



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Entomologia Médica

Diego Lima Candido da Silva

**Morfometria geométrica das asas de diferentes
populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva,
1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938)
(Psychodidae, Phlebotominae).**

**Rio de Janeiro
2018**



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Entomologia Médica

da Silva, Diego Lima Candido.

Morfometria geométrica das asas de diferentes populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Psychodidae, Phlebotominae). / Diego Lima Candido da Silva. - Rio de Janeiro, 2018.

ix, 35f. f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2018.

Orientador: Rodrigo Espíndola Godoy.

Co-orientador: Maurício Luiz Vilela.

Bibliografia: f. 29-35

1. Flebotomíneos. 2. leishmanioses. 3. diferença interespecífica. I. Título.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Entomologia Médica

Diego Lima Candido da Silva

Morfometria geométrica das asas de diferentes populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Psychodidae, Phlebotominae).

Monografia submetida como requisito parcial para obtenção do grau de especialista em Entomologia Médica, Curso de Especialização em Entomologia Médica, pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

**Orientadores:
Dr. Rodrigo Espíndola Godoy
Dr. Maurício Luiz Vilela**

**Rio de Janeiro
2018**



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Entomologia Médica

Diego Lima Candido da Silva

**Morfometria geométrica das asas de diferentes
populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva,
1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938)
(Psychodidae, Phlebotominae).**

**Monografia submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
especialista em Entomologia Médica,
Curso de Especialização em Entomologia
Médica, pelo Instituto Oswaldo
Cruz/FIOCRUZ**

Banca Examinadora

Dr. Alfredo Carlos Rodrigues de Azevedo

Dr.ª Júlia dos Santos Silva

Dr. Rubens Pinto de Mello

**Rio de Janeiro
2018**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao único Deus YHWH, o amado de minh'alma, a Pedra Angular de minha vida. Seja sempre o Vosso querer e Vossa santa e majestosa vontade, sei que é e será boa e agradável, não importa as tribulações desse mundo, sei que estás comigo. Deus YHWH, de todo meu coração e no meu íntimo mais profundo agradeço por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus YHWH, o Verbo, Verdadeiro Amigo, Conselheiro, Fiel, Alfa e Ômega, te agradeço por tudo que passou e pelo que virá. Meu eterno amor, Deus YHWH.

A minha querida e amada família, meu pai Sergio, minha mãe Rosângela, minha irmã Patrícia e minha tia Maria de Fátima, pelo amor e o apoio que sempre me dedicam.

Minha gratidão ao Luis Eduardo, por sua amizade, apoio e ajuda na tradução.

As minhas amizades, especiais e valorosas, agradeço pelo apoio.

Ao meu orientador Dr. Maurício Luiz Vilela, pela colaboração, confiança e aos ensinamentos. Agradeço a oportunidade em tê-lo como orientador e amigo.

Ao meu coorientador Dr. Rodrigo Espíndola Godoy, pela dedicação, confiança, habitual atenção e aos ensinamentos. Agradeço a oportunidade em tê-lo como coorientador e amigo.

Agradeço a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera – Instituto Oswaldo Cruz (IOC/ FIOCRUZ), pela acolhida e colaboração.

Agradeço a Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo (FSP/ USP), que através do meu coorientador, liberou a coleção para o estudo.

Aos professores do programa de pós-graduação *Lato sensu* em Entomologia Médica, agradeço pelos ensinamentos.

Aos colegas e amigos, que fizeram parte da turma de 2016, agradeço pelo companheirismo.

“Eu vejo um novo céu e uma nova terra, vejo um novo tempo que se abre para mim. A minha história ainda não chegou ao fim, já passei pelo vale, já venci o deserto e atravessei o rio da minha dor, e agora é chegado o tempo de receber as promessas do Senhor. Eu posso ver pela fé, o meu momento chegou, tudo novo agora se tornou. Este é o início de um novo tempo, este é o início de uma nova estação, este é o início de um novo dia, este é o início de uma nova unção, nova unção. Eu vejo que o melhor de Deus começa hoje aqui, o melhor dos meus dias não está no meu passado, o melhor da minha história está diante de mim e eu vou perseverar até o fim”

(Maria Cristina Mel de Almeida Costa –
Um novo tempo)

Resumo

A leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) no Novo Mundo e, por espécies do complexo *donovani* (Laveran & Mesnil, 1903), no Velho Mundo (Missawa *et al.*, 2011). Em virtude da leishmaniose fazer parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (Organização Mundial da Saúde, 2018) é importante estudar os principais insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, tais como *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) porque a primeira espécie apresenta grande capacidade vetorial e está amplamente distribuída pela América e, a segunda é vetora na região central do Brasil, sendo as fêmeas morfologicamente indistinguíveis de *Lutzomyia longipalpis*. Desse modo, é importante à aplicação de novas ferramentas para identificação de diferenças populacionais interespecíficas. O presente estudo tem como objetivo geral avaliar diferentes populações de *Lutzomyia longipalpis* (machos) de diferentes biomas e comparar com população de *Lutzomyia cruzi* (machos) através da morfometria geométrica de asas. As espécies de *Lutzomyia longipalpis* oriundos dos municípios de Floriano – Piauí, Sobral – Ceará e *Lutzomyia cruzi* de Corumbá – Mato Grosso do Sul foram coletados com armadilha CDC modelo HP e processados para montagem. Foram utilizados espécimes de *Lutzomyia longipalpis* da coleção da Faculdade de Saúde Pública das localidades: Serra da Bodoquena – Mato Grosso do Sul e Mariápolis – São Paulo. Na análise do tamanho do centroide utilizando 13 marcos anatômicos (*landmarks*) das asas foi observado que os espécimes que apresentaram diferenças significativas foram: *Lutzomyia longipalpis* dos Estados do Mato Grosso do Sul, Ceará e Piauí ($p < 0,0001$); *Lutzomyia longipalpis* dos Estados do Piauí e São Paulo ($p < 0,0002$); *Lutzomyia cruzi* do Estado do Mato Grosso do Sul ($p < 0,0001$) quando comparado aos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* dos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. A morfometria geométrica das asas é uma técnica capaz de diferenciar espécies de flebotomíneos. Com a análise do tamanho do centroide e utilizando os 13 marcos anatômicos (*landmarks*) das asas observam-se diferenças na conformação das mesmas nas populações de *Lutzomyia longipalpis* e entre as populações de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*.

Palavras chaves: Flebotomíneos, leishmanioses, diferença interespecífica

Abstract

Visceral leishmaniasis is caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in the New World and by species of the *donovani* complex (Laveran & Mesnil, 1903) in the Old World (Missawa et al., 2011). Due to leishmaniasis being part of the Neglected Tropical Diseases group (World Health Organization, 2018) it is important to study the main insects of the order Diptera, family Psychodidae, such as *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) because the first species has a great vector capacity and is widely distributed throughout the Americas, and the second is a vector in central of Brazil, with females being morphologically indistinguishable from *Lutzomyia longipalpis*. In this way, it is important to apply new tools to identify intra/interspecific population differences. The present study has the general objective of evaluating different populations of *Lutzomyia longipalpis* (males) from different biomes and comparing them with the population of *Lutzomyia cruzi* (males) through the geometric morphometry of the wings. The species of *Lutzomyia longipalpis* from the municipalities of Floriano - Piauí, Sobral - Ceará and *Lutzomyia cruzi* from Corumbá - Mato Grosso do Sul were collected with CDC model HP trap and processed for assembly. Also, *Lutzomyia longipalpis* specimens from the collection of the Public Health Faculty of the localities: Serra da Bodoquena - Mato Grosso do Sul and Mariápolis - São Paulo, were used. In the analysis of the centroid size using 13 landmarks of the wings, it was observed that the specimens who presented significant differences were: *Lutzomyia longipalpis* from the States of Mato Grosso do Sul, Ceará and Piauí ($p < 0.0001$); *Lutzomyia longipalpis* from the states of Piauí and São Paulo ($p < 0.0002$); *Lutzomyia cruzi* from the State of Mato Grosso do Sul ($p < 0.0001$) when compared to the specimens of *Lutzomyia longipalpis* from the states of Mato Grosso do Sul and São Paulo. The geometric morphometry of the wings is a technique capable of differentiating species of sand flies. With the analysis of the size of the centroid and using the 13 landmarks of the wings, differences in the conformation of the same were observed among the populations of *Lutzomyia longipalpis* and among the populations of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*.

Keywords: Phlebotomines, leishmaniasis, interspecific difference

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Análise de Componentes Principais: PCA

Análise de Variáveis Canônicas: CVA

Análise Generalizada de Procrustes; AGP

Ceará: CE

Doenças Tropicais Negligenciadas: DNTs

Ensaio Imunoenzimático: ELISA

Feromônio 9-metilgermacreno-B: 9MGB+

Feromônio cembreno-1: CEMB-1

Funções Discriminantes: FD

Imunofluorescência indireta: IFI

Intradermorreação de Montenegro: IDRM

Leishmania: *Le.*

Leishmaniose Tegumentar Americana: LTA

Leishmaniose Visceral Americana: LVA

Leishmaniose Visceral: LV

Lutzomyia: *Lu.*

Marcos anatômicos: *landmarks*

Mato Grosso do Sul (*Lutzomyia cruzi*): MSc

Mato Grosso do Sul: MS

NC: Enecê

Neglected Tropical Diseases: NTDs

Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde:

OPAS/OMS

Piauí: PI

São Paulo: SP

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. LEISHMANIOSES.....	1
1.2. LEISHMANIA.....	2
1.3. LEISHMANIOSE VISCERAL	4
1.4. PREVENÇÃO E CONTROLE	8
1.5. FLEBOTOMÍNEOS.....	9
1.6. MORFOMETRIA.....	11
1.7. MORFOMETRIA LINEAR/ CLÁSSICA E MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. PROCEDÊNCIA DAS ESPÉCIES.....	13
3.2. PROCESSAMENTO PARA MONTAGEM.....	14
3.3. MORFOMETRIA GEOMÉTRICA.....	15
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são infecções cujos agentes etiológicos são protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross, 1903, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae; tais parasitas, obrigatoriamente, habitam os macrófagos de hospedeiros vertebrados. A sua transmissão ocorre após a picada de espécimes fêmea de flebotomíneos infectadas por leishmânias. A infecção pode ocorrer por 15 espécies agrupadas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Organização Pan-Americana de Saúde, 2014) (Figura 1).

As leishmanioses no Novo Mundo podem ser divididas em Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e, com manifestações clínicas diversas, podendo evoluir desde a cura espontânea até a morte.

A LTA pode apresentar três aspectos clínicos: leishmaniose cutânea, com lesões cutâneas, ulcerosas ou não, no local da picada do flebotomíneo ou metástase linfática (ex: *Leishmania (Viannia) guyanensis*); leishmaniose muco-cutânea, de lesões severas, com comprometimento naso-buco-faríngeo, e a leishmaniose anérgica difusa, com lesões cutâneas disseminadas, que ocorre geralmente em indivíduos anérgicos com deficiência específica de imunidade.

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelo parasito *Leishmania (Le.) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) no Novo Mundo e por espécies do complexo *donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) no Velho Mundo (Missawa *et al.*, 2011). Na LVA ocorre o comprometimento do fígado, do baço, da medula óssea e dos tecidos linfóides podendo progredir para um quadro bastante grave e, se não tratada de forma adequada e precocemente, pode levar o paciente à morte. Dada a sua incidência e alta letalidade, especialmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, tem tido, mais recentemente, sua clínica agravada por conta de indivíduos portadores da infecção pelo HIV (Brasil, 2006; OMS, 2010).

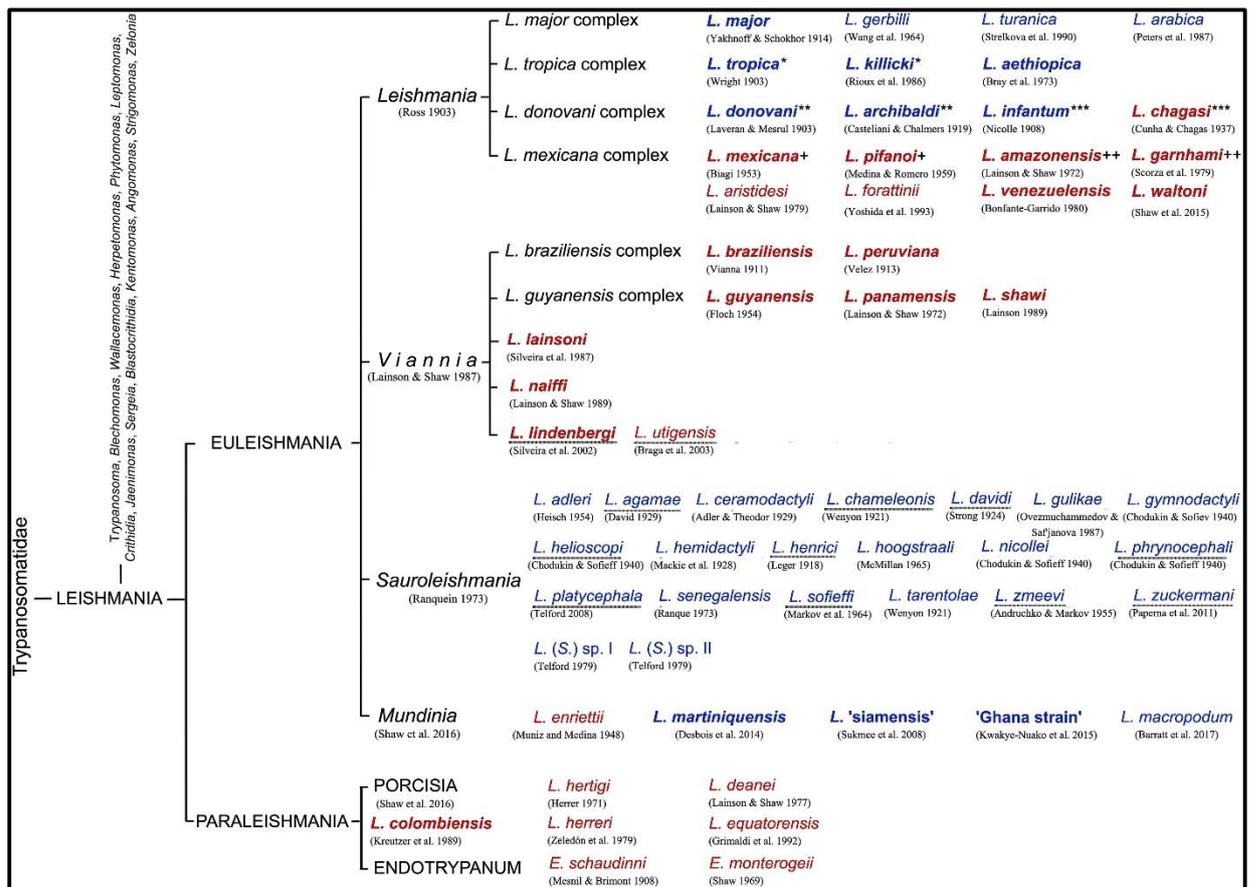


Figura 1: Classificação taxonômica atual de espécies de *Leishmania* spp., considerando a descrição original das espécies propostas com base em critérios extrínsecos e a partir dos resultados obtidos por métodos bioquímicos e moleculares (Fonte: Adaptado de Akhoundi, M. et al., 2017).

1.2. Leishmania

Os parasitos possuem duas formas, morfologicamente distintas: a promastigota, presente no trato digestivo do vetor, e a amastigota, encontrada nas células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (Lainson et al., 1987; Killick-Kendrick, 1990). As formas promastigotas (15-23 µm) estão presentes no meio extracelular, na luz do trato digestivo do flebotomíneo. As formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo da fêmea de flebotomíneo, se diferenciam em formas promastigotas (flagelo livre), que são posteriormente inoculadas, após o ciclo gonotrófico do inseto, na pele de mamíferos durante uma segunda hematofagia. Nos mamíferos hospedeiros, os parasitos assumem a forma amastigota (flagelo intracelular), arredondada e imóvel (3-6 µm), e se multiplicam obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (especialmente macrófagos). À medida que as formas

amastigotas se multiplicam dentro dos macrófagos, os mesmos sofrem apoptose e assim liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos (Almeida, 2009) (Figura 2).

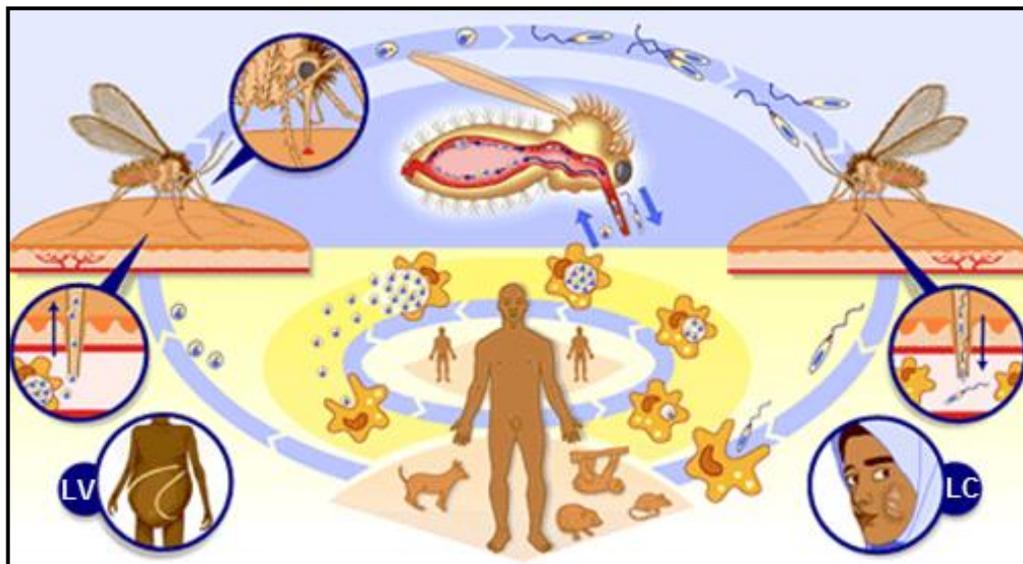


Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania spp* (Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2010).

Estes parasitos possuem a seguinte posição sistemática (Levine *et al.*, 1980):

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866

Subreino: PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963

Subfilo: MASTIGOPHORA Desing, 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Subordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobber, 1905

A leishmaniose faz parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) (Organização Mundial Da Saúde, 2018). As DTNs estão presentes principalmente em países subdesenvolvidos e emergentes (em desenvolvimento).

Atualmente, não há vacina disponível para prevenção das leishmanioses. Contudo, medidas preventivas pessoais têm sido sugeridas, tais como: evitar atividades ao ar livre desde o anoitecer até o amanhecer, utilização de mosquiteiros, uso de roupa protetora e repelente para insetos; e construção de casas, deixando uma distância de pelo menos 400 metros a partir do limite das florestas ou áreas de vegetação densa (Organização Pan-Americana de Saúde, 2014).

1.3. Leishmaniose Visceral

A LV é uma enfermidade sistêmica caracterizada por febre de longa duração, hepatoesplenomegalia (Figuras 3 e 4), perda de peso, diminuição da força muscular e anemia. Verificam-se ainda a presença das sintomatologias de febre e esplenomegalia associado ou não à hepatomegalia, como também o diagnóstico laboratorial, sendo eles complementares (o hemograma) ou imunológicos (exames sorológicos, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são invariavelmente reativos e a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e o parasitológico (aspirado de medula óssea ou baço) (Brasil, 2014).



Figura 3: Paciente em fase aguda com Leishmaniose Visceral (Fonte: Adaptado de Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.).



Figura 4: Paciente em fase aguda com Leishmaniose Visceral. (Fonte: Adaptado de Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.).

A agilidade no tratamento (Barbosa *et al.*, 2016) e uma organização dos serviços de saúde contribui para as ações de prevenção e controle das leishmanioses, ocorrendo assim a diminuição da taxa de mortalidade (Organização Pan-Americana de Saúde, 2017) (Figura 5).

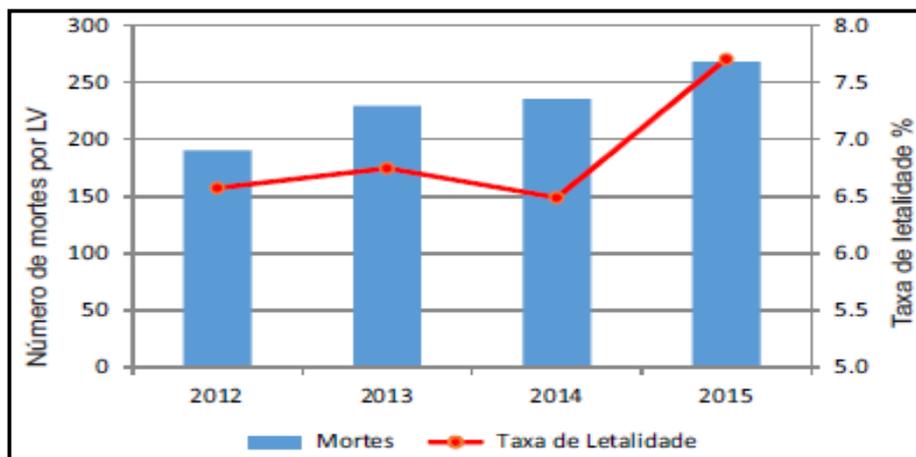


Figura 5: Número de mortes e letalidade por leishmaniose visceral, Américas, 2012 - 2015. (Fonte: Adaptado de Organização Pan-Americana de Saúde. Informe Leishmaniose Nº 5 – Abril de 2017).

No ano de 2013 o Brasil e juntamente com Sudão, Sudão do Sul, Etiópia, Índia e Bangladesh, lideraram o número de casos registrados de LV (Figura 6).

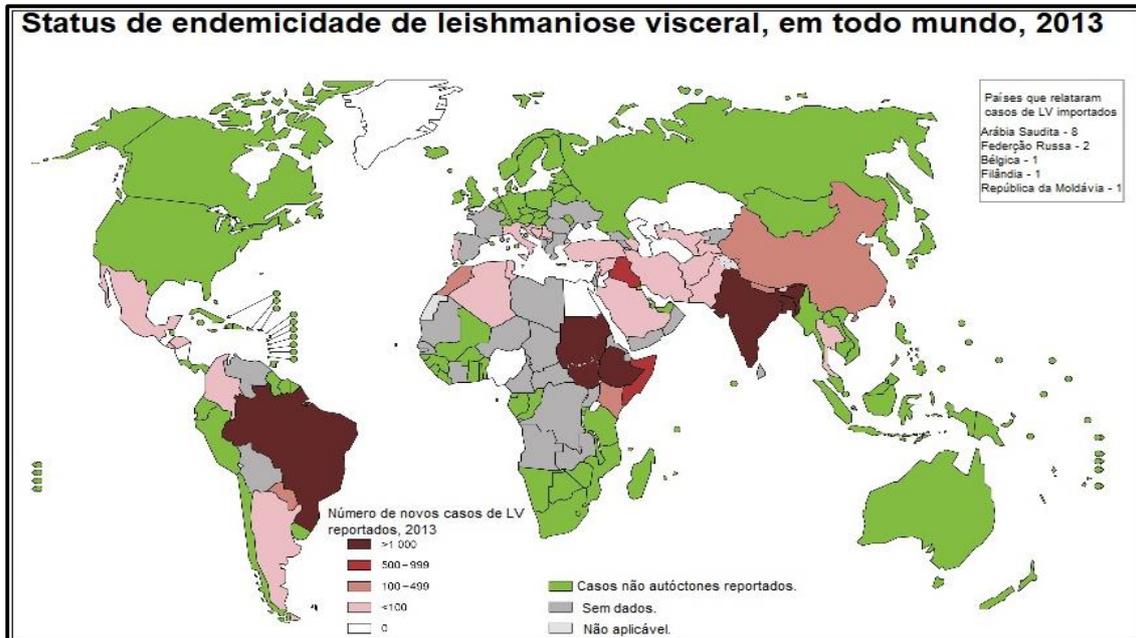


Figura 6: Número de casos de leishmaniose visceral no mundo em 2013. (Fonte: Adaptado de: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png?ua=1)

A LV é classificada como a forma mais grave da leishmaniose, devido às complicações e potencial de evoluir para a morte quando não tratada. No continente americano está presente em 12 países sendo que o Brasil representa 96% dos casos. A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) classifica a transmissão de LV nos países como transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai), transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México) (Organização Pan-Americana de Saúde, 2015).

Nas Américas foram notificados 52.176 de casos humanos de LV entre 2001 e 2015 (Figura 7). Sendo que somente em 2015 foram notificados 3.456 casos de LV em 8 países, e desses números de casos notificados em 2015, no Brasil foram 3.289 casos (Tabela I) (Organização Pan-Americana de Saúde, 2017).

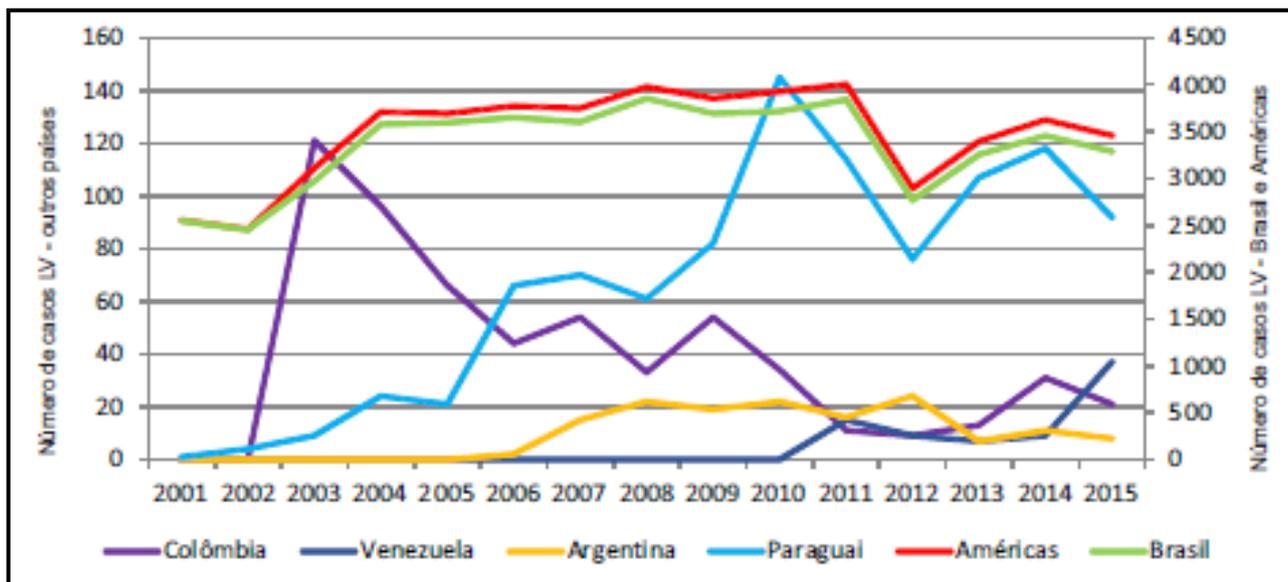


Figura 7: Casos de leishmaniose visceral, segundo países com maior ocorrência de casos, Américas, 2001-2015. (Fonte: Adaptado de SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais/Serviços de Vigilância; Organização Pan-Americana de Saúde. Informe Leishmaniose Nº 5 – Abril de 2017)

Tabela I: Número, Proporção de casos e Incidência de leishmaniose visceral segundo países, Américas, 2012 -2015. (Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde. Informe Leishmaniose Nº 5 – Abril de 2017)

Países	2012				2013				2014				2015			
	Nº casos	% casos	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²	Nº casos	% casos	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²	Nº casos	% casos	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²	Nº casos	% casos	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²
Brasil	2,770	95.8	4.54	2.31	3,253	95.8	4.35	2.71	3,453	95.2	5.21	2.62	3,289	95.2	4.09	2.54
Paraguai	76	2.6	2.47	2.03	107	3.2	3.85	3.27	118	3.3	4.06	2.68	92	2.7	3.01	2.36
Venezuela	9	0.3	1.28	0.22	7	0.2	0.58	0.10	9	0.2	1.55	0.24	37	1.1	1.24	0.34
Colômbia	9	0.3	2.34	0.36	13	0.4	2.65	0.29	31	0.9	3.3	0.41	21	0.6	7.04	0.63
Argentina	24	0.8	1.13	1.06	7	0.2	0.61	0.19	11	0.3	1.75	0.96	8	0.2	0.89	0.67
Honduras	0	0.0	0.0	0.0	3	0.1	1.21	0.67	2	0.1	3.12	0.31	6	0.2	2.4	0.34
El Salvador	0	0.0	0.0	0.0	1	0.05	2.74	0.90	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Guatemala	0	0.0	0.0	0.0	1	0.05	2.58	1.98	0	0.0	0.0	0.0	2	0.1	1.9	1.9
México	4	0.1	0.57	0.21	4	0.1	0.59	0.22	0	0.0	0.0	0.0	1	0.0	4.3	0.1
Total	2892	100.0	4.25	2.15	3,396	100.0	4.17	2.40	3,624	100.0	5.07	2.42	3,456	100.0	5.07	2.42

(Fonte: Adaptado de SisLeish-OPS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância)

1- Incidência por 100.000 habitantes considerando a população das áreas de transmissão de LV em países e regiões.

2- Incidência por 100.000 habitantes considerando a população total dos países com transmissão de LV.

1.4. Prevenção e controle

Nos últimos anos a OPAS e OMS em cumprimento com as Resoluções AMS 60.13 de 2007 e CD 49. R19 de 2009 vem realizando um trabalho conjunto que fortalece as ações de vigilância e controle, visando reduzir as formas graves da doença, através do acesso ao diagnóstico precoce, tratamento adequado dos casos e redução do contato do homem-vetor (Organização Pan-Americana de Saúde, 2015) (Figura 8). Quanto ao vetor, a gestão ambiental pode ser utilizada como medida preventiva, através da limpeza de pátios e jardins, a fim de alterar as condições do ambiente, quando eles oferecem lugares de criação e de estabelecimento das formas imaturas do vetor (Organização Pan-Americana de Saúde, 2014).

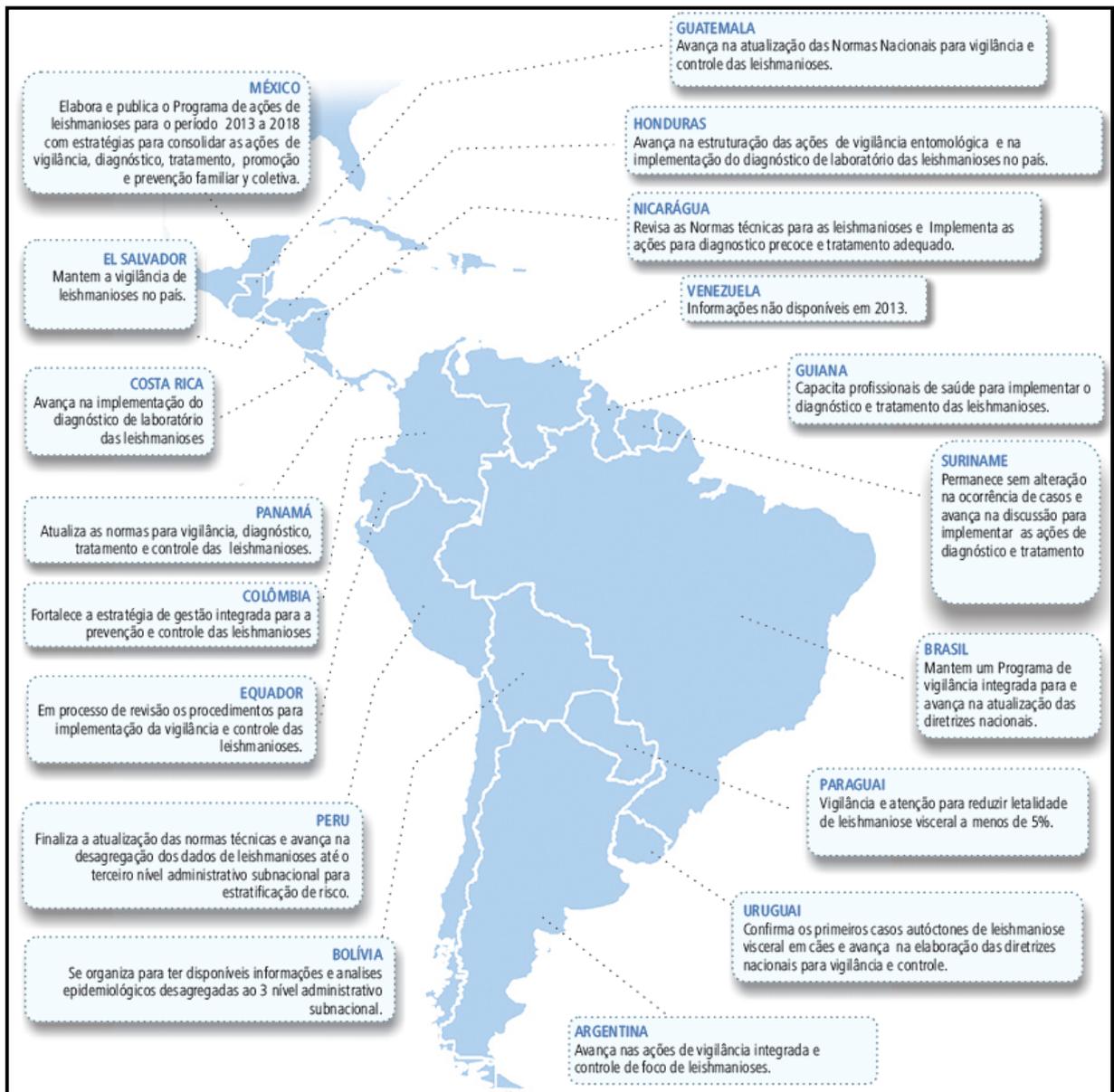


Figura 8: Ações de vigilância e controle nos países latino-americanos. (Fonte: Adaptado de Organização Pan-Americana de Saúde. Informe Leishmaniose Nº 3 – Julho de 2015).

1.5. Flebotomíneos

O inseto vetor denominado flebotomíneo (Figura 9), pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Conhecido popularmente, dependendo da região, como tatuquira, mosquito palha, birigui, entre outros. Os vetores em geral não ultrapassam 0,5 cm de comprimento, tendo pernas delgadas e longas, e o corpo densamente piloso. Têm como característica saltar durante os voos e mantêm asas eretas, mesmo em

repouso. Somente as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para realizar a hematofagia em vertebrados (Almeida, 2009).



Figura 9: Fêmea de flebotomíneo. (Fonte: Adaptado de: http://www.who.int/leishmaniasis/Leishmaniasis_vector_hr.jpg?ua=1)

Os flebotomíneos são holometábolos, sendo assim passam pelas seguintes fases: ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (Forattini, 1973; Sherlock, 2003). Os insetos adultos apresentam hábito crepuscular noturno, estendendo-se até o início da manhã, entretanto em ambientes onde a incidência de luz é baixa podem apresentar atividade diurna (Forattini, 1973). No que se diz respeito os hábitos alimentares, o macho e a fêmea alimentam-se de fontes energéticas como néctares e mel de afídeos e homópteros, mas sendo a fêmea a que realiza o processo de hematofagia, pois é imprescindível para maturação dos ovários, fato esse que a torna capaz de veicular determinados patógenos (Forattini, 1973; Rangel & Lainson, 2003).

Os flebotomíneos apresentam uma importância na transmissão de agentes etiológicos de doenças, como: bartonelose, arboviroses e especialmente as leishmanioses visceral e tegumentar (Bastos *et al.*, 2016).

No Brasil, o principal vetor na transmissão do protozoário *Le. infantum chagasi* é a espécie *Lutzomyia (Lu.) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) que apresenta grande competência vetorial e consegue se adaptar em diferentes meios modificados pelo o homem, estando presente até em centros urbanos de grandes cidades. Nos grandes centros urbanos a espécie pode ser encontrada em ambientes peridomiciliares, áreas como abrigos de animais, com acúmulo de lixo e matéria orgânica em decomposição. No Brasil *Lu.*

longipalpis faz-se presente em todas as regiões do país e também está amplamente distribuída nas Américas, desde o México até a Argentina, sendo um importante vetor em grande parte das áreas onde ele se encontra (Grimaldi *et al.*, 1989).

Outro flebotomíneo responsável pela veiculação da mesma espécie de leishmânia é *Lutzomyia (Lu.) cruzi* (Mangabeira, 1938). Essa espécie é incriminada como vetor em especial nos Estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, principalmente nos municípios: Alto Araguaia, Barão de Melgaço, Barra do Garças, Canarana, Chapada dos Guimarães, Cuiabá, Dom Aquino, Feliz Natal, Itiquira, Jaciara, Juína, Mirassol d'Oeste, Nobres, Nova Brasilândia, Nova Canaã do Norte, Paranatinga, Poconé, Pontal do Araguaia, Poxoréo, Primavera do Leste, Rondonópolis, Rosário Oeste, Santo Antônio do Leverger e Sorriso (Missawa *et al.*, 2006).

Essas duas espécies de flebotomíneos apresentam características morfológicas muito próximas onde às fêmeas são indistinguíveis e os machos apresentam diferenças no tufo formado por quatro cerdas implantadas na região basal do gonocoxito. Em *Lu. longipalpis* as quatro cerdas são filiformes, enquanto que, em *Lu. cruzi* duas cerdas são semifoliáceas e duas filiformes.

Dessa forma, em áreas que as duas espécies ocorrem em simpatria a identificação específica das fêmeas não pode ser realizada, fato esse que prejudica o reconhecimento do provável vetor nesses locais.

Como se pode observar, as duas espécies vetoras apresentam grande importância na saúde pública brasileira e, principalmente, devido à ampla distribuição de *Lu. longipalpis* em diversas regiões do Brasil, pois ambos os vetores são transmissores de *Le. infantum chagasi*. Devido à grande similaridade morfológica entre as duas espécies e da grande diversidade de bioma que *Lu. longipalpis* está presente, faz-se necessário à aplicação de novas ferramentas para identificar diferenças populacionais e interespecíficas.

1.6. Morfometria

A morfometria é um estudo estatístico da variação da forma em relação a fatores causais (Bookstein, 1991). Essa técnica além de quantificar as formas

biológicas intervêm sobre causas que levam às diferenças intra e interespecíficas, sendo amplamente utilizada para identificação de diferentes organismos (Monteiro & Reis, 1999; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012).

1.7. Morfometria linear/ clássica e morfometria geométrica

A morfometria linear/ clássica é um conjunto de metodologias na área da estatística que emprega medidas lineares como comprimentos, larguras, ângulos ou proporções calculadas ou adotadas a partir de estruturas ou partes de organismos (Rohlf & Marcus, 1993; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012). A morfometria geométrica (análise estatística da forma) é um conjunto de métodos de aquisição, processamento e análise de variáveis de forma que preserva toda a informação geométrica contida nos dados originais (Slice 2005), e baseia-se em coordenadas cartesianas denominadas de marcos anatômicos (*landmarks*). Essas coordenadas conservam toda a informação geométrica entre um conjunto de pontos (Rohlf, 1990; Rohlf & Marcus, 1993; Monteiro & Reis, 1999; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012).

Na morfometria geométrica o tamanho trabalhado é denominado de centroide, que é a raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado entre cada marco anatômico e o mesmo (Bookstein, 1991; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012). Neste sentido a morfometria geométrica trabalha com duas variáveis principais: forma (todas as propriedades de uma configuração de pontos que não se alteram por efeitos do tamanho, posição e orientação) e tamanho (centróide). Assim, a conformação observada, para uma determinada estrutura, é igual à soma entre forma e tamanho do centróide. Desta forma, a morfometria geométrica permite a separação entre tamanho e forma (Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012).

Sendo assim, o uso da morfometria geométrica se torna uma excelente ferramenta para análise de dados morfométricos, visto que proporciona maior gama de avaliação dos dados obtidos de uma configuração de marcos anatômicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar populações de *Lu. longipalpis* tendo em vista diferentes biomas e comparar com população de *Lu. cruzi* através da morfometria geométrica de asas.

2.2. Objetivos específicos

Analisar através de morfometria geométrica as diferenças das asas de diversas populações de *Lu. longipalpis* de diferentes biomas.

Comparar as populações de *Lu. longipalpis* com *Lu. cruzi* utilizando a morfometria geométrica de asas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedência das espécies

Os espécimes de *Lu. longipalpis* oriundos dos municípios de Floriano – Piauí (PI) - 46 espécimes, Sobral – Ceará (CE) – 36 espécimes e de *Lu. cruzi*, de Corumbá – Mato Grosso do Sul (MS) – 49 espécimes, foram coletados com armadilha CDC (modelo HP) em seus respectivos biomas: Caatinga nos municípios de Floriano e Sobral e pantanal no município de Corumbá. Posterior a coleta foram processados para montagem no Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Além disso, foram utilizados os espécimes de *Lu. longipalpis* da coleção da Faculdade de Saúde Pública – USP das localidades: Serra da Bodoquena, que possui biomas de pantanal e cerrado no Mato Grosso do Sul (MS) – 69 espécimes, e Mariápolis com bioma de Mata Atlântica em São Paulo (SP) – 30 espécimes (Figura 10).

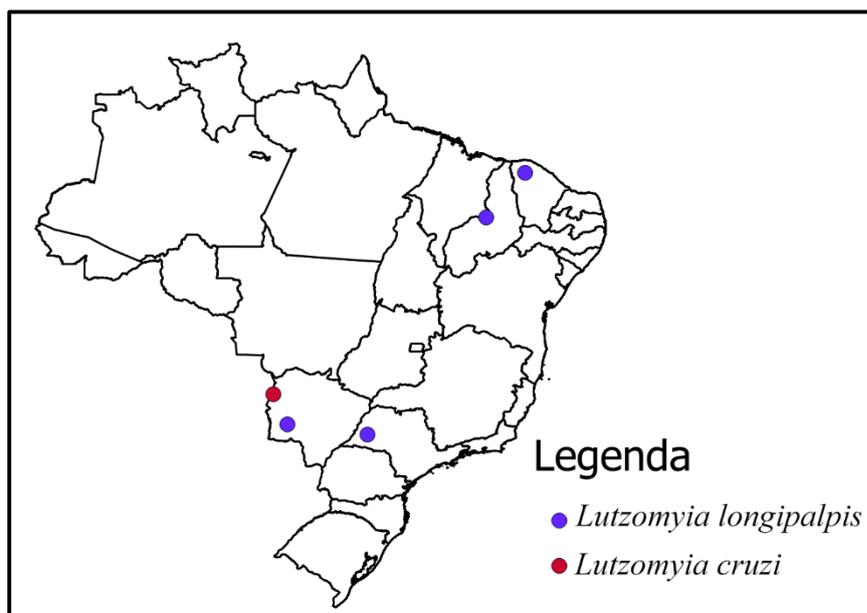


Figura 10: Mapa das localizações dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, utilizados no estudo.

3.2. Processamento para montagem

Os insetos capturados em armadilhas luminosas foram triados e os machos de *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* separados e fixados em álcool 70% em tubos Falcon identificados com o local da captura, a data e a identificação da espécie.

Para estes procedimentos foram utilizados os seguintes métodos propostos por Forattini (1973), onde: em capela de exaustão de gases (Q216-11 e Q216-21 Marca Quimis®), os flebotomíneos foram colocados em placas de toque de 9 poços, onde estes foram primeiramente colocados por 12 horas em solução de hidróxido de potássio 15% para amolecer a quitina, depois lavados em solução de ácido acético 10%, posteriormente colocados de 5 a 10 minutos em ácido acético P.A., mais 1 a 3 gotas de fucsina ácida em concentração de 1%, para corar os espécimes; posteriormente, foram submetidos a uma série alcoólica utilizando-se as seguintes concentrações, 70%, 90%, 95% e 100%; por último, os espécimes foram conservados em eugenol por no mínimo 3 horas, antes da montagem.

Após o processo de clarificação os espécimes foram montados, entre lâmina e lamínula, usando o enecê (NC) como meio montagem (Cerqueira, 1943).

3.3. Morfometria geométrica

As medições das estruturas foram realizadas utilizando o programa ZEN 2012 (Zeiss®, 2012), através de imagens capturadas com microscópio óptico (Primo Star Marca Zeiss®) acoplado a câmera AxioCam ICc1. As fotos para morfometria geométrica foram feitas utilizando o aumento de 4x. Foram utilizados 49 machos de *Lu. cruzi* e 181 machos de *Lu. longipalpis*, perfazendo um total de 230 asas analisadas, localizadas do lado direito do inseto.

A análise da morfometria geométrica foi realizada considerando 13 marcos anatômicos (*landmarks*) (Tabela II e Figura 10) para a determinação da conformação das asas, sendo 12 do tipo I (encontro entre dois tecidos) e 1 do tipo II (característica pontual) segundo as considerações de Bookstein (1991).

Na Tabela II relacionam-se os 13 marcos anatômicos marcados nas posições da asa:

Tabela II: Relação dos 13 marcos anatômicos nas asas.

Marcos	Ápices, bifurcações e base
1	bifurcação R2+3+4
2	bifurcação R2+3
3	R1
4	R2
5	R3
6	R4
7	R5
8	M1
9	M2
10	M3
11	M4
12	bifurcação de M1+2
13	base de R5

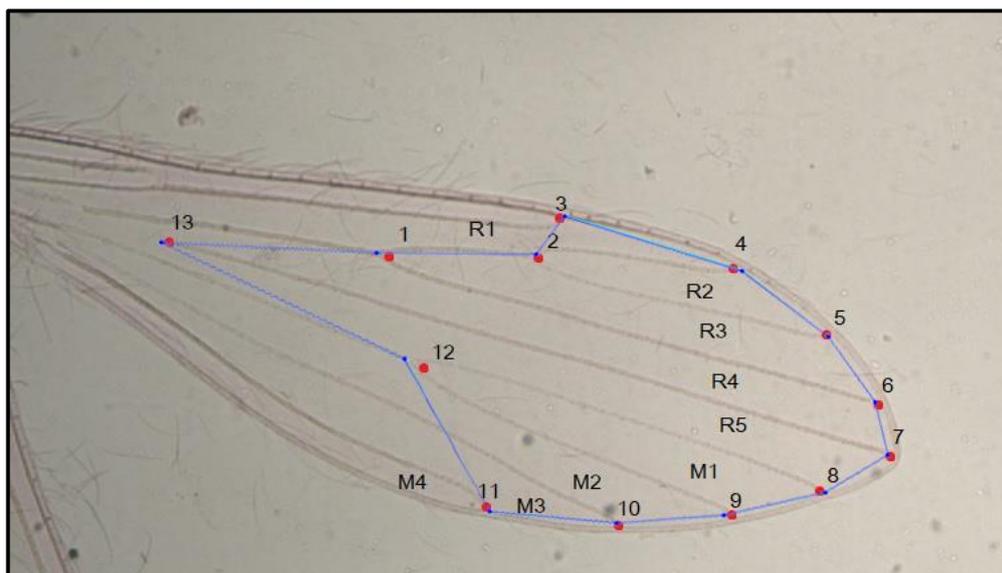


Figura 11: Localização dos 13 marcos anatômicos, utilizados para avaliar a conformação das asas de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*.

Todas as imagens foram identificadas com o nome da espécie e um número para registro do material para facilitar a posterior identificação nos processos de análise da morfometria. As fotos foram catalogadas em ordem alfabética em uma mesma pasta e com o auxílio do programa TpsUtil, versão 1.47 (Rohlf, 2010b). Foi criado um arquivo de texto com a lista das fotos ordenadas por nome e numeração, para ser utilizado no programa TpsDig versão 2.16 (Rohlf, 2010a). Usando o TpsDig 2.16 (Rohlf, 2010a) foram marcados os 13 marcos anatômicos dos 230 espécimes (2 espécies) gerando um arquivo com as coordenadas cartesianas que foram utilizadas posteriormente para analisar aspectos da geometria da asa e identificar as espécies.

Foi realizada primeiramente a Análise Generalizada de Procrustes (AGP), que consiste na otimização via método de quadrados mínimos para parâmetros de translação e rotação (Adams *et al.*, 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012), onde as formas passam por 3 passos: (1) Translação, onde os centroides são centralizados na origem, (2) Proporcionalização, transformando o tamanho de centroide para escala de 1 em todas as formas e (3) Rotação, onde os pontos homólogos são rotacionados para obter a menor distância entre as formas. A AGP tem como objetivo remover os efeitos de

posição e tamanho. Assim, obtemos uma variável de tamanho, o tamanho de centroide (centro de massa da forma) e variáveis de forma, os resíduos de sobreposição.

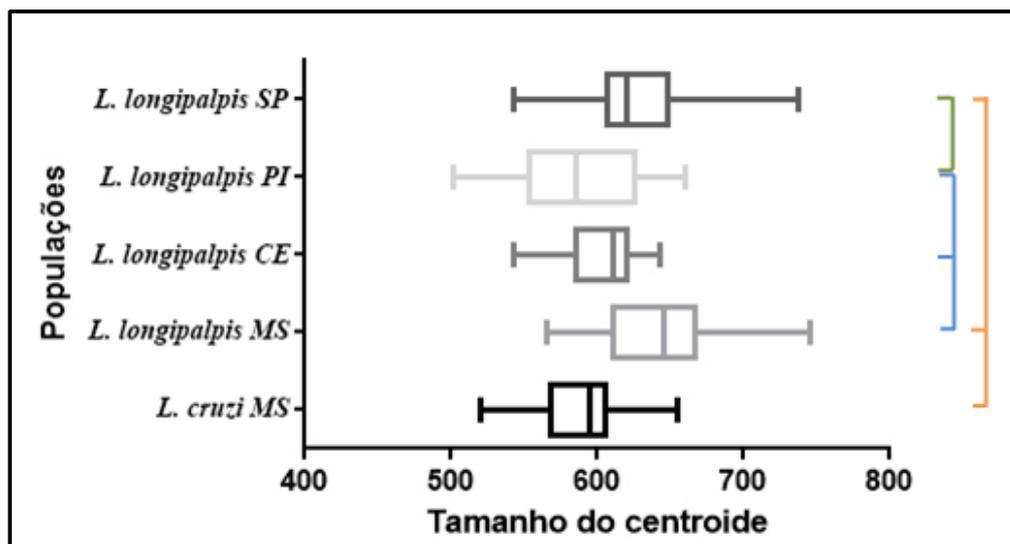
Após a AGP foi realizada, uma análise exploratória utilizando Análise dos Componentes Principais (PCA) sobre as variáveis de forma, para identificação dos pontos de maior variação, depois realizamos uma ANOVA de procrustes que testa a diferença de tamanho (ANOVA sobre tamanho de centroide) e a diferença de forma (ANOVA sobre as distâncias de procrustes – métrica de diferença entre as formas no espaço de formas), confirmada a significância das diferenças fizemos também Análises Classificatórias usando Análise das Variáveis Canônicas (CVA) (comparação entre n grupos) e comparações pareadas utilizando Funções Discriminantes (FD), para identificar os agrupamentos e quantificar a magnitude da diferença entre as formas por distâncias de Mahalanobis, distância entre as formas médias de cada grupo após a discriminação das espécies, e pelas porcentagens de classificação correta.

Para avaliar a diferença entre os pares de espécies foi utilizada a análise discriminante com 1.000 testes de permutação, para medir a acurácia do teste. Para identificar se a diferenciação das espécies foi significativa foram realizados os testes de t^2 , que testa a igualdade dos vetores médios das populações multivariadas, e a significância das distâncias de Mahalanobis e de Procrustes após os testes de permutação. A análise Generalizada de Procrustes (AGP), de Componentes Principais (PCA), Variáveis Canônicas (CVA) e Distância de Mahalanobis foram realizadas utilizando-se o programa MorphoJ versão 1.04b (Klingenberg, 2011). Os dados referentes ao tamanho do centroide foram exportados do MorphoJ e analisados utilizando análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey no programa Graphpad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

Os seguintes resultados foram obtidos para o tamanho do centroide, sendo $F = 22,63$ e com valor de $p < 0,0001$. Para a conformação o resultado foi de $F = 7,17$ e com valor de $p < 0,0001$. Na análise do tamanho do centroide, com a utilização de 13 marcos anatômicos das asas foi observado

que os espécimes de *Lu. longipalpis* dos Estados do Mato Grosso do Sul, Ceará e Piauí apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,0001$). Os espécimes de *Lu. longipalpis* dos Estados do Piauí e São Paulo, também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0002$). Analisando os espécimes de *Lu. cruzi* do Estado do Mato Grosso do Sul, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,0001$) quando comparado aos espécimes de *Lu. longipalpis* dos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo (Figura 11).



Legenda:

- *Lutzomyia longipalpis* PI \neq MS e MS \neq CE $p < 0,0001$
- *Lutzomyia longipalpis* SP \neq PI $p < 0,0002$
- *Lutzomyia longipalpis* SP e MS \neq *Lutzomyia cruzi* MS $p < 0,0001$

Figura 12: Gráfico de box-plot mostrando o resultado do ANOVA (pós-teste de Tukey) do tamanho dos centróides entre as populações de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Cada Box-plot mostra os tamanhos mínimos e máximos e primeiro, segundo (mediana) e terceiro quartis para cada população avaliada.

Considerando os resultados dos componentes principais (Figura 12A), foi observado que os componentes 1 e 2 mostraram mais de 41% da variação presente na conformação das asas. No componente principal 1 (variação de 25,1%), apresenta variação entre as asas de *Lu. longipalpis* do Piauí e Mato Grosso do Sul (Figura 12B), já no componente principal 2 (variação 16,6%), a variação se mostrou nas asas de *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul (Figura 12C).

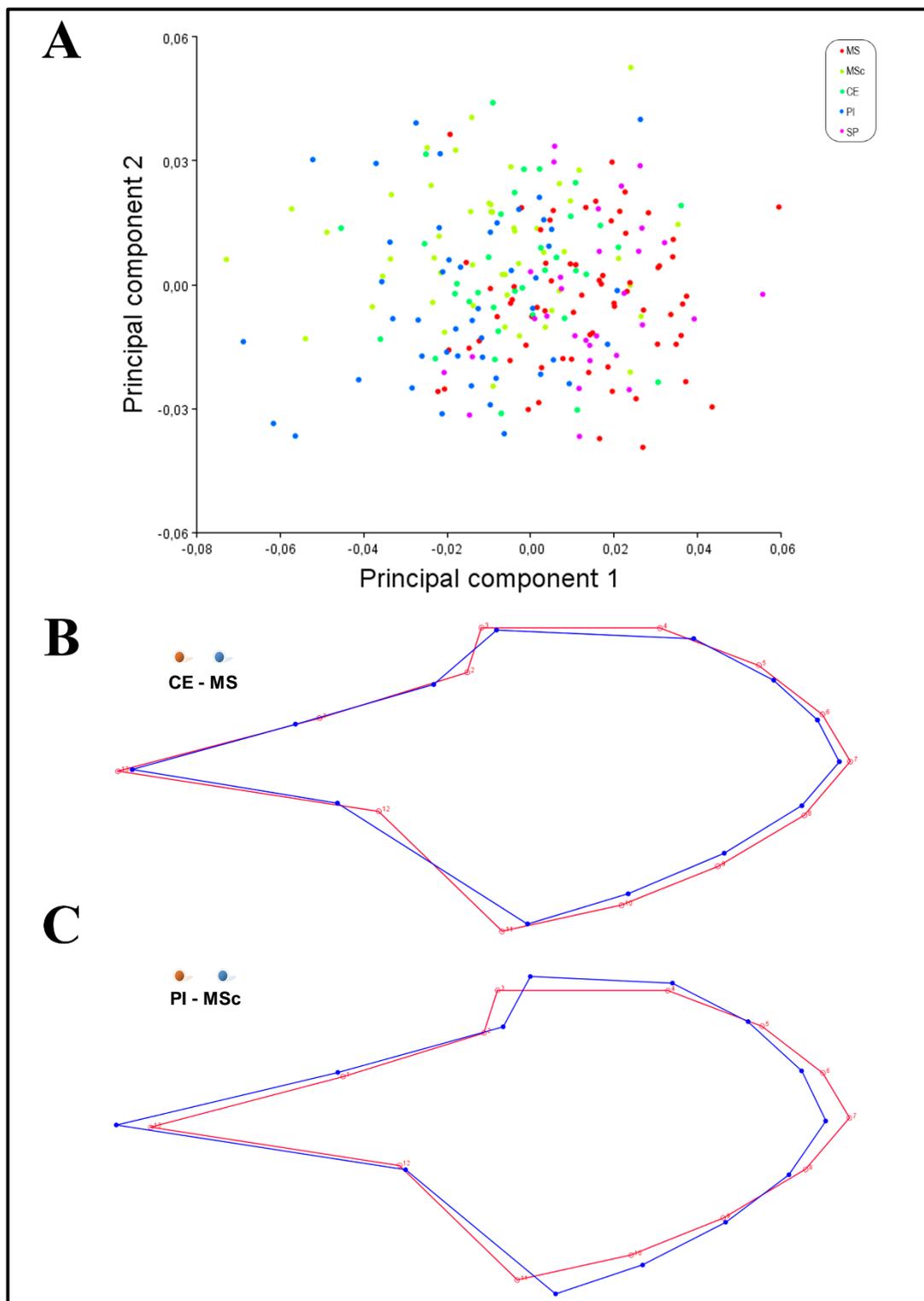


Figura 13: A. Componentes principais. B. Variação entre as asas de *Lutzomyia longipalpis* do Ceará (em vermelho) e Mato Grosso do Sul (em azul). C. Variação entre as asas de *Lutzomyia longipalpis* do Piauí (em vermelho) e *Lutzomyia cruzi* do Mato Grosso do Sul (em azul).

Lutzomyia longipalpis: MS = Mato Grosso do Sul, CE = Ceará, PI = Piauí e SP = São Paulo; *Lutzomyia cruzi*: MSc = Mato Grosso do Sul

Nos resultados das variáveis canônicas (Figura 13) observaram-se que as variáveis de 1 e 2 apresentaram mais de 73% das variações, onde a variável 1 (variação 51,8%) apresenta a separação dos espécimes de *Lu. longipalpis* do Piauí em relação a Mato Grosso do Sul e São Paulo, além da separação dos espécimes de *Lu. longipalpis* de Ceará e São Paulo, na variável 2 (variação 21,3%) foi apresentado a diferenciação de *Lu. longipalpis* do Ceará com *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul (Figura 13).

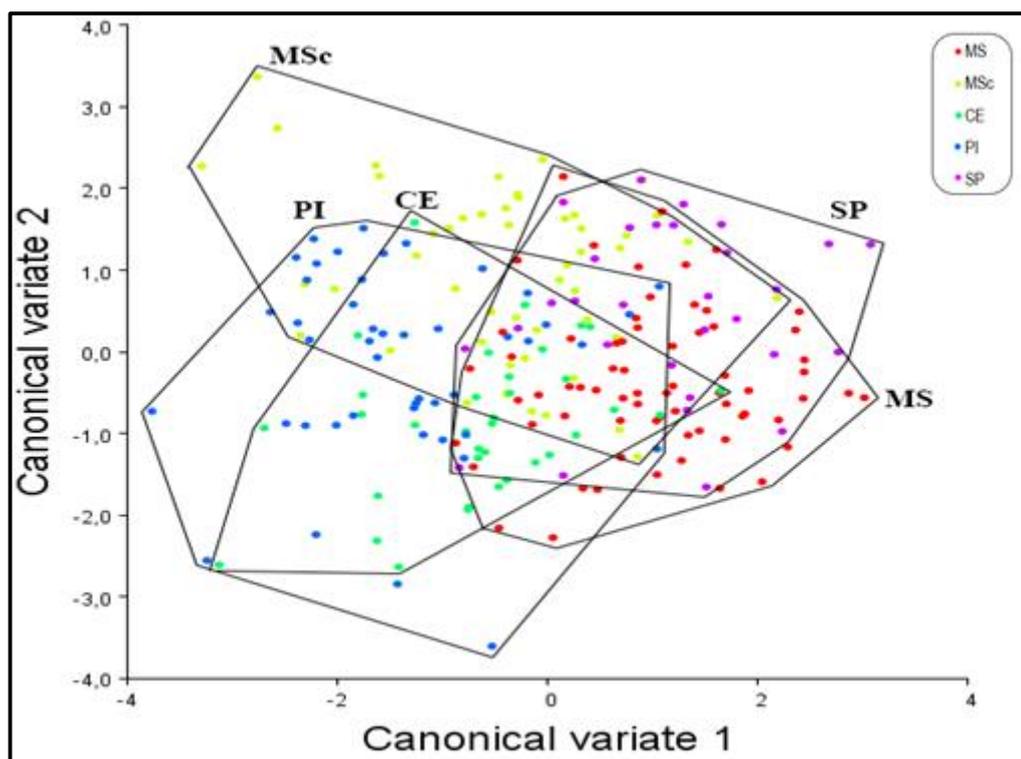


Figura 14: Variáveis canônicas, apresentam mais de 73% das variáveis. Separação do universo dos espécimes. *Lutzomyia longipalpis*: MS = Mato Grosso do Sul, CE = Ceará, PI = Piauí e SP = São Paulo; *Lutzomyia cruzi*: MSc = Mato Grosso do Sul

Quanto à distância de Mahalanobis, as espécies mais distantes entre si, no que diz respeito às formas das asas, são: *Lu. longipalpis* de São Paulo com os de Ceará (2,6186) e Piauí (2,7595); *Lu. longipalpis* de Piauí com Mato Grosso do Sul (2,5283). Os que mostram a menor distância são: *Lu. longipalpis* de São Paulo em relação ao Mato Grosso do Sul (1,5162); *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul com *Lu. longipalpis* do Ceará (1,9868) e Piauí (1,9998). A Tabela III apresenta a classificação correta e a validação cruzada.

Tabela III: Classificação correta das comparações entre as populações de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* estudadas.

Populações	Classificação correta	Validação cruzada
<i>Lu. longipalpis</i> - MS/ <i>Lu. cruzi</i> - MS	84,8%	75,4%
<i>Lu. longipalpis</i> - MS/ <i>Lu. longipalpis</i> - CE	85,6%	75,0%
<i>Lu. longipalpis</i> - MS/ <i>Lu. longipalpis</i> - PI	90,4%	84,4%
<i>Lu. longipalpis</i> - MS/ <i>Lu. longipalpis</i> - SP	76,8%	67,7%
<i>Lu. cruzi</i> - MS/ <i>Lu. longipalpis</i> - CE	86,9%	76,2%
<i>Lu. cruzi</i> - MS/ <i>Lu. longipalpis</i> - PI	86,3%	73,7%
<i>Lu. cruzi</i> - MS/ <i>Lu. longipalpis</i> - SP	82,3%	70,9%
<i>Lu. longipalpis</i> - CE/ <i>Lu. longipalpis</i> - PI	85,2%	72,8%
<i>Lu. longipalpis</i> - CE/ <i>Lu. longipalpis</i> - SP	90,8%	76,9%
<i>Lu. longipalpis</i> - PI/ <i>Lu. longipalpis</i> - SP	92,1%	77,6%

A análise da forma das asas mostrou que as populações que tiveram maior classificação correta dos seus espécimes foram: *Lu. longipalpis* do Piauí com São Paulo (92,1%); *Lu. longipalpis* do Ceará com São Paulo (90,8%) e *Lu. longipalpis* do Mato Grosso do Sul em relação ao do Piauí (90,4%). Quando comparamos as populações de *Lu. longipalpis* com *Lu. cruzi*, apresentam as seguintes melhores classificações: *Lu. cruzi* com *Lu. longipalpis* do Ceará (86,9%); *Lu. cruzi* com *Lu. longipalpis* do Piauí (86,3%) e *Lu. longipalpis* com *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul (84,8%).

Na validação cruzada, utilizada para avaliar os resultados, mostrou que respectivamente os espécimes de: *Lu. longipalpis* do Mato Grosso do Sul em relação ao do Piauí, 15,6% dos espécimes tiveram sua classificação errada; *Lu. longipalpis* do Piauí com São Paulo, 22,4% dos espécimes apresentaram sua classificação errada; *Lu. longipalpis* do Ceará com São Paulo, 23,1% dos espécimes tiveram sua classificação errada. Nos espécimes de *Lu. cruzi*, a validação cruzada mostrou que respectivamente: *Lu. cruzi* com *Lu. longipalpis* do Ceará, apresentaram que 23,8% dos espécimes se classificaram incorretamente; *Lu. longipalpis* com *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul, houve 24,6% dos espécimes se classificaram erroneamente; *Lu. cruzi* com *Lu. longipalpis* do Piauí, 26,3% dos espécimes se classificaram errados. Pode-se observar nas seguintes Figuras 14, 15 e 16 a comparação das asas por espécies em relação ao estado. Mostrando que as principais diferenças estão

nos pontos 2 ao 4 entre as populações de: MS-MSc, MS-PI, MSc-PI, MSc-SP, CE-PI, CE-SP e PI-SP; como também nos seguintes pontos nas respectivas populações: PI-SP dos pontos 6 ao 7 e 11 ao 13; CE-SP dos pontos 9 ao 13; MSc-CE dos pontos 10 ao 11; MS-PI e MSc-PI dos pontos 11 ao 12; MSc-SP dos pontos 12 ao 13.

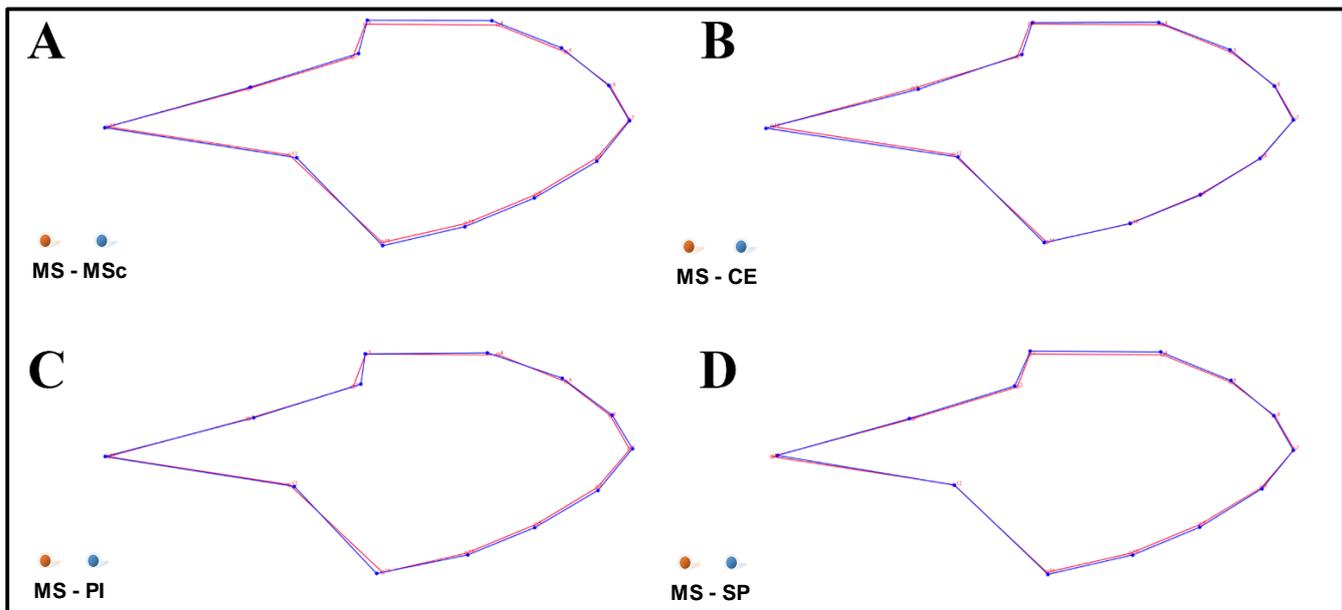


Figura 15: Morfometria geométrica das asas. Comparação da conformação das asas dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* do Mato Grosso do Sul (em vermelho) em relação aos espécimes de *Lutzomyia cruzi* do mesmo estado (em azul), e *Lutzomyia longipalpis* dos estados do Ceará, Piauí e São Paulo (em azul).

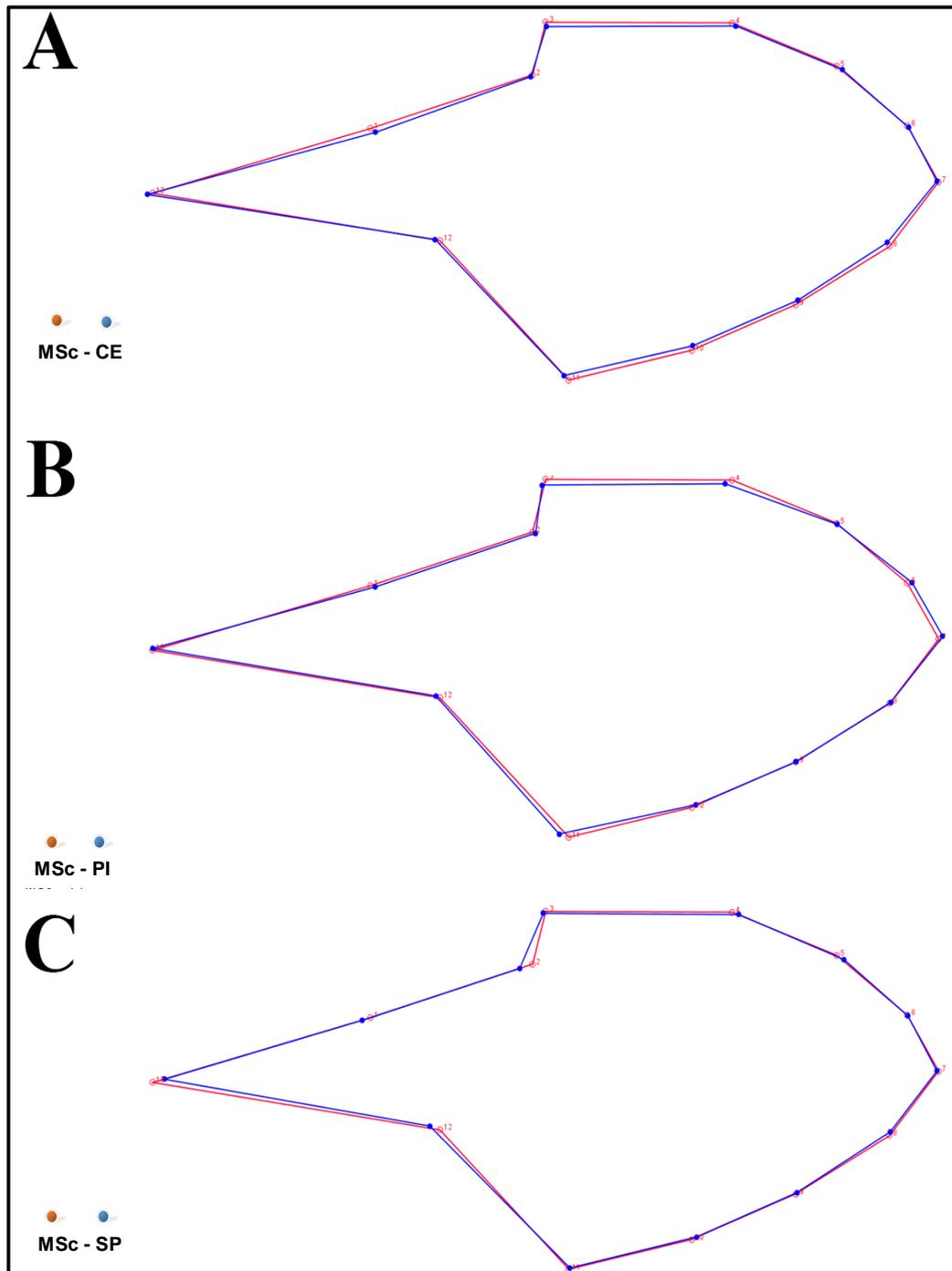


Figura 16: Morfometria geométrica das asas. Comparação da conformação das asas dos espécimes de *Lutzomyia cruzi* do Mato Grosso do Sul (em vermelho) em relação aos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* dos estados do Ceará, Piauí e São Paulo (em azul).

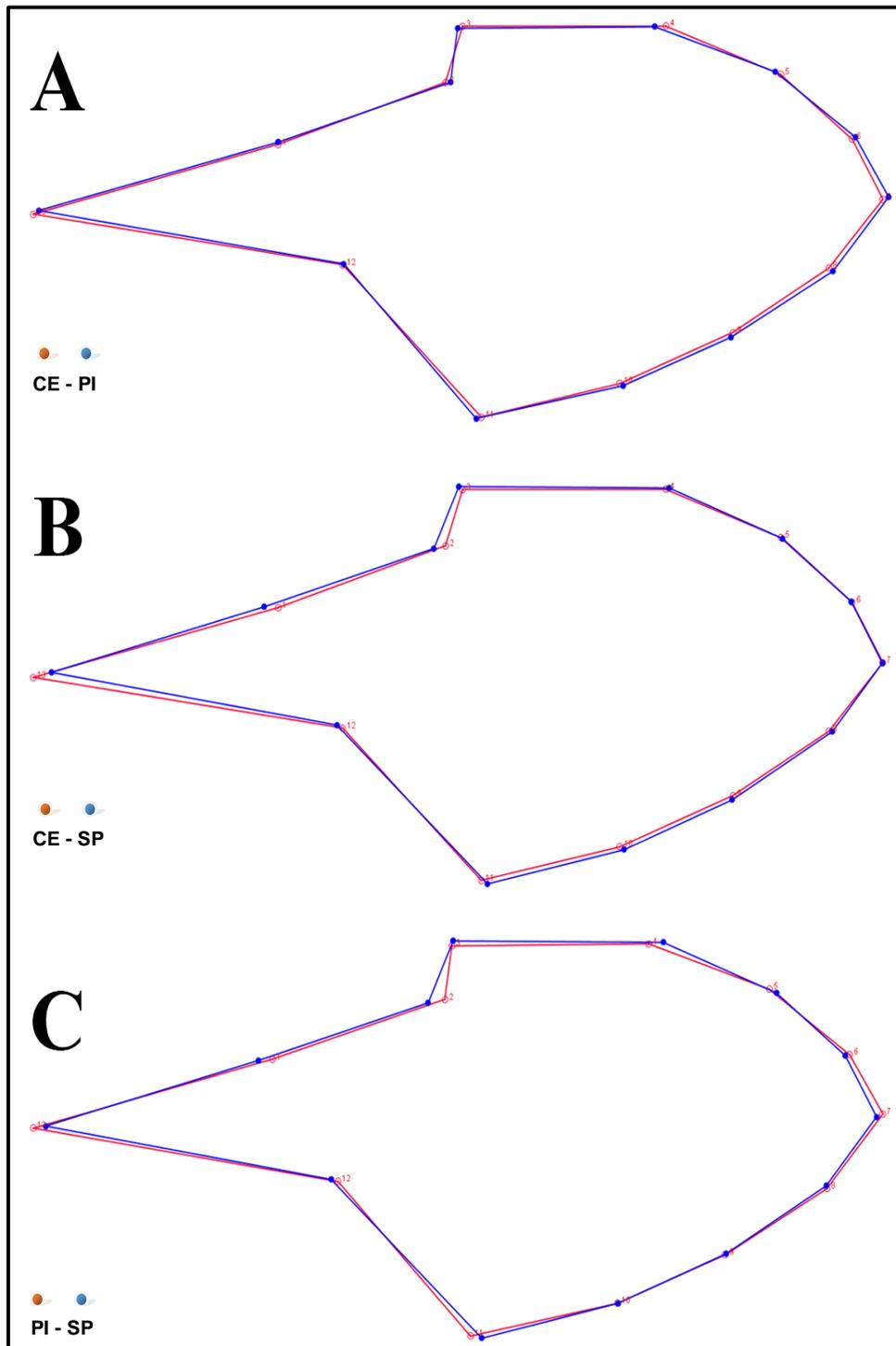


Figura 17: Morfometria geométrica das asas. Comparação da conformação das asas dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* do Ceará (em vermelho) em relação aos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* dos estados do Piauí e São Paulo (A e B, em azul). Comparação da conformação das asas dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* do Piauí (em vermelho) em relação aos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* de São Paulo (C, em azul).

5. DISCUSSÃO

Foi evidenciada diferença morfológica entre às populações *Lu. longipalpis* por Mangabeira (1969) em território brasileiro, baseando-se no número de manchas pálidas nos tergitos abdominais nos machos. Algumas populações têm um par de manchas no quarto tergito, sendo que esse fenótipo de um par se chama 1S. Enquanto que, outras populações apresentam dois pares de manchas no terceiro e quarto tergitos, onde esse fenótipo de duas manchas chama-se 2S.

Em algumas populações, existem também fenótipos nos quais o tamanho da mancha no terceiro tergito mostra uma variação considerável, sendo essas formas chamadas de intermediárias (INS) (Spiegel *et al.*, 2016). No entanto, um estudo de análise genética utilizando o gene *per*, comprovou uma estruturação geograficamente moderada entre as populações de *Lu. longipalpis*, e com variabilidade significativa entre os fenótipos 1S e 2S, nota-se que tal resultado demonstra a importância do gene *per* como um importante marcador para as populações de *Lu. longipalpis* (Lima Costa *et al.*, 2015).

Em análise de microscopia eletrônica de varredura dos tergitos de *Lu. longipalpis* demonstrou que na região das manchas eram compostas por numerosas pápulas cuticulares com poros centrais apenas nos tergitos com manchas pálidas, levando os autores a sugerir que sejam locais de liberação de feromônio (Lane & Ward, 1984; Lane *et al.*, 1985; Morton & Ward, 1989). No município de Sobral (CE) foram encontrados *Lu. longipalpis* de 1S, 2S e INS, sendo que 1S e INS apresentaram respectivamente, o feromônio 9-metilgermacreno-B (9MGB+) e o 2S apresentou o feromônio cembreno-1 (CEMB-1) (Spiegel *et al.*, 2016). Ressalta-se que em estudo realizado anteriormente, comprovou-se que machos de *Lu. cruzi* produzem feromônio 9MGB+ (Brazil & Hamilton, 2002).

No estudo De la Riva (2001) observou que a presença de manchas nos tergitos 3 e/ ou 4, não apresentou correlação com as diferenças encontradas na conformação das asas. Além disso o autor notou que a geometria das asas de machos de *Lu. longipalpis* originários da Bolívia e Nicarágua não

apresentaram grandes subdivisões geográficas, como é frequente quando analisa-se a variação morfométrica.

Através da técnica de morfometria geométrica, aplicada no atual estudo, foram notórias as diferenças nas asas das populações. Ao analisar as asas das espécies de *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul em comparação com as espécies de *Lu. longipalpis* do mesmo estado, no que se diz respeito ao tamanho do centroide observa-se o $p < 0,0001$ e a distância de Mahalanobis de 2,0580. Outros estudos não conseguiram separar as espécies irmãs que estão dentro do mesmo grupo das espécies aqui trabalhadas (Giordani *et al.*, 2017). Também não foram encontradas diferenças consideráveis entre *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul, utilizando análise discriminante através de dados de morfometria linear. (Santos *et al.*, 2015).

Em estudos realizados no estado de Mato Grosso, foram observadas maiores densidades da espécie de *Lu. longipalpis* em região de cerrado (Missawa *et al.*, 2006). Entretanto, a presença de *Lu. cruzi* foi notada em área de pantanal e cerrado, estando de acordo com outros trabalhos, sugerindo o cerrado, o ambiente preferencial da espécie (Missawa *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2002). O fato das espécies de *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* estarem em diversos biomas do estado do Mato Grosso, tendo vasta distribuição, as espécies apresentam hábitos ecléticos e adaptação a diferentes habitats (Missawa *et al.*, 2006; Aguiar *et al.*, 2003). Reiterando que *Lu. longipalpis* tem uma distribuição ampla e irregular desde o sul do México até a Argentina, incidindo em diversas condições ecológicas, como habitats secos e florestas úmidas (Spiegel *et al.*, 2016), o que mostra que essa espécie apresenta grande capacidade de adaptação.

No presente estudo realizado as populações que mostraram as maiores classificações corretas foram respectivamente: *Lu. longipalpis* do Piauí com São Paulo; *Lu. longipalpis* do Ceará com São Paulo e *Lu. longipalpis* do Mato Grosso do Sul em relação ao do Piauí. Ocorrência que pode estar diretamente ligada às mudanças morfológicas em razão da adaptação ao ambiente, tendo visto que as mais altas taxas de classificação correta se dão entre populações que habitam biomas distintos, exemplo, o caso de São Paulo na região de Mata Atlântica, e Piauí nos biomas de cerrado/caatinga.

De la Riva e colaboradores (2001) analisando as espécies de *Lu. longipalpis* de populações da Bolívia e da Nicaraguá, não observaram diferenças significativas quando comparando o tamanho das asas dessas populações e a altitude. Entretanto, através da análise da conformação observaram que as populações se dividiram em dois grupos, havendo um grupo com importância vetorial e o outro não, sendo essa separação baseada em dados epidemiológicos anteriores. Levando tais dados em consideração, os autores recomendaram que as diferenças na conformação das asas estivessem mais diretamente relacionadas a um traço genético do que a diferenças ambientais.

A aplicação da morfometria geométrica colabora, juntamente com outras técnicas, tais como, estudos genéticos, história geológica (Uribe, 1999; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008), estudos hormonais (feromônios) (Spiegel *et al.*, 2016) e a microscopia eletrônica, com o propósito de identificar diferenças entre espécies através da anatomia dos flebotomíneos. A morfometria geométrica é uma ferramenta pouco utilizada em trabalhos e ainda pouco explorada, mas pode-se considerar que é uma ferramenta adicional e importante para futuros estudos, mesmo que aqui a diferenciação entre as populações não tenha alcançado valores altos.

6. CONCLUSÃO

Através da morfometria geométrica com base nos 13 marcos anatômicos foi possível analisar as asas de diferentes populações de *Lu. longipalpis* de diferentes biomas, e comparar com a população específica de *Lu. cruzi*.

Foram observadas diferenças no tamanho do centroide entre as populações de *Lu. longipalpis* do Mato Grosso do Sul e São Paulo em relação à *Lu. cruzi* do Mato Grosso do Sul.

As populações de *Lu. longipalpis* dos Estados Piauí com Mato Grosso do Sul e São Paulo, e Ceará com Mato Grosso do Sul, apresentaram diferenças no tamanho do centroide.

Foram observadas nas distâncias de Mahalanobis que as diferenças da forma das asas foram maiores entre *Lu. longipalpis* do Estado de São Paulo e do Estado de Ceará (2,6186) e do Estado de Piauí (2,7595) e, também, entre o Estado do Piauí com do Estado do Mato Grosso do Sul (2,5283).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.C.; ROHLF, F.J.; SLICE, D.E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. **Italian Journal of Zoology**, 71:5-16. 2004.

AGUIAR GM, MEDEIROS, WM. Distribuição e habitats. In: RANGEL EF, LAINSON R (orgs) Flebotomíneos do Brasil. **Editora da Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, p.207-255, 2003.

AKHOUNDI, M., DOWNING, T., VOTYPKA, J., KUHL, K., LUKES, J., CANNET, A., CHRISTOPHE RAVEL, PIERRE MARTY, PASCAL DELAUNAY, MOHAMED KASBARI, BRUNO GRANOUILLAC, LUIGI GRADONI, DENIS SERENO. (2017). *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. **Mol. Aspects Med.** 57, 1–29.

ALMEIDA, M. A. Z., Programa de Zoonoses Região Sul – **Manual de Zoonoses**. CRMV. Volume I – 1ª edição, 2009.

BARBOSA, MIRIAM NOGUEIRA, GUIMARÃES, ELIETE ALBANO DE AZEVEDO, & LUZ, ZÉLIA MARIA PROFETA DA. Avaliação de estratégia de organização de serviços de saúde para prevenção e controle da leishmaniose visceral. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 25(3), 563-574, 2016.

BASTOS, THIAGO SOUZA AZEREDO, LINHARES, GUIDO FONTGALLAND COELHO, & MADRID, DARLING MELANY DE CARVALHO. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS EM ÁREA URBANA. **Ciência Animal Brasileira**, 17(3), 395-401, 2016.

BOOKSTEIN FL. Morphometric Tools for *Landmark* Data: Geometry and Biology. **Cambridge University Press**; 1991.

BRASIL, Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Série A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 122p., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1. ed. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2014.

BRAZIL, R. P.; HAMILTON, J. G. C. Isolation and identification of 9-methylgermacene-B as the putative sex pheromone of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n. 3, p. 435-436, 2002.

CERQUEIRA NL. Um novo meio para montagem de pequenos insetos em lâmina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 1943 Aug;39(1):37-41.

COUTINHO-ABREU I, SONODA I, FONSECA J, MELO M, BALBINO V, RAMALHO-ORTIGÃO M. *Lutzomyia longipalpis* s.l. In Brazil and the impact of the Sao Francisco river in the speciation of this sand fly vector. **Parasit Vectors**. 2008; 1:37.

DE LA RIVA, J *et al.* Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 8, p. 1089-1094, Nov. 2001.

FORATTINI OP. Entomologia Médica, vol. 4. São Paulo: Ed. **Edgard Blucher & Ed. USP**; 1973.

FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: Jorge R. Marinho; Luiz U. Hepp; Rodrigo Fornel. (Org.). Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim. 1ed.Erechim: **EDIFAPES**, p. 101-120, 2012.

GIORDANI BF, ANDRADE AJ, GALATI EAB, GURGEL-GONÇALVES R. The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*. **Med. Vet. Entomol.** 2017; 4:373–80.

GRIMALDI JG, TESH RB, MCMAHON-PRATT D. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **The American Journal Tropical Medicine Hygiene** 41: 687-725, 1989.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.** 1990 Jan;4(1):1–24.

KLINGENBERG, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources**, 11, 353–357, 2011.

LAINSON R, SHAW JJ, SILVEIRA FT, BRAGA RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1987;81(3):517–517.

LANE R, PHILLIPS A, MOLYNEUX DH, PROCTER G, WARD RD: Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? **Ann Trop Med Parasitol** 1985, 79(2):225-229.

LANE R, WARD R: The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) **Cahiers-ORSTOM Série Entomol Méd Parasit** 1984, 22(3):245-24

LAVERAN, ALPHONSE. 'Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*, Laveran et Mesnil), parasite d'une fièvre de l'Inde'. Comp. **Rendum Academia de Sciencia**, no 137, pp. 957-62, 1903.

LEVINE ND, CORLISS JO, COX FEG, DEROUX G, GRAIN J, RONIGBERG BM, LIEEDALE GF, LEOEBLICH AR, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VÁVRA J, WALLACE FG. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**. 27: 37-58, 1980.

LIMA COSTA, C. R. *et al.* Genetic structurind and fixed polimorphism in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, p.193, 2015.

MANGABEIRA F. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* no Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 21, p. 3-26, 1969.

MISSAWA, NANCI AKEMI, & LIMA, GIOVANA BELEM MOREIRA. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(4), 337-340, 2006.

MISSAWA, NANCI AKEMI, VELOSO, MÁRCIA AURÉLIA ESSER, MACIEL, GIOVANA BELEM MOREIRA LIMA, MICHALSKY, ÉRIKA MONTEIRO, & DIAS, EDELBERTO SANTOS. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(1), 76-78 (2011).

MISSAWA, NANCI AKEMI; LIMA, GIOVANA BELEM MOREIRA. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 337-340, Aug. 2006.

MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. Princípios de Morfometria Geométrica. **Holos**, Ribeirão Preto. 1999.

MORTON IE, WARD RD: Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. **Med Vet Entomol** 1989, 3(3):219223.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png?u=1> . Acessado em: 27/03/2017

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acessado em: 06/08/2018

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/Leishmaniasis_vector_hr.jpg?ua=1>. Acessado em: 27/03/2017

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2014. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=es.>. Acesso em: 27/03/2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Informe Leishmaniasis Nº 1 – Abril de 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Informe Leishmaniose Nº 3 – Julho de 2015

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Informe Leishmaniose Nº 5 – Abril de 2017

RIBEIRO ALM, MISSAWA NA. Spatial distribution of phlebotomine species in the state of Mato Grosso, Brazil, in the period of 1996 to 2001. **Entomología y Vectores** 9: 33-34, 2002.

ROHLF, F. J. tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.16. Department of Ecology and Evolution, **State University of New York at Stony Brook**, 2010a.

ROHLF, F. J. tpsUtil, file utility program, version 1.47. Department of Ecology and Evolution, **State University of New York at Stony Brook**, 2010b.

ROHLF, F.J.; MARCUS, LF. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**, 8(4): 129-132. 1993.

SANTOS, M.F., ANDRADE FILHO, J.D., FERNANDES, C.E. *et al.* Morphometric analysis of *Longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex populations in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 52, 359–367, 2015.

SHERLOCK, I. A., 2003. Importância medico-veterinária. A importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, E. F. & LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro; **Editora da Fundação Oswaldo Cruz**, p.15-21, 2003.

SLICE, D.E. Modern Morphometrics em Slide, D.E. (ed) Modern Morphometrics in Physical Anthropology. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**. 1-45. 2005.

SPIEGEL CN, DIAS DBS, ARAKI AS, HAMILTON JGC, BRAZIL RP, JONES TM. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasit Vectors**. 2016; 9: 580.

URIBE S. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1999; 94:729–34.