biomas	Divergência genética (distância p)				
	1	2	3	4	5
1.Restinga	0,01				
2.Cerrado	0,00773	0,01			
3.Cocal	0,00839	0,00906	0,01		
4.Amazônia	0,00721	0,00879	0,00945	0,01	
5.Mata Atlântica	0,03453	0,03244	0,03412	0,03565	-

Valores abaixo da diagonal representam as distâncias genéticas entre os biomas e valores em negrito representam as distâncias dentro dos biomas.

Quando comparamos as distâncias genéticas entre os municípios onde os espécimes foram coletados, estimamos uma distância genética média 0,5%, variando de 0,08% entre as populações de Codó (Cerrado) e Urbano Santos (Cerrado) a 3,5% entre as populações de Ilhéus (Mata Atlântica) e Senador La Roque (Amazônia) (Tabela 3). Considerando apenas localidades maranhenses, o maior valor de divergência foi entre Senador La Roque (Amazônia) x Presidente Dutra (Mata de Cocais) (2,2%); e o menor valor de divergência foi entre Caxias (Cerrado) x Codó (Cerrado) (0,06%).

Tabela 3: Divergência genética (distância p) estimada usando uma região do gene do citocromo b do DNAm de *N. whitmani* de biomas do Maranhão separados por localidade e Mata Atlântica.

LOCALIDADES	DIVERGÊNCIA GENÉTICA (DISTÂNCIA P)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Barreirinhas (Re)	0,01								
2. Colinas (Ce)	0,014892	0,02							
3. Codó (Ce)	0,003068	0,011762	0						
4. Caxias (Ce)	0,003753	0,012458	0,000682	0					
5. Presidente Dutra (Co)	0,021704	0,018607	0,018559	0,019257	0,01				
6. São Domingos (Co)	0,006177	0,014129	0,003087	0,003773	0,021209	0,01			
7. Senador la Roque (Am)	0,007209	0,015961	0,004115	0,004803	0,022779	0,007232	0,01		
8. Urbano Santos (Ce)	0,003949	0,012656	0,000876	0,001559	0,019457	0,003672	0,004999	0	
9. Ilhéus (Ma)	0,034535	0,034513	0,031288	0,030576	0,031288	0,034589	0,035646	0,032216	-

Valores abaixo da diagonal representam as distâncias genéticas entre as localidades e valores em negrito representam as distâncias dentro de cada localidade. (re) restinga; (co) mata de cocais; (ce) cerrado; (am) floresta amazônica; (ma) mata atlântica.

Quando analisamos a distância genética entre as populações de *N. whitmani* coletadas no Maranhão com outras espécies do gênero e o grupo externo (*Psychodopygus panamensis*), notamos que a espécie que tem mais proximidade com *N. whitmani* é *N. umbratilis* (4,7%), enquanto com *N. yullipatoji* e *N. antunesia* distância interespecífica é de 6,0 %. (Tabela 4).

Tabela 4: Divergências genéticas (distância p) entre *N. whitmani* e outras espécies do gênero estimadas usando região do gene do citocromo b do DNAm.

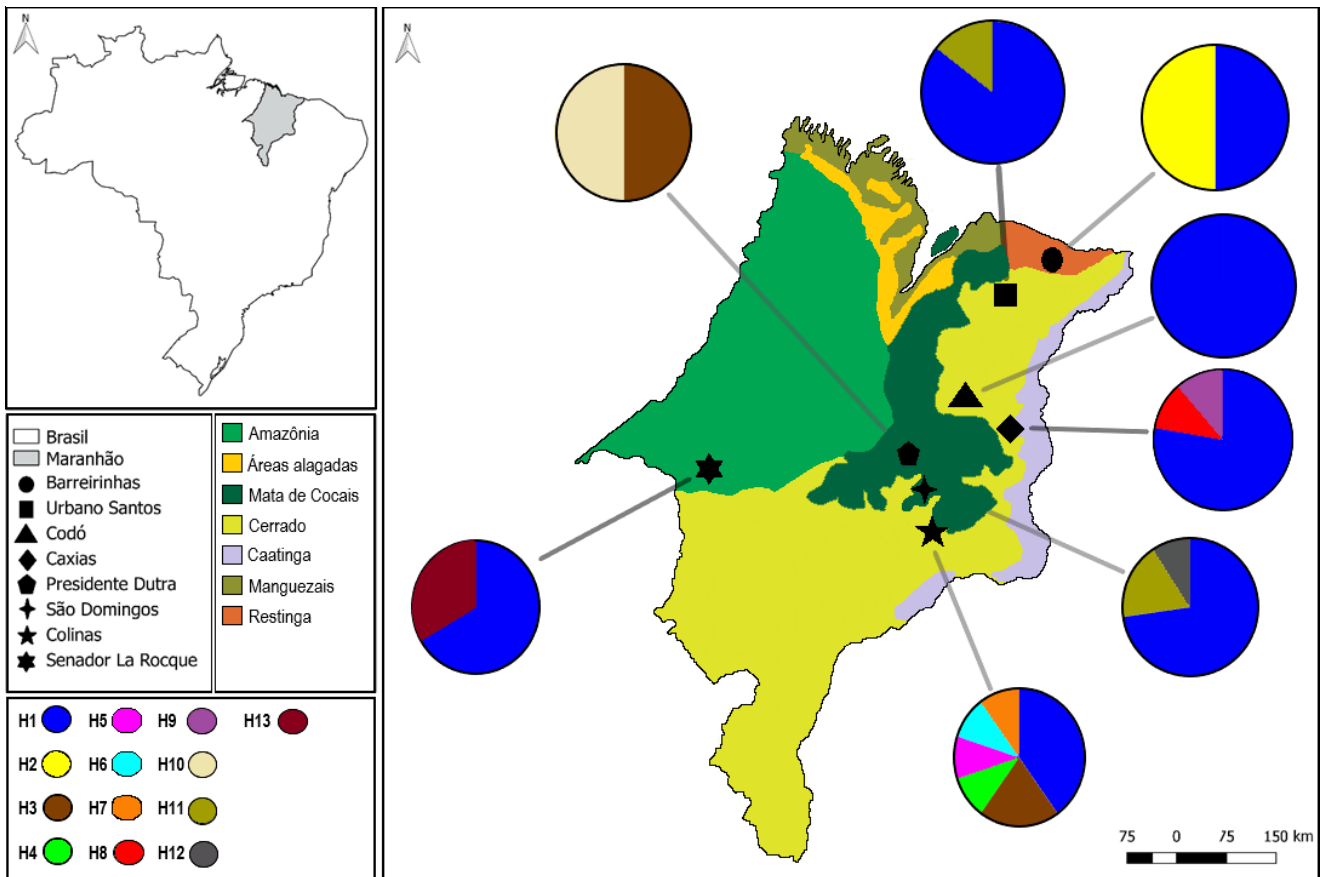
Espécies	Distância genética (distância p)				
	1	3	4	5	6
1. <i>N. whitmani</i>	0,001				
2. <i>N. umbratilis</i>	0,04771	0			
3. <i>N. yullipajoti</i>	0,06038	0,03177	-		
4. <i>N. antunesia</i>	0,06038	0,03177	0,00625	-	
5. <i>P. panamensis</i>	0,15253	0,16619	0,15093	0,15093	-

Valores abaixo da diagonal representam as distâncias genéticas interespecíficas e valores em negrito representam as intraespecíficas. Grupo externo: *Psychodopygus panamensis*.

Dos 15 haplótipos identificados, a maioria se encontra no município de Colinas (cerrado), totalizando seis haplótipos; seguindo de Caxias (cerrado), com três haplótipos; também com três haplótipos a municipalidade de São Domingos (mata de cocais); Barreirinhas (restinga), Urbano Santos (cerrado), Senador La Roque (amazônia) e Presidente Dutra (mata de cocais) possuem a representividade de dois haplótipos cada; e Codó (cerrado) contém um haplótipo; um haplótipo provém de uma sequência de Ilhéus representando a Mata Atlântica. Assim podemos inferir que a maioria dos haplótipos identificados no estado do Maranhão localizam-se em área de Cerrado (com 9 haplótipos), em seguida a fitoregião da mata de cocais (com 5 haplótipos) e a pré-amazônia maranhense e restinga em último (com 2 haplótipos) (Figura 2).

O haplótipo mais frequente é o H1, sendo este localizado em praticamente todos os municípios estudados (com exceção de Presidente Dutra) e em todas as fitoregiões. Os haplótipos com a segunda maior frequência são os haplótipos H3 (encontrado em Colinas e Presidente Dutra) e H11 (encontrado em São Domingos e Urbano Santos), sendo estes haplótipos encontrados em áreas de cerrado e Mata de cocais. O restante dos haplótipos está presente em um único município. Ao gerar a rede de haplótipos desta população amostrada podemos perceber que todos os haplótipos se conectam e não formam clados distintos, porém, o H9 se destaca da rede de haplótipos com sete mutações sendo o mais divergente das populações amostradas do Maranhão; assim quando comparado com o grupo externo (*P. panamensis*) com 20 mutações. O H1 enraíza cinco haplótipos diretamente (H8, H11, H2, H13 e H14) e está indiretamente ligado ao restante da rede por quatro haplótipos ausentes, ou, teóricos. O H10 está diretamente ligado ao H3, o tornando um haplótipo derivativo direto deste. O H15 mesmo sendo de outra espécie (*Ny. intermedia*) não se distancia dos outros haplótipos, fazendo parte o mesmo núcleo de todas as populações amostradas. O H14, mesmo sendo proveniente de uma região mais distante mostra-se intimamente relacionado com as populações das fitoregiões maranhenses (Figura 3).

Figura 2: Distribuição de haplótipos e suas frequências nos ecossistemas amostrados neste estudo, localizados no estado do Maranhão.



As relações filogenéticas entre estas populações demonstram que, o H9 representado por um espécime de Caxias (cerrado), está dentro do clado formadas por outras espécies do gênero *Nyssomyia* (Cl-1), já o H15, representado por uma sequência de *N. intermedia* está no clado dos espécimes de *N. whitmani* (Cl-2). Os espécimes de *N. whitmani* no maranhão formam um clado monofiléticos (Cl-2), no entanto o haplótipo H11 proveniente da Mata de Cocais e do Cerrado maranhense forma um subclado (SbC-1) com o haplótipo H14 que é originário da região de Mata Atlântica da Bahia, sugerindo uma conexão entre as populações maranhenses e do resto do Nordeste (Figura 4).

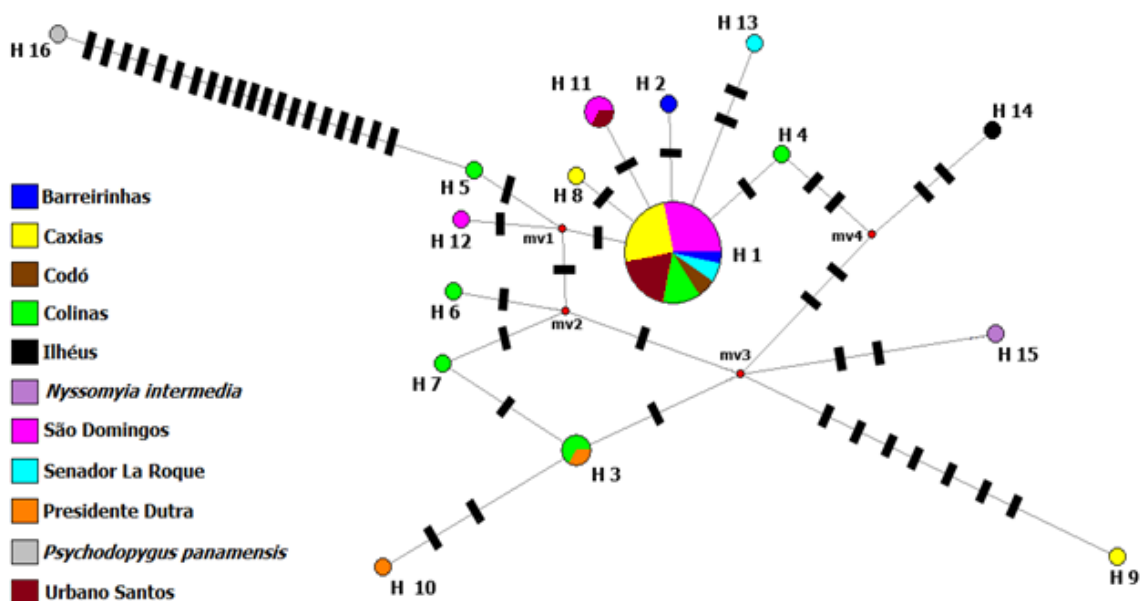
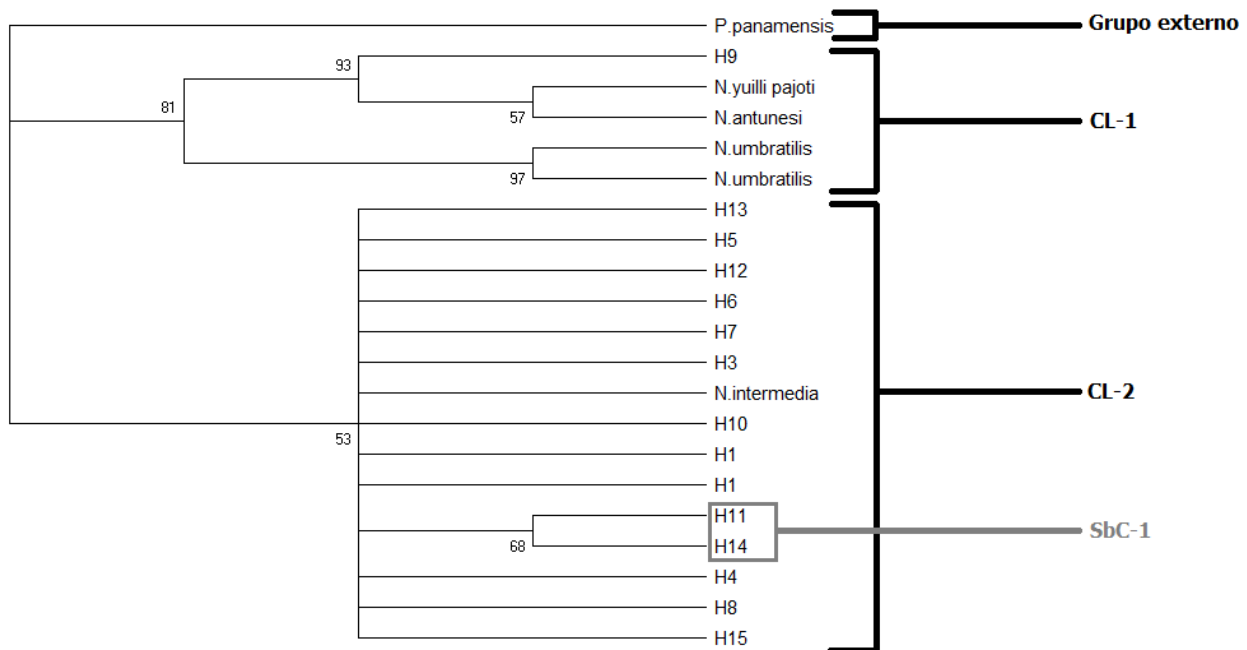


Figura 3: Rede de haplótipos baseada região do gene do citocromo b do DNAm de 164 pb para *Nyssomyia whitmani*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. A linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional, os retângulos pretos representam uma mutação ocorrida e os haplótipos ausentes são indicados como círculos menores (em vermelho).

Figura 4: Cladograma de Máxima Verossimilhança inferida a partir de 164 nucleotídeos do citocromo b de *N. whitmani*. Uma amostra de *P. panamensis* foi utilizada como grupo externo. Os valores de bootstrap são dados acima dos nós (1000 réplica)



DISCUSSÃO

As amostras de *N. whitmani* de biomas do Maranhão apresentaram-se geneticamente homogêneas entre si, embora exista entre as populações da pré-amazonia maranhense e o cerrado uma indicação de diferenciação genética. Ready et al. (1997) demonstrou que *N. whitmani* se divide em três clados no Brasil: um clado é proveniente das populações do Nordeste; o segundo vem das populações do Sul-Sudeste; e o último clado é exclusivamente amazônico. Os dados deste trabalho sugerem, que, provavelmente uma população se subdividiu em duas linhagens: uma exclusivamente amazônica, e, a outra que colonizou o resto do Brasil, subdividindo-se no Nordeste e na Zona de Mata Atlântica do Sul-Sudeste.

Embora as populações dos biomas maranhenses tenham se mostrado homogêneas entre si, elas foram bastante divergentes em relação à amostra

proveniente da Mata Atlântica, indicando que os indivíduos de *N. whitmani* do Maranhão e do litoral sul da Bahia apresentam baixo fluxo gênico. Isso se deve, provavelmente, à grande distância geográfica (isolamento por distância) e o isolamento das populações do bioma Mata Atlântica em relação aos biomas maranhenses.

A Mata dos Cocais é uma configuração vegetal derivada do cerrado e amazônia formada pela ação antrópica (Sampaio, 1933; Santos-Filho, 2013). Neste bioma, as populações estudadas de *N. whitmani* apresentam as maiores distâncias genéticas quando comparadas às outras fitoregiões do Maranhão, o que pode ser consequência da recente formação desta fitoregião e constante degradação e antropização deste ecossistema, como explicado por Viveiros, (1943), fazendo com que a população de *N. whitmani* desta região se torne uma população mais doméstica do que as outras encontradas em ambientes mais preservados, ainda assim existe um fluxo gênico recente e, provavelmente, ainda ativo não só com o cerrado, mas também, com os outros biomas maranhenses.

Observou-se neste trabalho, também, que o maior número de haplótipos são provenientes do cerrado. O cerrado maranhense é uma zona de transição entre a amazônia e outros biomas brasileiros, de modo que esta região pode ser um repositório de diversidade genética e uma área de intenso fluxo gênico entre as populações de *N. whitmani* (Ready, 1998). Isso fica evidente ao fato de que os haplótipos do cerrado maranhense deram origem a haplótipos presentes em outros biomas do Estado.

As populações de *N. whitmani* apresentam um grande número de indivíduos e ampla distribuição geográfica no continente americano (Aguiar & Medeiros; 2003; Shaw, 2002). Esta espécie não apresenta restrições geográficas em sua distribuição espacial no Brasil, seja por condições climáticas, limitações ecológicas ou por barreiras físicas (Costa *et al.*, 2007). Estas condições propiciam que a divergência genética entre as populações maranhenses de *N. whitmani* não sejam suficientemente significativas para o reconhecimento de espécies crípticas, como proposto por Ready *et al.* (1997), pois, as populações desta espécie podem realizar fluxo gênico, fazendo com que não haja diferenciação entre eles a ponto de sugerir que seja dividida em duas espécies.

Neste trabalho um total de 15 haplótipos de 164 pb do gene *Cyt b* foram detectados em uma análise de 50 sequências proveniente de espécimes de *N.*

whitmani de diferentes biomas do Maranhão. Apesar de um fragmento de DNA pequeno, conseguiu-se identificar um número considerável de haplótipos, quando comparado com o trabalho de Ishikawa *et al.* (1999) que utilizaram 294 pb do gene *Cyt b* e identificaram 31 haplótipos no Brasil, sendo amostrados populações numa enorme amplitude geográfica, sendo incluído populações da Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado nordestino. Outros estudos identificaram números semelhantes de haplótipos utilizando o gene *Cyt b*, como: Hodgkinson *et al.* (2003) que analisaram 261 pb do gene *Cyt b* de *L. longipalpis*, e identificaram 30 haplótipos na região Nordeste e Sudeste em áreas de Mata Atlântica. Pech-May *et al.* (2013) identificaram 26 haplótipos para um fragmento de 365 pb do gene *Cyt b* em 62 sequências estudadas nos Chiapas mexicanos, com dois haplótipos compartilhados por toda a sua população amostrada de *L. cruciata*. Scarpassa *et al.* (2015) identificaram 27 haplótipos de um fragmento de 318 pb do gene *Cyt b* em 67 sequências amostradas na região amazônica, onde um haplótipo era compartilhado pela maioria da população amostrada de *L. anduzei* com exceção de uma localidade. Flanley *et al.* (2018), ao analisarem um fragmento de 461 pb do gene *Cyt b* em populações de *Phlebotomus papatasi* do Oriente Médio, identificaram 13 haplótipos em 116 sequências amostradas, sendo um haplótipo compartilhado por todas as populações. Estes números corroboram com os achados neste presente trabalho, indicando que o gene *Cyt b* é um bom marcador molecular para estudar características da estrutura genética e populacional de flebotomíneos, pois consegue distinguir divergências em populações de flebotomíneos ao redor do mundo.

Os flebotomíneos tendem a ser bastante diversos geneticamente, mesmo intrapopulacionalmente, possuindo altas taxas de polimorfismos que podem estar associadas à sua rápida capacidade de adaptabilidade a diferentes habitats, condições ecológicas e condições climáticas (Gasparotto *et al.*, 2017). A rede de haplótipos demonstrou que existe uma sequência de ancestralidade entre alguns haplótipos. O haplótipo H1 possui relações evolutivas com a maioria dos haplótipos, com cinco haplótipos derivando diretamente dele. A diversidade haplotípica encontrada neste estudo (0,575) é considerada moderada (Tabela 1), quando comparada aos valores obtidos por Pech-May *et al.* (2013) (0,866) para

L. cruciata, Hodgkinson *et al.*, (2003) (0,942) para *L. longipalpis*, e Scarpassa *et al.* (2015) (0,887) para *L. anduzei*.

O teste de neutralidade de Tajima D não foi significativo ($p < 0,05$), indicando que o polimorfismo genético encontrado está de acordo com o modelo de neutralidade. A diversidade genética varia entre as populações amostradas, o que pode indicar um intenso fluxo gênico entre essas populações ações devidas as ações antrópicas constantes que aconteceram nos ambientes amostrados, principalmente, durante a segunda metade do século XX, e também após 1998, quando surgiram programas para controlar insetos vetores de leishmaniose.

Os resultados obtidos neste estudo parecem apontar que o maior limitador de fluxo gênico entre as populações de *N. whitmani* é a distância geográfica. Apesar disso, os flebotomíneos possuem uma capacidade de vôo contínuo limitado, oscilando entre 6 a 10 metros, com uma capacidade de dispersão diária de aproximadamente 100 metros. Estes animais não costumam sair a mais de 1000 metros do local de seu desenvolvimento, que costuma ser o seu local de reprodução (Pech-may *et al.*, 2013).

Um dos achados deste trabalho foi o haplótipo H9 (Caxias), que apesar de ser de um indivíduo identificado morfologicamente como *N. whitmani*, apresenta um alto grau de diferenciação do resto das amostras da espécie, contendo sete mutações que o diferenciam dos outros haplótipos. Este espécime quando plotado no cladograma de Máxima Verossimilhança ficou localizado no clado CL-1, sendo mais semelhante às outras espécies do gênero *Nyssomyia*, como: *N. umbratilis*, *N. antunesi* e *N. yulli patoji*. Outro resultado inesperado foi que a sequência de *N. intermedia*, oriunda da Amazônia, ficou dentro do clado CL-2, onde estão os haplótipos de *N. whitmani*. Estes dois achados podem representar casos de hibridização entre estas espécies. Apesar de fenotipicamente estes espécimes pertencerem a uma determinada espécie, em termos de seu DNA mitocondrial eles são mais parecidos a outra espécie, supostamente, por ter havido troca de material genético entre elas. Outra possibilidade para a semelhança genética entre estas duas espécies, reside na probabilidade de elas terem sofrido efeito da deriva genética durante o seu processo evolutivo.

Embora espécies de flebotomíneos ocorram em simpatria praticamente em todos os habitats, a hibridação nunca foi demonstrada na natureza. No

entanto, o fluxo gênico, a deriva genética e a hibridação, são eventos que poderíamos interpretar como explicações do surgimento de variabilidade genética suficiente, para a adaptação em novos habitats. Os alelos da progênie poderiam incluir algumas características que surgiram através de recombinação genética. Zonas de hibridização provavelmente existem entre algumas espécies, especialmente aquelas que são muito semelhantes morfológicamente e têm amplas distribuições geográficas, como o caso das espécies do gênero *Nyssomyia* (Andrade-Filho *et al.*, 2003).

As populações amostradas no Maranhão possuem uma baixa divergência genética entre elas, mostrando homogeneidade. Ainda assim, ao serem comparadas com uma amostra da Mata Atlântica do Nordeste nota-se uma divergência genica maior, porém não o suficiente para caracterizar espécies crípticas. Podemos então sugerir com os achados do presente trabalho que o estado do Maranhão se localiza em uma região de intenso fluxo gênico entre as populações de *N. whitmani* da Região Amazônia e do Nordeste semiárido brasileiro, tornando esta região um *hotspot* para origem de diversidade. Esta zona de encontros de populações de flebotomíneos pode também ser um berço de variabilidade genética entre *N. intermédia* e *N. whitmani*, já que uma de nossas amostras de *N. whitmani* apresentou semelhança genética muito próxima com uma amostra de *N. intermedia* da Região Amazônica.

REFERÊNCIAS

- Andrade Filho, J. D. 2003.** Relationships of New World phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) based on fossil evidence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . 98: 149-154.
- Aguiar, G. M. and W. M. Medeiros .2003.** Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In EF Rangel, R Lainson (eds), Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255.
- Da Costa, S. M., M. Cechinel, V. Bandeira, J. C. Zannucto, R. Lainsson and E. F. Rangel. 2007.** *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil- mini- review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 102(2): 149-153.
- Flanley, C. M., M. Ramalho-Ortigao, I. V. Coutinho-Abreu, R. Mukbel, H. A. Hanafi and S. S. El-Hossary. 2018.** Population genetics analysis of *Phlebotomus papatasi* sand flies from Egypt and Jordan based on mitochondrial cytochrome b haplotypes. *Parasites & Vectors*. 11(1):214.
- Fonteles, S. F., A. A. Pereira-Filho, J. L. P. Moraes, S. R. F. Pereira, B. L. Rodrigues and J. M. M. Rebêlo. 2017.** Detection of *Leishmania* DNA and blood meal identification in sand flies (Diptera: Psychodidae) from Lençóis Maranhenses National Park region, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. XX(X): 1-7.
- Fu, Y.X. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915-925.
- Galati, E. A. B. 2003.** Classificação de Phlebotominae, pp. 23–51. In E. R. Rangel and R. Lainson (eds.), Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. 367 pp.
- Gasparotto, J. C., M. C. V. Costa-Ribeiro, V. Thomaz-Socco, S. M. R. S. Liebel, H. C. Neitzke-Abreu, K. R. Reinhold-Castro, E. C. Cristovão and U. Teodoro. 2017.** Genetic variability of populations of *Nyssomyia neivai* in the northern state of Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 59: 10.
- Guimarães-e-Silva, A. S., S. de Oliveira Silva, R. C. Ribeiro da Silva, V. C. S. Pinheiro, J. M. M. Rebêlo, and M. N. Melo. 2017.** Leishmania infection and blood

food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. *PLoS ONE*. 12:e0179052.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.

Hodgkinson, V. H., J. Birungi, M. Quintana, R. Deitze and L. E. Munstermann. 2003. Mitochondrial Cytochrome B Variation in Populations of the Visceral Leishmaniasis Vector *Lutzomyia longipalpis* Across Eastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69(4): 386-369.

Ishikawa, E.A.Y., P. D. Ready, A. A. De Souza, J. C. Day, E. F. Rangel, C. R. Davies and J. J. Shaw. 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between population of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the Rain-forest Regions of Amazonia and Northeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(3): 339-345.

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 35: 1547-1549.

Lainson R. and J. J. Shaw. 2005. Leishmaniasis in the New World. pp. 313–49. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley and Wilson’s Microbiology and Microbial Infections (10th edn.): Parasitology, Vol. 5. London: Edward Arnold.

Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

Martins A.V., P. Williams, A. L. Falcão. 1978. American Sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), *Acad. Bras. Ciências*, Rio de Janeiro. 195 pp.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [Internet]. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. Brasília: MS/SVS [Cited 2011 March 23]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf

Pech-may, A., C. F. Marina, E. Vázquez-Domínguez, M. Berzunza-Cruz, E. A. Rebollar- Télles, J. A. Narváez-Zapata, D. Moo-Lianes, S. Ibáñez-Bernal, J. M. Ramsey and I. Becker. 2013. Genetic structure and divergence in populations of *Lutzomyia cruciata*, a phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) vector of *Leishmania mexicana* in southeastern Mexico. *Infect. Genet. Evol.* 16: 254–262.

- Pereira-Filho, A. A. A, R. S. Fonteles, M. C. A. Bandeira, J. L. P. Moraes, J. M. M. Rebêlo and M. N. Melo. 2018.** Molecular identification of *Leishmania* spp. In sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Lençóis Maranhenses National Park, Brasil. *Journal of Medical Entomology*. XX(X): 1-6.
- Peterson, A. T. and J. Shaw. 2003.** *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology*. 33: 919-931
- Pinto, I. S., B. D. d. Chagas, A. A. F. Rodrigues, A. L. Ferreira, H. R. Rezende, R. V. Bruno, et al. 2015.** DNA barcoding of neotropical sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): species identification and discovery within Brazil. *PLoS ONE* 10: e0140636.
- Rangel, E. F., R. Lainson, A. A. Souza, P. Ready, and A. C. R. Azevedo. 1996.** Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 91: 43–50
- Rangel, E.F. and R. Lainson. 2003.** Flebotomínios do Brasil. v.1. Rio de Janeiro: *Editora FioCruz*. 360p.
- Ready, P.D., J. C. Day, A. A. De Souza, J. C. Day, E. F. Rangel and C. R. Davies. 1997.** Mitochondrial DNA Characterization of Populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) Incriminated in the Peri-domestic and Silvatic Transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*. 87: 187-195.
- Ready, P. D., A. A. de Souza, J. M. M. Rebelo, J. C. Dayl, F. T. Silveira, D. Campbell-Lendrum, C. R. Davies and J. M. L. Costa. 1998.** Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the south- east boundary of Amazonian Brazil. *Transacions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 92: 159-160.
- Rebêlo, J. M. M., J. L. P. Moraes, G. A. Alves, F. S. Leonardo, R. V. da Rocha, W. A. Mendes, E. Costa, L. E. M. B. Câmara, M. J. A. Silva, Y. N. O. Pereira, J. A. C. Mendonça. 2007.** Distribuição das espécies do gênero *Anopheles* (Diptera, Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 23(12):2959-2971.
- Rebêlo, J. M. M., R. V. Rocha, J. L. P. Moraes, C. R. M. Silva, F. S. Leonardo, G. A. Alves. 2010.** The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in diferente phytogeographic regions of the state of Maranhão. *Rev. Bras. Entomol*. 54:494-500.

- Rodrigues, B. L., L. F. Carvalho-Costa, I. S. Pinto and J. M. M. Rebêlo. 2018.** DNA barcoding reveals hidden diversity of sand flies (Diptera: Psychodidae) at fine and broad spatial scales in Brazilian endemic regions for leishmaniasis. *Journal of Medical Entomology*. XX(X): 1-9.
- Scarpassa, V. M., A. S. Figueiredo and R. B. Alencar. 2015.** Genetic diversity and population structure in the *Leishmania guyanensis* vector *Lutzomyia anduzei* (Diptera, Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Infection, Genetics and Evolution*. 31: 312–320.
- Scarpassa, V. M., and R. B. Alencar. 2013.** Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Parasit. Vectors* 6: 258.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001.** A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: a laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sampaio, A. J. 1933.** A zona dos cocais e a sua individualização na phytogeographia. *Anais.Acad. Bras. Ciências*. 5(2): 61-65
- Santos-Filho, F. S., E. B. Almeida, C. J. R. S. Soares. 2013.** Cocais: zona ecotonal natural ou artificial?. *Revista Equador*. 1(1):02 -13
- Shaw, J. J. 2002.** New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrel J, editor. *Leishmania*. New York: Springer; pp. 11–31.
- Shimabukuro, P. H. F., A. J. Andrade, and E. A. B. Galati. 2017.** Checklist of American sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys* 660: 67–106.
- Silva, F. B., J. R. N. Santos, F. E. C. S. Feitosa, I. D. C. Silva, M. L. S. de Araújo, C. E. Guterres, J. S. dos Santos, C. V. Ribeiro, D. S. Bezerra and R. L. Neres. 2016.** Evidências de mudanças climáticas na região de transição amazônia-cerrado no estado do Maranhão. *Revista Brasileira de Meteorologia*. 31(3): 330-336,
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. (123): 585-595.

- Tamura, K. 1992.** Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9(4): 678–687.
- Viveiros, F.F. 1943.** O babaçu nos estados do Maranhão e Piauí. *Bol. Minist. Agric.* 32: 1-43.
- Young, D. G., and N. A. Duncan. 1994.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflyies in Mexico, the West Indies, Central and South America (*Diptera: Psychodidae*). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 54: 1–881.

ANEXO I: Regras e normas de formatação de artigos para a publicação na revista: *Journal of Medical Entomology*.

Manuscript Preparation

[New Submissions](#)

[Publication Ethics](#)

[Experimental Ethics](#)

[Article Types](#)

[Title Page](#)

[Body](#)

[References](#)

[Tables](#)

[Figures](#)

[Supplementary Material](#)

[Species Authority, Order, Family, and Common Names](#)

[Statistics](#)

[Model Analysis, Guidelines, Equations, and Computer Code](#)

[Taxonomic Papers](#)

[Gene Sequencing](#)

[Datasets Deposited in Third-Party Repositories](#)

[Language Editing](#)

[Immutable Advance Access](#)

[Revised Papers](#)

[Submissions of Cover Photographs](#)

New Submissions

Formatting

For new submissions, our formatting requirements are simple—just make sure your paper has the following items:

- ✓ Continuous line numbers
- ✓ Double-spaced lines
- ✓ A title page and abstract in the main document
- ✓ A main document in a doc, docx, tex (converted to PDF for review) or rtf file type
- ✓ Tables in a Word document (we cannot accept Excel files, unless they are supplementary files)
- ✓ Figure and table legends in the main document
- ✓ All coauthors entered into the online review system (email addresses required)

Please note there are more formatting guidelines for revised versions, as those are closer to being accepted (see the Revised Versions section of these author instructions).

- ✓ References listed in alphabetical order, cited by author and year in the text (not numbered)
- ✓ Figures and tables at the end of the main document after the references, or uploaded as separate files. Figure legends should be included at the end of the main text after the references, and table legends should be next to their corresponding tables
- ✓ Text is single-column

Article types and lengths

- Research article: No limit (under 7500 words recommended)
- Review: No limit
- Forum: No limit
- Short Communication: 2,000 words or less (not including abstract, references, or figure and table legends)
- Letter to the Editor: 2,000 words or less

For explanations of the different article types, please see the Article Types section of these author instructions.

Language

- English. A second abstract in a second language is permitted. Authors are responsible for the accuracy of non-English abstracts.
- Manuscripts with poor English that would not be understandable for reviewers will be withdrawn before review. Those authors are encouraged to pursue English-language assistance from a native speaker or editing service before resubmitting their paper. Having a paper in good English makes it easier for editors and reviewers to focus on the scientific merits of the paper. For more information on language editing, please see the Language Editing section of these author instructions.

Acceptable file types

- Main document: doc, docx, rtf

- Tables: Editable tables at the end of the main document. xls and xlsx files are not accepted (except as supplementary files)
- Figures: tif (preferred), eps (preferred), rtf, doc/docx, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png
- Supplementary files: Most file types accessible to users. Extremely large files should be uploaded in a third-party repository.

Page charges

In order to publish in JME, authors are required to pay page charges or an Open Access fee. ESA members are exempt from page charges and receive a discount on the Open Access fee. For more information, including pricing, please visit the [Charges and Licensing](#) page.

Plagiarism and text recycling

All submitted papers are evaluated for excessive direct copying through CrossRef's Ithenticate service. Papers should be written in the authors' own words. Direct copying of sentences or paragraphs, even if the original source is cited or if it is your own previous work, is unacceptable (although some overlap is expected in materials and methods). For more information, please see the Publication Ethics section of these author instructions.

Theses, dissertations, and pre-prints

If your paper (or a previous version of it) was posted on a pre-print server or is part of a thesis or dissertation that has been published online or in an institutional repository, please note this in your cover letter so that it won't be flagged for plagiarism.

CrossRef Funding Data Registry

In order to meet funder requirements, authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative, please click [here](#).

Previous rejections

Papers that have been rejected from one ESA journal cannot be resubmitted to any other ESA journal. Papers that have been withdrawn can be resubmitted to the same journal or another ESA journal. Authors whose papers have been rejected are entitled to appeal their rejection to the journal's editorial board. More information on the appeals process can be found on the [Journal Policies](#) page.

Statistics and sample size

Statistics should be fully reported (i.e., F-value, both degrees of freedom [treatments and replicates], and exact P-value [unless it's less than 0.001]). Furthermore, the paper will be withdrawn if Duncan's Multiple Range Test is used for papers that do not deal with plant resistance. For more information on statistics, please see the Statistics section of these author instructions.

Papers that have insufficient sample sizes (e.g., only a single year of data collected at one location for either insect surveys, pesticide studies, or other field data) are immediately withdrawn. The duration and size of trials/sampling must be biologically significant.

Plant extract papers

For papers that test the efficacy of plant extracts or other compounds on control or behavior modification of insects, the concentrations of the chemical constituents must be listed.

Petri dish tests

Petri dish experiments are not accepted unless they contain a field, semi-field, or greenhouse test.

Personal communications

Personal communication citations should be accompanied by a letter from the person being cited giving permission to use him or her as a citation and verifying the claim being cited. This letter should be uploaded as a supplementary file.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly. Standard abbreviations for measurements according to Scientific Style and Format, 8th edition, are acceptable, as well as common abbreviations that improve the readability of a manuscript (e.g., DNA, PCR). All other abbreviations used should be defined at the first use.

Publication Ethics

JME is committed to ethical behavior in all aspects of scholarly publishing. Please ensure your paper meets the following ethical criteria:

- The author list is complete and correct. Please see the “[Journal Policies](#)” page for authorship information and policies.
- No portions of text are directly copied from other sources, including one’s own previous papers (although some overlap is tolerated in materials and methods). Direct quotes should be placed in quotation marks. All manuscripts undergo a plagiarism test before they are sent out for review.
- The data have not been published elsewhere. Data published in another paper, including in a paper in another language, may not be published again. If portions of data published previously are being used, the author must provide explicit written consent from the publisher of the previous paper to reuse the data.

Experimental Ethics

Research published in JME must adhere to minimal ethical and compliance requirements for medical, veterinary, and wildlife conservation research. Medical entomology research may include human subjects and/or domestic and wild animals and therefore requires that authors reference compliance protocols to indicate adherence to federal, state, and local regulations, permits, and authorizations. International authors should reference similar compliance documents from their government and/or institution.

Listed below is a minimal series of basic requirements requested from USA and international researchers to be included, as needed, within an ethical section positioned in the Materials and Methods section of each manuscript:

1. Biological Use Authorization (BUA). Surveillance, epidemiological, and experimental infection studies with pathogens require containment for diagnostics and culture depending upon the virulence of the organism and the risk of vectorborne, contact, and/or aerosol transmission. Descriptions of appropriate containment for different biosafety levels can be found here: www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_sect_IV.pdf. A search engine and database to determine the Risk Group of the organism[s] concerned can be found at <http://www.absa.org/riskgroups/index.html>. Researchers should report their institution's required compliance review and approved containment level BUA protocol for the pathogen(s) or arthropods used.
2. Institutional Review Board (IRB) compliance. Use of human subjects in research must be approved by IRB committees adhering to US Department of Health and Human Services guidelines (<http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/index.html>). Each organization may have different interpretations of guidelines required for human subject activities which may range from surveys, house entry for arthropod collection, use of humans to feed arthropods, use of humans as bait for sampling host-seeking insects, test subjects for candidate repellents, etc.¹
3. Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) compliance. Use of animals in research must adhere to protocols meeting minimal ethical requirements for collection, maintenance, and experimental procedures. Research done within the USA or funded by USA agencies must adhere to requirements described by the US National Institutes of Health (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/tutorial/iacuc.htm>), and these protocols should be appropriately referenced.
4. Sampling wildlife. Most countries and states/provinces/districts require permits to collect vertebrate animals and some insects for research purposes. This is especially true for migratory species, such as birds, where international agreements are in place; for example, see permitting requirements for collecting and banding birds in North America (<http://www.pwrc.usgs.gov/bbl/homepage/permits.cfm>).

An example of state permits required for taking or trapping and release of wildlife within California can be found at

(<https://www.wildlife.ca.gov/Licensing/Directory>).

Additional permits may be required for sampling on wildlife refuges or nature conservatory properties. Reference to these permits should be required to ensure sampling was done in compliance with regional oversight, especially for endangered or threatened species.

5. Transport and release of organisms. With the increasing use of genetically modified arthropods for population or pathogen control, medical entomologists must adhere to correct oversight governing production and release. The US Department of Agriculture has strict requirements for the transport and/or release of organisms as well as experimental use permitting for applications of experimental compounds for arthropod control

(<http://www.aphis.usda.gov/wps/portal/aphis/resources/permits>).

The Biotechnology Quality Management System (BQMS) Program within the USDA helps organizations, including small businesses and academic researchers, analyze the critical control points within their management systems to better maintain compliance with the APHIS regulations (7 CFR part 340) for the import, interstate movement, and field release of regulated genetically engineered (GE) organisms.

¹Aultman, K. S., E. D. Walker, F. Gifford, D. W. Severson, C. B. Beard, and T. W. Scott. 2000. Managing risks of arthropod vector research. *Science* 288: 2321-2322.

Conflicts of interest

Potential conflicts of interest include any relationships of a financial or personal nature between an author or coauthor and individuals or organizations which, in theory, could affect or bias an author's scientific judgment, or limit an author's freedom to publish, analyze, discuss, or interpret relevant data.

Sources of financial support originating outside the coauthors' home institution(s) for any aspect of a study must be indicated in the Acknowledgments section of the paper. Financial support includes not only funding, but gratis provision of materials, services, or equipment. Any additional potential conflicts of interest, not covered in the

acknowledgments of financial support, must be revealed to the editor at submission, and disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments.

If an author or coauthor has entered into an agreement with any entity outside that authors' home institution, including the home institution of another coauthor, giving that entity veto power over publication of the study or over presentation, analysis, discussion, or interpretation of any results of the study, whether or not such veto power was exercised, this information must be disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments.

Article Types

Research

Research articles report original observations and experiments, the results of the experiment, and a discussion of the significance of the results. There is no word limit for research articles.

Review

Review articles review and synthesize current information on a topic. Review articles can also contain historical threads of important ideas (i.e., are not confined to recent citations). There is no word limit for review articles.

Forum

Forum articles are authored by acknowledged leaders in the field, review a research area, and include a stimulating, thought-provoking discussion that focuses on important, and sometimes controversial, issues. They should provide an innovative approach to current thought and speculate about future research directions.

Short Communications

Short communications should be similar to a research article, but with briefer Materials and Methods and Discussion. Total length should be 2,000 words or less.

Letter to the Editor

JME will consider submissions in the form of a letter to the editor in which the authors express their viewpoint on scientific issues. Appropriate content can include comments or criticisms in reference to a published paper, whether or not in an ESA journal, or comments and opinions unrelated to a specific published paper. A letter will be limited to 2,000 words, 10 references, and one table or figure.

The Editor-in-Chief (EIC) will judge whether a submitted letter merits consideration for potential publication based on relevance, inherent interest, and coherence of the submission, but with a view to allowing a range of opinions to be expressed. If the EIC considers the submission to be suitable in principle, he/she will send it to at least one anonymous reviewer for comments and will edit it for style and appropriate language before returning it to the corresponding author for revisions. More information on letters to the editor can be found on our Journal Policies page.

Title Page

The title page should include:

1. **Corresponding author:** Include full name, mailing address, telephone number, and email address.
2. **Title:** Should be as short as possible. Only include common names that are listed in the ESA Common Names of Insects & Related Organisms. Do not include authors of scientific names. Insert “([Order]: [Family])” immediately after the name of the organism.
3. **Author list:** Include all authors in the order the names should be published.
4. **Affiliation line:** Include full addresses of all authors. If there are multiple affiliations, designate through numbered footnotes.
5. **Abstract**
 - a. 250 words or less.
 - b. Give scientific name and authority at first mention of each organism.
 - c. Do not cite references, figures, tables, probability levels, or results.
 - d. Refer to results only in the general sense.
 - e. A second abstract in a second language is permitted.
6. **Keywords**

- a. Below the abstract, provide three to five keywords, separated by commas.
- b. Do not use abbreviations, combined keywords, or species names.

[Please click here for a sample title page.](#)

Body

Introduction

Clearly state the basis of your study along with background information and a statement of purpose.

Materials and Methods

Include a clear and concise description of the study design, experiment, materials, and method of statistical analysis.

Results

Clearly present the results. Do not include interpretation of results or interpretation of statistical analysis—simply present the results of the experiment and the results of the statistical analysis. Data listed in tables should not be listed in the results; instead, refer to the table.

Discussion

Interpret and discuss results of the study and their implications. Include suggestions for direction of future studies, if appropriate.

Acknowledgments

Place the acknowledgments after the text. Organize acknowledgments in paragraph form in the following order: persons, groups, granting institutions, grant numbers, and serial publication number.

Following the Acknowledgments, you may include a statement of author contribution outlining the specific contributions of each author to the article. A statement of author contribution is welcomed but not required.

References

- EndNote style is “Environmental Entomology,” and Reference Manager style is “Journal of Medical Entomology.”
- Only cite published or formally accepted (in press) articles, not submitted articles.
- References should be in alphabetical order. If multiple references from the same author are cited, those references should be in chronological order.
- Abbreviate journal titles according to the most recent issue of BIOSIS Serial Sources.
- For non-English titled journals that are cited in the references, the title of the journal should be spelled out.
- Systematics-related articles may specify that all serial titles be spelled out for final publication.

Sample reference styles

Journal Articles

Evans, M. A. 2000. Article title: subtitle (begin with lowercase after colon or dash unless first word is a proper noun). J. Abbr. 00:000–000.

Evans, M. A. 2001a. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., and R. Burns. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., and A. Tyler. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., A. Tyler, and H. H. Munro. 2000. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., R. Burns, and A. A. Dunn. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

In Press

Evans, M. A. 2002. Article title. J. Econ. Entomol. (in press).

Books

Burns, R. 2001. Title (initial cap only): subtitle (no initial cap after colon). Publisher, city, state abbreviation or country.

Evans, M. A. 2001. Colorado potato beetle, 2nd ed. Publisher, city, state abbreviation or country.

Tyler, A. 2001. Western corn rootworm, vol. 2. Publisher, city, state abbreviation or country.

Article/Chapter in Book

Tyler, A. 2001. Article or chapter title, pp. 000–000. In T.A.J. Royer and R. B. Burns (eds.), Book title. Publisher, city, state abbreviation or country.

Tyler, A., R.S.T. Smith, and H. Brown. 2001. Onion thrips control, pp. 178–195. In R. S. Green and P. W. White (eds.), Book title, vol. 13. Entomological Society of America, Lanham, MD.

No Author Given

(USDA) U.S. Department of Agriculture. 2001. Title. USDA, Beltsville, MD.

(IRRI) International Rice Research Institute. 2001. Title. IRRI, City, State or Country.

Patents

Harred, J. F., A. R. Knight, and J. S. McIntyre, inventors; Dow Chemical Company, assignee. 1972 Apr 4. Epoxidation process. U.S. patent 3,654,317.

Proceedings

Martin, P. D., J. Kuhlman, and S. Moore. 2001. Yield effects of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) feeding, pp. 345–356. In Proceedings, 19th Illinois Cooperative Extension Service Spray School, 24–27 June 1985, Chicago, IL. Publisher, City, State.

Rossignol, P. A. 2001. Parasite modification of mosquito probing behavior, pp. 25–28. In T. W. Scott and J. Grumstrup-Scott (eds.), Proceedings, Symposium: the Role of Vector-Host Interactions in Disease Transmission. National Conference of the Entomological Society of America, 10 December 1985, Hollywood, FL. Miscellaneous Publication 68. Entomological Society of America, Lanham, MD.

Theses/Dissertations

James, H. 2001. Thesis or dissertation title. M.S. thesis or Ph.D. dissertation, University of Pennsylvania, Philadelphia.

Software SAS Institute. 2001. PROC user's manual, version 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.

Online Citations

Reisen, W. 2001. Title. Complete URL (protocol://host.name/path/file.name) and/or DOI (Digital Object Identifier)

Tables

- Tables should be editable tables in a Word document.
- If a table continues on more than one page, repeat column headings on subsequent page(s).
- All columns must have headings.
- Leave no space between lowercase letters and their preceding values (e.g., 731.2ab).
- Do not footnote the title—use the unlettered first footnote to include general information necessary to understand the title (e.g., define terms, abbreviations, and statistical tests).
- Use approved abbreviations or abbreviations already defined in the text and define others in the general footnote.
- Use the following abbreviations in the body or column headings of tables only: amt (amount), avg (average), concn (concentration), diam (diameter), exp (experiment), ht (height), max (maximum), min (minimum), no. (number), prepn (preparation), temp (temperature), vs (versus), vol (volume), wt (weight) Jan (January), Feb (February), Mar (March), April, May, June, July, Aug (August), Sept (September), Oct (October), Nov (November), and Dec (December).

[Click here to see a sample table](#)

Figures

- Figures should be at least 300 dpi, or 1200 dpi for line graphs.
- The quality in which figures are submitted is the quality in which they will print—please ensure figures are high quality.
- The following file types of figures are accepted: tif (preferred), eps (preferred), rtf, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png. Figures should be in their native format for best quality.
- Figures should be prepared in CMYK color.
- Maximum height: 240 mm.
- Maximum width (one-column figure): 82 mm.
- Maximum width (two-column figure): 171 mm.
- For more information on preparing figures, see OUP's Author Resource Centre on [figures](#).

- All authors are required to pay additional charges for color figures. Authors may elect to publish in grayscale in print and in color online for no charge.

Supplementary Material

Supplementary Material may be submitted in the form of one or more files to accompany the online version of an article. Such material often consists of large tables, data sets, or videos that are not possible or convenient to present in print media.

Supplementary Material represents substantive information to be posted on the ESA journal website that enhances and enriches the information presented in the main body of a paper; however, the paper must stand on its own without the need for the reader to access the supplementary information to understand and judge the merits of the paper. All Supplementary Material must be provided at the time of manuscript submission and will be distributed to reviewers as part of the normal peer-review process. It will not be edited during production and will be published as submitted.

Supplementary Material should be:

- Referenced in the body of the main paper (e.g., Supp. Table S1), where a link will take the online reader to the file.
- Be labeled with an appropriate title and caption.
- Citations for any literature referenced within a Supplementary Material file should be listed in a References Cited section at the end of the file, even when a citation is duplicated in the main body of the paper.
- Videos should be kept to a reasonable size to facilitate downloading by readers.

Species Authority, Order, Family, and Common Names

- Authors should provide the authority, order, and family for all organisms that are central to the paper (including plants, bacteria, and other non-arthropod organisms) at the first mention of the organism. It is the author's responsibility to provide accurate authority, order, and family information. Organisms mentioned in passing or whose importance to the paper is limited do not need to have full authority, order, and family

listed, nor do mentions of common names of groups (e.g., mosquitoes, beetles, ticks, etc.).

- If a species name is included in the title of a paper, either the ESA-approved common name or the Latin name, the order and family should also be provided. If the order and family of an organism is provided in the title of the paper, it does not need to be provided again in the abstract and main text.
- If an organism is not listed in the title but is central to the paper, the order and family should be provided at first mention of the organism in both the abstract and the main text.
- The taxonomic authority of an organism that is central to the paper should be given the first time the organism is mentioned in both the abstract and the main text, but not in the title. For tables that include lists of species, authority should be given for each species if it is the first time it is being mentioned in the paper.
- If multiple organisms in the same genus are central to the paper, order and family only need to be provided for the first species mentioned in the genus. If multiple organisms are central to the paper, are in different genera, but are in the same order and family, order and family should be provided at first mention of each organism.
- If two organisms that share the same order and family are mentioned in the title or listed in the text of the paper together, the order and family should be placed after the first species listed and does not need to be repeated after the second species.
- A genus can be abbreviated after the first mention (except to start a sentence, in which case the genus should be spelled out). If two species belong to different genera but the genera start with the same letter, the first two letters can be used for abbreviations.
- Only [ESA approved common names](#) should be used. Common names are lower case, except for proper nouns and their derivations.

Statistics

All data reported (except for descriptive biology) must be subjected to statistical analysis. Results of statistical tests may be presented in the text, in tables, and in figures. Statistical methods should be described in Materials and Methods with appropriate references. Descriptions should include information such as sample sizes and number of replications. Only t-tests, Chi square, and analyses of variance require no citation. Cite the computer program user's manual in the References Cited.

Probit/logit

When presenting results of probit/logit analysis, the following columns should be included in tables in the following order (left to right); n, slope + SE, LD (or LC) (95% CL), and chi-square. When a ratio of one LD versus another is given, it should be given with its 95% CI. Statistical tests to show what model best fits data intended to estimate the 99.9986% level of effectiveness should be presented to justify use of any model, including the probit model. Thus, we do not recommend use of the Probit 9 without tests to show that the probit model fits the data.

Analysis of Variance or t-test

When presenting the results of analysis of variance or a t-test, specify F (or t) values, degrees of freedom, and P values. This information should be placed in parentheses in the text. Example: (F = 9.26; df = 4, 26; P < 0.001). If readability of the text is affected by the presence of repeated parenthetical statistical statements, place them in a table instead.

Regression

In regressions, specify the model, define all variables, and provide estimates of variances for parameters and the residual mean-square error. Italicize variables in equations and text.

Variance and sample size

Include an estimate of the variance (or standard error) and sample size for each mean regardless of the method chosen for unplanned multiple comparisons. The use of Duncan's Multiple Range Test (DMRT) is not acceptable as a mean separation test as it

was designed to be a very liberal test intended to find even minor differences in resistance between plant lines used for breeding.

Model Analysis, Guidelines, Equations, and Computer Code

Model Analysis

At the beginning of the manuscript, authors should state clearly the goals of their model construction and analysis. Evaluation by reviewers depends upon these goals and the type of model. Authors should attempt to describe the main conclusions, limitations, and sensitivity of results to assumptions. For stochastic models, describe the variability in the results.

Modeling Guidelines

The following guidelines pertain to any mathematical model calculated for purposes other than statistical analysis.

- Authors must adequately describe both model structure and model analysis.
- Authors must explain and justify original equations and computer programs or justify the selection of a published software package used in the computation of models.
- Model structure and steps in the analysis must be described in the Materials and Methods section.
- Without presenting extensive computer code, the text must permit an understanding of the model that would allow most mathematically inclined scientists to duplicate the work.
- Present all equations that represent the biology of the system being modeled.
- Unless their derivation is self-evident, show how the equations were derived and mention the underlying assumptions.
- Express how the equations are solved over time and space.
- Provide references for standard techniques (e.g., matrix manipulation, integration).

- Define all variables and parameters in each equation and describe their units (e.g., time, space, and mass).
- In the Materials and Methods or Results section, present the range of parameter values included in the model, and describe the uncertainty in or range of validity of these values.

Equations

Consult *Mathematics into Type* for correct formatting of equations and mathematical variables. Italicize all mathematical variables.

Validation or Testing of Model Results

Data used for validation must be independent of data used to build or calibrate the model. Authors must state why the model did not require testing (e.g., theoretical study), why it cannot be tested (e.g., lack of data), or how it was tested.

Structure of Computer Code

For models solved or simulated by computers, mention the programming language and computer used. Describe the important numerical methods used in calculating the model (e.g., integration and random number generation). Mention how the program's logic and algorithms were tested and verified. When published software is computed, provide a reference and state which procedures were used. Discuss in any section of the manuscript the limitations of the published software. Original computer programs should be made available at the request of reviewers and readers.

Taxonomic Papers

ICZN compliance

JIS is compliant with the International Code of Zoological Nomenclature, and the publishing processes of the journal ensure that new acts of nomenclature are considered valid under the code. JME is permanently archived with CLOCKSS, LOCKSS, and Portico in a manner that preserves the content and layout of the work.

Nomenclatural Works and Zoobank registration

You will be asked during the submission process whether your article contains a new nomenclatural act. If it does, in order to comply with ICZN regulations, the editorial office will register your article in ZooBank on your behalf and will insert a nomenclatural statement, which includes a Life Science Identifier (LSID), into the article. Your article will also include the online publication date, and the statement “Version of Record, first published online [online publication date], with fixed content and layout in compliance with Art. 8.1.3.2 ICZN.” Following publication, the editorial office will update your ZooBank entry with the DOI, Volume, and Issue information.

If you have already registered the paper or would like to do so yourself, please let the editorial office know.

Taxonomic Style

Follow the [International Code of Zoological Nomenclature](#) for taxonomic style. Some specific areas to note:

- Center the heading that indicates the name of the taxon in bold type.
- Center figure numbers in parentheses under the main heading; do not use bold type.
- Start all synonymies at the left margin with runovers indented.
- Include authors and date.
- References must appear in References Cited section.
- Use telegraphic style throughout descriptions.

Taxonomy Headings

Use only acceptable 3rd-level subheadings such as:

- Male
- Female
- Material Examined
- Type Material
- Distribution
- Etymology

- Biology
- Discussion
Avoid using “Description” as a subheading.

Dates

- Use Roman numerals I through XII to designate month of collection.
- Use Arabic numerals 0000 through 9999 to designate collection years. Do not abbreviate other years, including the 21st century, except when explicitly transcribing exactly what appears on specimen labels.
- Express dates in this format: day-month (use a Roman numeral)-year.
Example: 2-V-97.

Locality Other than Principal Types

- Start with the largest area followed by successively smaller areas separated by colons.
- Capitalize countries.
- Arrange data for each locality in the following order: count of specimens and sex or stage (as applicable), city or vicinity, date, collector, and depository. Example: MEXICO: Tamaulipas: 1 male, 1 female, Ciudad Mante, 15-III-97, K. Haack; 5 females, Ciudad Victoria, 3-VII-99, C. Hughes, MCZ.
- Arrange localities alphabetically.
- Use a semicolon to separate data for different localities.
- Define depositories in the Materials and Methods.

Type Material

Start description with the principal type in capital letters. Follow this immediately with count and sex of specimens (use male and female symbols if possible), then place additional data in the order of locality, date, additional data, and collector. Separate these items with commas. Example:
HOLOTYPE: 1 male, Locust Grove, VA, 22-X-98, on *Cercis canadensis*, R.

H. Foote. PARATYPES: 2 males, same data.

Voucher Specimens

Voucher specimens of arthropods serve as future reference for published names used in scientific publications. Authors are required to deposit voucher specimens in an established, permanent collection and to note in the published article that the expected deposition has been made, its location, and the collection accession number. Authors should contact the curator of a voucher repository before deposition concerning the procedures required for curation to ensure that the collection will accept the voucher materials. The designation and proper labeling of voucher specimens is the author's responsibility. When available, at least three specimens should be deposited. Each specimen should have the following information provided at the time of deposition:

- Standard label data that are required for the specimens collection (i.e., locality, date of collection, collector, host, ecological data, whether the specimen is from a laboratory collection, etc.).
- An identification label that includes the identifier and date of identification.
- A label that designates the specimen as "voucher."

Immutable Advance Access

JME publishes articles online ahead of inclusion in an issue via OUP's Advance Access.

In order to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) with regard to nomenclatural works, ALL articles published by ESA's journals, regardless of whether they include nomenclatural information, will be immutable; this means that no changes will be allowed to any article without the publication of an erratum clearly stating the changes that have been made. Therefore, it is the responsibility of the authors to carefully check their proofs for accuracy, and to notify the publisher of any changes that are necessary prior to Advance Access publication.

Gene Sequencing

- Inclusion of a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and amino acid sequence data is required.

- Sequences from new species and new genes must indicate the proportion of the gene sequenced and should include data from both strands.
- The accession number may be included in the original manuscript or the sequence may be provided for review and an accession number provided when the manuscript is revised.

Datasets Deposited in Third-Party Repositories

The *Journal of Medical Entomology* encourages authors to submit complete datasets behind the paper to a third-party repository. Datasets deposited in third-party repositories should be cited in the references of a paper. Dataset citations can be inserted into a paper at any point until the proofs have been returned.

ESA journals are integrated with Dryad (www.datadryad.org), an online data repository. Upon submission, authors will be sent a link to easily deposit the full dataset(s) behind their research in Dryad. Datasets deposited in Dryad are given unique DOIs, linked to the corresponding paper, and are available to be reviewed by subject editors of the journal upon request. Depositing data in Dryad is optional.

If you would like your paper to link to the dataset, data should be deposited prior to acceptance. Authors are required to pay Dryad for depositing data, but this fee is only charged if a paper is accepted. ESA members are eligible to request one of a limited number of waivers of the deposit fee. Please contact the ESA editorial office (pubs@entsoc.org) to request a waiver.

Language Editing

Many manuscripts are withdrawn without review because the English language is not good enough to be sent to reviewers. For authors whose primary language is not English, we suggest having the paper edited by an English-speaking colleague or professional editing service prior to submission. For a professional editing service, ESA journals have a partnership with the [Charlesworth Group](#), whereby ESA authors receive a 10% discount on editing services. The discount is automatically applied if authors follow the hyperlink above.

Immutable Advance Access

JME publishes articles online ahead of inclusion in an issue via OUP's Advance Access.

In order to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) with regard to nomenclatural works, ALL articles published by ESA's journals, regardless of whether they include nomenclatural information, will be immutable; this means that no changes will be allowed to any article without the publication of an erratum clearly stating the changes that have been made. Therefore, it is the responsibility of the authors to carefully check their proofs for accuracy, and to notify the publisher of any changes that are necessary prior to Advance Access publication.

Revised Papers

For revised papers, we have a few more formatting requirements than we do for new submissions, to ensure the paper is ready for publication if it is accepted.

Response to reviews

Provide a document listing how you changed your manuscript in response to each point mentioned by the reviewers. If you did not implement a change suggested by a reviewer, please explain why.

Style

For any matters of editorial style not covered in these author guidelines, ESA journals adhere to the [Council of Science Editors \(CSE\) Style Guide](#).

Figures

- Figures should be at least 300 dpi, or 600 dpi for line graphs.
- Maximum figure height: 240 mm.
- Maximum width (one-column figure): 82 mm.
- Maximum width (two-column figure): 170 mm.
- The quality in which figures are submitted is the quality in which they will print—please ensure figures are high quality.
- Each figure should be submitted as an individual file. Please do not copy and paste them into the main document.

- The following file types of figures are accepted: tif, eps, rtf, doc/.docx, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png.
- Figures should be prepared in CMYK format (not RGB).
- For more information on preparing figures, see Oxford University Press's Author Resource Centre on [figures](#).

References

ESA journals use “Environmental Entomology” style in EndNote, or “Journal of Medical Entomology” style in Reference Manager. Please see the References section in these author instructions for examples.

Measurements

Use metric units. English units may follow within parentheses if needed.

Nomenclature

- Give full scientific name and authority at first mention of each organism (including plants and non-insect animals) in the abstract and again in the text.
- Only use common names listed in the current [ESA Common Names of Insects & Related Organisms](#) online database. Common names should be lowercase, except for proper nouns and their derivations.
- When possible, please provide as much genetic and/or colony information available is useful (for example, “Rockefeller colony of *Aedes aegypti* (L.)”). Including geographic origin and generations in culture is also useful, but may not always be known and is not required.

Submissions of Cover Photographs

ESA's journals welcome submissions of insect photos for their covers. Photos must be of living (not pinned) insects and must be submitted as high-resolution (300 dpi or higher) image files. If you wish to crop your image to the exact dimensions of our cover, the dimensions to use are W: 219 mm x H: 203 mm; however, photos that do not match those dimensions can still be accepted. The insect species featured on the cover of a given issue must be mentioned in the issue in question.

Photographers will be asked to give ESA one-time permission to use the photo on the journal cover and will retain their copyright of the photo.

Submit photos to pubs@entsoc.org. If you have questions about submitting a photograph for the cover, please contact ESA Director of Publications Lisa Junker at ljunker@entsoc.org.