

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

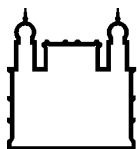
Mestrado em Biologia Parasitária

ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO COMPARATIVO
DE ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS
(DIPTERA:PSYCHODIDAE:PHLEBOTOMINAE) DOS GÊNEROS
NYSSOMYIA BARRETTO, 1962, *BICHROMOMYIA* ARTEMIEV,
1991 E *MIGONEMYIA* GALATI, 1995, VETORES DE
LEISHMÂNIAS DERMOTRÓPICAS, NO BRASIL

RODRIGO ESPÍNDOLA GODOY

Rio de Janeiro

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RODRIGO ESPÍNDOLA GODOY

ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO COMPARATIVO DE ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:PSYCHODIDAE:PHLEBOTOMINAE) DOS GÊNEROS *NYSSOMYIA* BARRETTO, 1962, *BICHROMOMYIA* ARTEMIEV, 1991 E *MIGONEMYIA* GALATI, 1995, VETORES DE LEISHMÂNIAS DERMOTRÓPICAS, NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Ferreira Rangel

RIO DE JANEIRO

2012

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RODRIGO ESPÍNDOLA GODOY

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO COMPARATIVO DE ESPÉCIES
DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:PSICHODIDAE:PHLEBOTOMINAE) DOS
GÊNEROS *NYSSOMYIA* BARRETTO, 1962, *BICHROMOMYIA* ARTEMIEV, 1991 E
MIGONEMYIA GALATI, 1995, VETORES DE LEISHMÂNIAS DERMOTRÓPICAS,
NO BRASIL**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Ferreira Rangel

Aprovada em: 30/11/2012

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil - Presidente
Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho
Prof. Dr. Monique de Albuquerque Motta
Prof. Dr. Jane Margaret Costa von Sydow
Prof. Dr. Suzete Araujo Oliveira Gomes

Rio de Janeiro, 30 de outubro de 2012

Dedicatória

Dedico a minha família pelo apoio, e aos mestres pelos grandes ensinamentos nesses dois anos, o que acredito ser o resultado mais importante que podemos obter nesta etapa da vida.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dra. Elizabeth Ferreira Rangel pela oportunidade dada a mim para realizar esse projeto, pelos ensinamentos e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço a Prof^a. Dra. Prof. Eunice Aparecida Bianchi Galati, da Faculdade de Saúde Pública – USP, por toda ajuda e suporte dados a mim nesse projeto, bem como a todos do seu laboratório por me receberem sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Andrey José de Andrade, da Faculdade de Saúde Pública – USP, pela grande ajuda em minhas idas a São Paulo, e também pelas excelentes sugestões e idéias compartilhadas.

Ao Prof. Fredy Galvis Ovallos, da Faculdade de Saúde Pública – USP, pela ajuda e grande paciência ao me auxiliar com o aprendizado de novas técnicas e me ajudar com o material de coleção.

Ao Prof. Dr. Pedro Cordeiro Estrela de Andrade Pinto, do Instituto Oswaldo Cruz, por me ensinar o que sei hoje de morfometria geométrica e pela ajuda com a análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero, do Instituto Oswaldo Cruz, por me ajudar com as análises estatísticas do projeto.

Ao Prof. Dr. Dalton de Souza Amorim, da Universidade de São Paulo, pela grande ajuda com a revisão do trabalho, pelo conhecimento passado a mim sobre sistemática filogenética e por me receber em seu laboratório, juntamente com todos os alunos e técnicos, de forma tão amistosa.

A Prof^a. Dra. Nataly de Souza, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – IOC, pela doação de espécimens de *Nyssomyia intermedia* utilizados no projeto.

Ao Prof. Thiago Vasconcelos dos Santos e equipe do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, Belém – Pará, pelas capturas de *Bichromomyia flaviscutellata*.

A Lindemberg Caranha de Souza e equipe da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará pelas capturas realizadas para obtenção de espécimes

As estudantes Margarete Martins dos Santos Afonso e Simone Miranda da Costa, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – IOC, pela ajuda com as capturas e obtenção de espécimes para o projeto.

A todos os integrantes do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Alfredo Carlos Rodrigues de Azevedo, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, pela revisão e sugestões feitas ao trabalho.

Ao financiamento recebido da CAPES e do Instituto Oswaldo Cruz, para a realização das atividades de campo e de laboratório.

À Dra. Jacenir Mallet, Chefe do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, e ao Apoio Laboratorial do pavilhão Carlos Chagas, Ester Lucia Gomes da Silva e Carla Moraes Saldanha, por todo o suporte dado durante a realização dos estudos.

A tecnóloga Adriana Zwetsch, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – IOC, pela grande ajuda em todos esses anos que estou no laboratório.

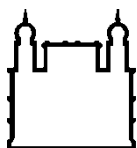
Ao técnico Antônio Luís Ferreira de Santana, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – IOC, por toda a ajuda prestada no laboratório.

A Juliana Monteiro Bastos da Silva pelo apoio e pela amizade.

A Mayara Garcia de Mattos Barbosa que sempre me apoiou e me deu forças para continuar, sempre ao meu lado em todos os momentos. Obrigado por tudo, juntos finalizamos mais essa etapa da vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

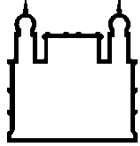
ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO COMPARATIVO DE ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:PSYCHODIDAE:PHLEBOTOMINAE) DOS GÊNEROS *NYSSOMYIA* BARRETTO, 1962, *BICHROMOMYIA* ARTEMIEV, 1991 E *MIGONEMYIA* GALATI, 1995, VETORES DE LEISHMÂNIAS DERMOTRÓPICAS, NO BRASIL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rodrigo Espíndola Godoy

Phlebotominae representa um dos grupos de insetos de grande importância médica, especialmente para o Brasil, estando associado à transmissão de agentes das leishmanioses tegumentar e visceral. A geração de conhecimentos sobre a morfologia e morfometria de ambos, machos e fêmeas de flebotomíneos vetores de leishmaniose tegumentar americana (LTA), poderão indicar estruturas diagnósticas importantes como subsídios para estudos filogenéticos que permitam avaliar a relação vetor-patógeno no processo de coevolução. Com isso o trabalho teve como objetivo analisar comparativamente as seguintes espécies de flebotomíneos: *Nyssomyia intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Migonemyia migonei* e *Bichromomyia flaviscutellata*, importantes vetores de *Leishmania* spp., causadores da LTA no Brasil. As análises morfométricas foram capazes de separar os gêneros. A análise comparativa dos flebotomíneos por morfometria geométrica e clássica, permitiu aprofundar a discussão sobre a posição taxonômica de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*, consideradas por alguns autores como espécies crípticas, onde houve diferença significativa em várias das estruturas analisadas, como no tamanho do centroide das asas e a razão entre os filamentos genitais e a ponta dos filamentos genitais. Através das análises de morfometria clássica e do tamanho dos centróides e as formas médias das asas, as espécies de *Nyssomyia* se apresentam mais próximas feneticamente de *Mg. migonei*, vetores de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, do que de *Bi. flaviscutellata*, vetora de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, o que também corrobora com a separação dos gêneros *Nyssomyia* e *Bichromomyia*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC STUDY OF PHLEBOTOMINE SPECIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) OF GENUS *NYSSOMYIA* BARRETTO, 1962, *BICHROMOMYIA* ARTEMIEV, 1991 AND *MIGONEMYIA* GALATI 1995, VECTORS OF DERMOTROPIC LEISHMANIA, IN BRASIL

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rodrigo Espíndola Godoy

Phlebotominae represents one group of insects of medical importance, especially in Brazil, being associated with the transmission of agents of cutaneous and visceral leishmaniasis. The generation of knowledge about the morphology and morphometry of both male and female sandfly vectors of American cutaneous leishmaniasis (ACL) may indicate structures as important diagnostic information for phylogenetic studies to assess the relationship of vector-pathogen coevolution. In this aspect the work was to analyze comparatively the following species of sandflies: *Nyssomyia intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Migonemyia migonei* and *Bichromomyia flaviscutellata*, important vectors of *Leishmania spp.*, causing leishmaniasis in Brazil. The morphometric analyzes were able to separate the genders. The comparative analysis of sandflies by classical and geometric morphometry allowed us to discuss about the taxonomic position of *Ny. intermedia* and *Ny. neivai*, considered by some authors as cryptic species, where significant differences were observed in several structures analyzed as the centroid size of the wings and the ratio between the genital filaments and the tip of the genital filaments. The classical morphometric analysis, size of the centroids of the wings as well as the mean forms of the wings showed *Nyssomyia* closest phenetically to *Mg. migonei*, vectors of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, than *Bi. flaviscutellata*, vector of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, these results also corroborate with the separation of the genders *Nyssomyia* and *Bichromomyia*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E ANEXOS.....	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIACÕES	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. AS LEISHMANIOSES	1
1.1.1 Características Gerais	1
1.1.2 Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil	3
1.1.3 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil	5
1.1.3.1 Ciclos de Transmissão	7
1.1.3.1.1 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> Vianna, 1911	7
1.1.3.1.2 <i>Leishmania (Leishmania) guyanensis</i> Floch, 1954	7
1.1.3.1.3 <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972	8
1.1.3.1.4 <i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i> Silveira et al., 2002	8
1.1.3.1.5 <i>Leishmania (V.) lainsoni</i> Silveira et al., 1987, <i>Leishmania (V.) naiffi</i> Lainson & Shaw, 1989 e <i>Leishmania (V.) shawi</i> Lainson et al., 1989.....	9
1.2 VETORES	9
1.2.1 Características Gerais	9
1.2.2 Taxonomia.....	11
1.2.3 Coevolução <i>Leishmania</i> -Phlebotominae	13
1.2.4 Interação <i>Leishmania</i> - Phlebotominae	15
1.2.5 Principais Vetores de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> no Brasil.....	15
1.2.5.1 <i>Psychodopygus wellcomei</i> Fraiha, Shaw & Lainson, 1971	15
1.2.5.2 <i>Nyssomyia whitmani</i> Antunes & Coutinho, 1939.....	16
1.2.5.3 <i>Nyssomyia intermedia</i> Lutz & Neiva, 1912.....	17
1.2.5.4 <i>Nyssomyia neivai</i> Pinto, 1926.....	18
1.2.5.5 <i>Migonemyia migonei</i> França, 1920	19
1.2.6 <i>Bichromomyia flaviscutellata</i> Mangabeira, 1942.....	20
1.3 JUSTIFICATIVA.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 NOMENCLATURA TAXONÔMICA	24

3.2 CAPTURAS DE FLEBOTOMÍNEOS	24
3.2.1 Procedência das espécies capturadas.....	24
3.3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	25
3.3.1 Clarificação e Diafanização	25
3.3.2 Montagem.....	26
3.4 MATERIAL DE COLEÇÃO BIOLÓGICA.....	27
3.5 MORFOLOGIA	27
3.6 MORFOMETRIA CLÁSSICA	29
3.7 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS	32
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 ANÁLISE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	35
4.1.1 Tamanho dos Centróides e ANOVA de Procrustes.....	35
4.1.3 Análise das Variáveis Canônicas.....	39
4.1.4 Análise da Função Discriminante.....	43
4.2 ANÁLISE MORFOMETRIA CLÁSSICA	48
4.2.1 Análise Intraespecífica	48
4.2.2 Análise Interespecífica	49
4.2.2.1 Análise Descritiva e de Variância	49
4.2.2.2 Análise Discriminante	59
4.3 ANÁLISE DA MORFOLOGIA.....	65
5 DISCUSSÃO	69
5.1 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS	69
5.2 MORFOMETRIA CLÁSSICA E MORFOLOGIA.....	73
5.2.1 Função Discriminante e Variáveis Canônicas.....	77
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO I – Estruturas utilizadas na Morfologia e Morfometria Clássica.....	92

LISTA DE FIGURAS E ANEXOS

Figura 1.1. Manifestações clínicas das Leishmanioses.....	1
Figura 1.2. Número de casos de Leishmaniose Visceral entre os anos de 1990 e 2010 no Brasil por Região.....	4
Figura 1.3. Comparação entre o número de casos de LTA e LVA entre os anos de 1990 e 2010 no Brasil.....	5
Figura 1.4. Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana entre os anos de 1990 e 2010 no Brasil por Região.....	6
Figura 1.5. Fêmea de <i>Phlebotomus papatasi</i> realizando repasto sanguíneo.....	10
Figura 1.6. Distribuição Geográfica de Phlebotominae segundo Killick-Kendrick (1999).....	11
Figura 1.7. Cladograma com tribos e subtribos de Phlebotominae.....	12
Figura 1.8. Mapa com a distribuição das espécies vetoras mais importantes de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> do Brasil.....	21
Figura 3.1. Armadilhas utilizadas para captura de flebotomíneos.....	24
Figura 3.2. Mapa com as áreas de capturas de cada espécie de flebotomíneo utilizada no trabalho.....	25
Figura 3.3. Flebotomíneos montados entre lâmina e lamínula com meio de montagem Enecê.....	26
Figura 3.4. Mapa dos municípios localizados no Vale do Ribeira destacando-se aqueles onde os espécimes de <i>Nyssomyia neivai</i> utilizadas no projeto foram capturados.....	27

Figura 3.5. Microscópio óptico Zeiss Primo Star acoplado com câmera AxioCam ICc1.....	29
Figura 3.6. Marcos anatômicos utilizados para Análise da Morfometria Geométrica das asas das espécies de flebotomíneos.....	32
Figura 4.1 Gráfico mostrando a comparação entre o tamanho dos centróides das espécies estudadas.....	35
Figura 4.2 Análise dos Componentes Principais que apresentaram maior variação.....	37
Figura 4.3 Análise dos Componentes Principais 1 e 2 em comparação com o PC3.....	38
Figura 4.4 Análise das Variáveis Canônicas que apresentaram maior variação.....	40
Figura 4.5 Análise das Variáveis Canônicas 1 e 2 em comparação com o PC3.....	41
Figura 4.6 Análise das Variáveis Canônicas das espécies do gênero <i>Nyssomyia</i>	42
Figura 4.7 Formas médias das Asas após Análise da Função Discriminante entre <i>Brumptomyia troglodytes</i> e as demais espécies.....	45
Figura 4.8 Formas médias das Asas após Análise da Função Discriminante de <i>Bichromomyia flaviscutellata</i> e <i>Migonemyia migonei</i> com as demais espécies.....	46
Figura 4.9 Formas médias das Asas após Análise da Função Discriminante entre espécies do gênero <i>Nyssomyia</i>	47
Figura 4.10 Gráficos mostrando as médias das medidas de cada espécie após a análise de variância.....	54
Figura 4.11 Gráficos mostrando as médias das medidas de cada espécie após a análise de variância.....	55

Figura 4.12 Gráfico mostrando a distribuição das espécies em função das variáveis canônicas discriminantes 1 e 2, utilizando-se os caracteres gerais encontrados em machos e fêmeas.....	61
Figura 4.13 Gráfico mostrando a distribuição das espécies em função das variáveis canônicas discriminantes 1 e 2, utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de machos.....	62
Figura 4.14 Gráfico mostrando a distribuição das espécies em função das variáveis canônicas discriminantes 1 e 2, utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de fêmeas.....	63
Figura 4.15 Gráfico mostrando a distribuição das espécies de <i>Nyssomyia</i> em função das variáveis canônicas discriminantes 1 e 2 utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de machos.....	64
Figura 4.16 Gráfico mostrando a distribuição das espécies de <i>Nyssomyia</i> em função das variáveis canônicas discriminantes 1 e 2 utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de fêmeas.....	64
Figura A1 Caracteres morfológicos da cabeça analisados.....	92
Figura A2 Caracteres morfológicos do tórax e do abdômen de fêmeas analisados.....	93
Figura A3 Caracteres morfológicos do abdômen de machos analisados.....	94
Figura A4 Caracteres morfológicos do abdômen de machos analisados.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Leishmânias encontradas em humanos.....	3
Tabela 1.2 Tabela com as associações/ prováveis ciclos de transmissão envolvendo potenciais/ prováveis vetores e hospedeiros e reservatórios das leishmânias encontradas no Brasil.....	9
Tabela 3.1 Caracteres utilizados para avaliação da morfologia das espécies de flebotomíneo.....	28
Tabela 3.2 Caracteres utilizados na morfometria clássica com respectiva metodologia adotada para medição.....	30
Tabela 3.3 Índice com as estruturas utilizadas nas análises discriminantes.....	32
Tabela 4.1 Valores dos Quadrados médios de Procrustes, Graus de liberdade, Valor de F e significância do teste de ANOVA de Procrustes.....	35
Tabela 4.2 – Distâncias de Mahalanobis entre as formas médias das asas das espécies de flebotomíneos utilizadas no projeto.....	42
Tabela 4.3 Resultados da Análise Discriminante mostrando os valores do teste t^2 e dos valores de p após os 1000 testes de permutação para as distâncias de Procrustes e de Mahalanobis, entre os pares de espécies.....	43
Tabela 4.4 Índices de Classificação Correta (CC) e Validação Cruzada (VC) indicando as porcentagens e o número de espécies corretamente classificados sobre o número de total de indivíduos comparados (dentro dos parênteses) entre as espécies de <i>Nyssomyia</i>	44
Tabela 4.5 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pelo comprimento do Flagelômero II.....	50

Tabela 4.6 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pelo comprimento do da nervura R5.....	50
Tabela 4.7 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pela largura dos Dutos Individuais.....	53
Tabela 4.8 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pelo comprimento da Bomba Genital.....	53
Tabela 4.9 Índice descritivo com os caracteres da cabeça utilizados nas análises intra e interespecíficas mostrando o número de espécimes, a média, o desvio padrão e os valores mínimos e máximos para cada estrutura de cada espécie.....	56
Tabela 4.10 Índice descritivo com os caracteres do tórax utilizados nas análises intra e interespecíficas mostrando o número de espécimes, a média, o desvio padrão e os valores mínimos e máximos para cada estrutura de cada espécie.....	57
Tabela 4.11 Índice descritivo com os caracteres específicos do abdômen de macho e de fêmea utilizados nas análises intra e interespecíficas mostrando o número de espécimes, a média, o desvio padrão e os valores mínimos e máximos para cada estrutura de cada espécie.....	58
Tabela 4.12 Resultado da Análise discriminante mostrando os caracteres analisados, o valor de Wilks' Lambda, o valor de F, de df1 (variáveis discriminantes), df2 (número total de espécimes) e a Significância.....	60
Tabela 4.13 Resultado da Análise morfológica intraespecífica de fêmeas mostrando a variação e a moda dos caracteres analisados.....	66

LISTA DE ABREVIACÕES

Bi. – *Bichromomyia*
L. – *Leishmania*
L. (L.) – *Leishmania (Leishmania)*
L. (V.) – *Leishmania (Viannia)*
Lu. – *Lutzomyia*
Mg. – *Migonemyia*
Ny. – *Nyssomyia*
Br. – *Brumptomyia*
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV – Leishmaniose Visceral
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA – Leishmaniose Visceral Americana
WHO – World Health Organization
Ps. – *Psychodopygus*
Th. – *Trichophoromyia*
Pi. – *Pintomyia*
LPG – Lipofosfoglicana
PCR – Reação de Polimerização em Cadeia
P.A. – Pureza Analítica
Comp. e C. – Comprimento
OTU – Unidades Taxmicas Operacionais
AGP – Análise Generalizada de Procrustes
PCA – Análise dos Componentes Principais
CVA – Análise das Variáveis Canônicas
FD – Função Discriminante
PC – Componente Principal
CC – Classificação Correta
VC – Validação Cruzada
CV – Variável Canônica
Lar. e L. – Largura
Fil. - Filamento
Ext. – Externo
Sup. - Superior
A. – Anterior
M. – Mediano
P. – Posterior
Tarso - Tarsômero
Ma – Milhões de anos
UF – Unidade Federativa
CDC – Centro de Controle de Doenças

1 INTRODUÇÃO

1.1. AS LEISHMANIOSES

1.1.1 Características Gerais

As Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários tripanosomatídeos digenéticos do gênero *Leishmania* Ross, 1903, parasitos obrigatórios de células do sistema monocítico fagocitário, que tem como principal meio de transmissão, a picada de fêmeas de flebotomíneos (dípteros nematóceros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae). Cerca de 20 espécies de *Leishmania* já foram encontradas parasitando mamíferos. Neste gênero estão incluídos três subgêneros propostos por Lainson & Shaw (1979) com base na região de desenvolvimento do protozoário no intestino do inseto vetor. O subgênero *Sauroleishmania* Ranque, 1973, onde estão contidas apenas espécies que parasitam répteis no Velho Mundo, e tem seu desenvolvimento na região posterior do intestino do flebotomíneo (região hipopilária), *Viannia* Lainson & Shaw, 1987 que está presente apenas no Novo Mundo, desenvolvendo-se nas regiões anterior, média e posterior do intestino (região peripilária) e o subgênero *Leishmania* Safjanova, 1982, que se desenvolve nas regiões anterior e média do intestino (região suprapilária) (Ashford, 2000; Gonzáles et al., 2009; WHO, 2010a, 2010b).

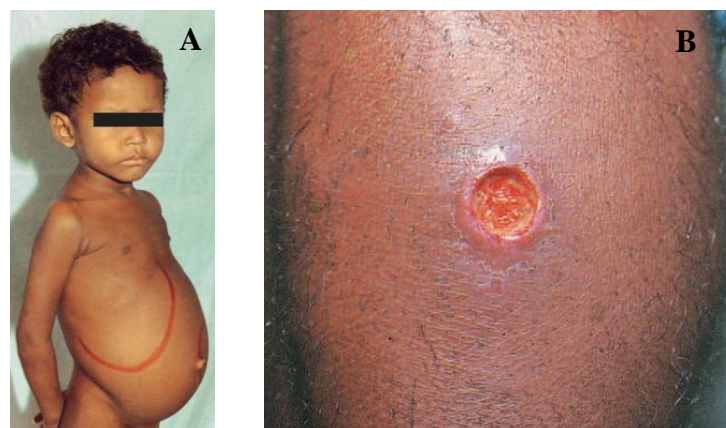


Figura 1.1 Manifestações clínicas das Leishmanioses. (A) Criança acometida por Leishmaniose Visceral, (B) Lesão cutânea causada por Leishmaniose Tegumentar. Fonte: Brasil, 2006, 2007.

Essas doenças apresentam duas formas clínicas principais e distintas, que estão relacionadas intimamente com a espécie de *Leishmania* que está parasitando o hospedeiro mamífero e o tropismo da espécie quanto ao tecido (viscerotrópica ou dermatrópica). A

leishmaniose visceral (LV) que acomete principalmente o baço, o fígado e a medula no hospedeiro mamífero (Fig 1.1A) e a leishmaniose tegumentar (LT) que acomete principalmente a pele e as mucosas (Fig 1.1B). (Brasil, 2006, 2007; WHO, 2010a, 2010b).

A leishmaniose visceral é causada por leishmânias do complexo de espécies *Leishmania (Leishmania) donovani – infantum* e também por *L. (L.) tropica* no Velho Mundo, onde a primeira e a última dessas espécies são as únicas que apresentam reconhecidamente ciclos antroponóticos. No Novo Mundo a leishmaniose visceral americana (LVA) é causada pelo agente etiológico *L. (L.) infantum*, sendo considerada por alguns autores como sendo a mesma espécie que ocorre no Velho Mundo, que foi trazida através de cães e homens infectados com o parasito durante as expedições europeias, encontrando aqui um vetor susceptível (Mauricio et al., 1999, Dantas-Torres, 2006, Momen et al., 1987, Momen; Cupolillo, 2000, Killick-Kendrick et al., 1980). Hipóteses sugeridas por outros autores referem origem autóctone do Novo Mundo e utilizam o nome específico *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Adler, 1940; Shaw, 2006; Lainson; Shaw, 2005, Lainson et al., 1987, Silveira, 2010; Corbett, 2010). As manifestações da doença são muito diversas podendo apresentar, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, escurecimento da pele em algumas áreas e raramente nódulos ou úlceras cutâneas. Nos últimos anos, com a sua expansão, a doença vem apresentando mudanças no seu padrão epidemiológico, devido a mudanças climáticas e ambientais, bem como por fluxos migratórios. A doença passou a incidir igualmente em adultos e crianças, grande parte devido ao aumento dos casos de co-infecção com HIV na população adulta (Ashford, 2000; Shaw, 2007; WHO, 2010a).

A LT apresenta uma grande variabilidade de agentes etiológicos (cerca de 19 espécies de *Leishmania*, sendo 5 no Velho Mundo e 14 no Novo Mundo), hospedeiros mamíferos e vetores, que estão presentes em áreas com as mais diversas condições ambientais, refletindo assim na grande diversidade das manifestações clínicas da doença, tanto no Velho quanto no Novo Mundo (Tabela 1.1). Segundo Ashford (2000), no Velho Mundo, a LT ocorre em áreas áridas e semiáridas onde o ciclo antroponótico (causado por *L. (L.) tropica*) está associado a regiões populosas no Centro-Oeste Asiático enquanto o ciclo zoonótico está presente em áreas rurais semidesérticas no norte da África e na Ásia. As demais espécies causadoras de LT no Velho Mundo são *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) killicki* (WHO, 2010a).

No Novo Mundo, existem casos registrados em humanos desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina, exceto no Chile e Uruguai, sendo os principais agentes etiológicos *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*, onde as duas

primeiras são responsáveis também pela manifestação da forma clínica mucocutânea e as duas últimas pela forma anérgica difusa da doença (Ashford, 2000, Lainson; Shaw, 2005, WHO 2010a). Como mencionado anteriormente, as manifestações clínicas presentes na LT podem ser das mais diversas, podendo causar lesões simples (que geralmente se curam espontaneamente sem tratamento num período de até 6 meses, dependendo da espécie de *Leishmania* que está causando a doença), ou múltiplas (forma anérgica difusa), caso em que várias lesões aparecem por todo o corpo do indivíduo acometido. Segundo a literatura, a forma mais grave da doença, no entanto, acomete a mucosa da boca e do trato respiratório superior causando metástase nesses tecidos (levando a perda de estrutura cartilaginosa e óssea) onde comumente infecções bacterianas oportunistas podem levar até a morte do paciente. A forma mucocutânea, como é denominada essa manifestação da doença, tem a maior parte de seus casos registrados no Brasil, Bolívia e Peru (WHO, 2010a).

Tabela 1.1. Leishmânias encontradas em humanos. Adaptado de WHO, 2010a.

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>donovani</i>	<i>major</i>		
	<i>infantum</i>	<i>tropica</i>		
		<i>killicki</i>		
		<i>aethiopica*</i>		
	<i>Tropica</i>	<i>infantum</i>		
		<i>donovani</i>		
Novo Mundo		<i>infantum</i>	<i>braziliensis</i>	<i>braziliensis</i>
		<i>mexicana</i>	<i>guyanensis</i>	<i>panamensis</i>
		<i>pifanoi</i>	<i>panamensis</i>	
		<i>venezuelensis</i>	<i>shawi</i>	
	<i>infantum</i>	<i>garnhami</i>	<i>naiffi</i>	
		<i>amazonensis*</i>	<i>lainsoni</i>	
			<i>lindenbergi</i>	
			<i>peruviana</i>	
			<i>colombiensis</i>	
Tropismo	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Forma mucosa

* Espécies de Leishmânias causadoras de Leishmaniose Anérgica Difusa

1.1.2 Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil

Inicialmente a LVA possuía um caráter tipicamente rural com surtos da doença ocorrendo principalmente em cenários conhecidos como “pés de serra”, porém, nos últimos anos, casos da doença vêm sendo registrados em área urbana de cidades de médio e grande porte como em Corumbá (Mato Grosso do Sul), Palmas (Tocantins), Belo Horizonte (Minas

Gerais), Fortaleza (Ceará), dentre outras. Dados do Ministério da Saúde mostram que até a década de 90 os casos registrados estavam concentrados quase que em sua totalidade na Região Nordeste (90% dos casos), e cerca de uma década depois essa mesma região passou a apresentar 77% dos registros no país, evidenciando assim a expansão da doença, que pode ser constatada em todas as regiões do país (em 21 unidades federadas), após o surgimento de casos autóctones da doença na Região Sul, a única que não apresentava casos da doença até 2008, com o primeiro caso confirmado em 2009 (Brasil, 2007, Ministério da Saúde; Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul, 2010).

Entre os anos de 1990 e 2010, foram registrados 64.953 no país, sendo 70,26% destes na Região Nordeste, seguidos das Regiões Sudeste (11,77%), Norte (11,71%), Centro-Oeste (4,85) e Sul, onde não apresenta nem 0,05% dos casos registrados. É importante salientar que até o ano de 2006 os registros eram feitos de acordo com a unidade federativa (UF) de residência e só a partir de 2007 foi adotado o registro da UF provável Fonte de Infecção. Entretanto, até 2010, 1,36% dos casos não tiveram a UF da provável Fonte de Infecção determinada (Brasil, 2012) (Figura 1.2).

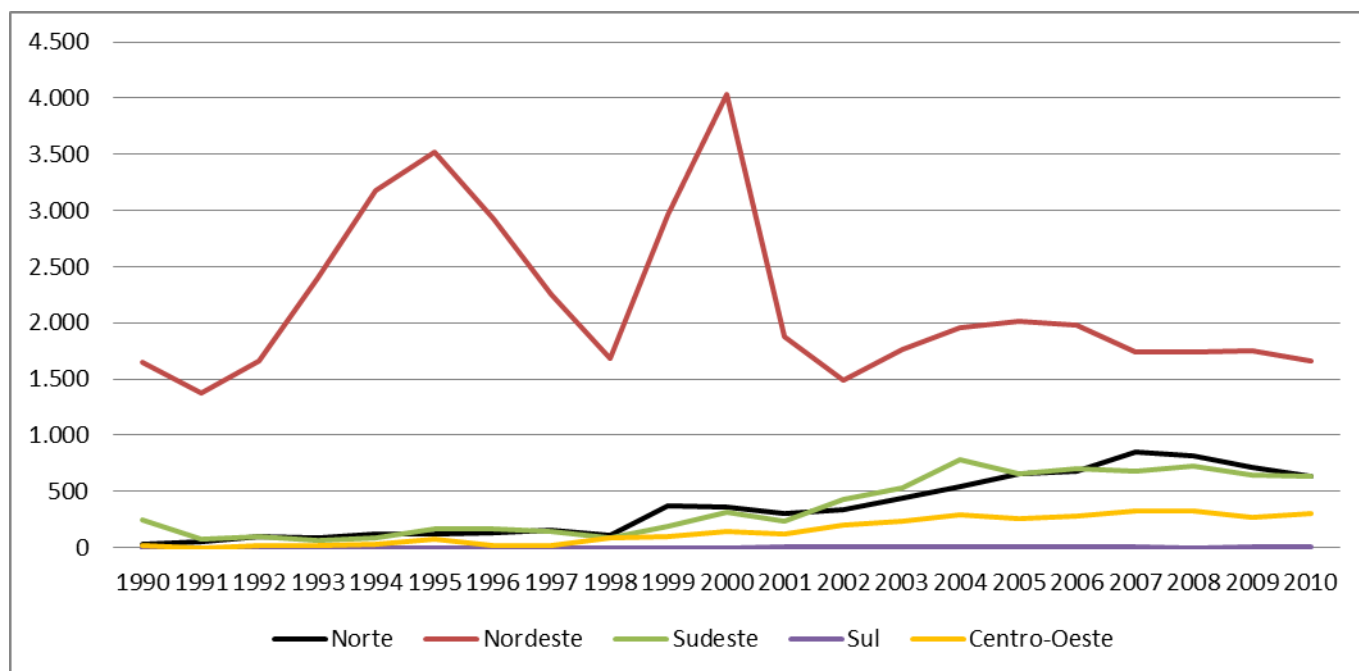


Figura 1.2 – Número de casos de Leishmaniose Visceral entre os anos de 1990 e 2010 no Brasil por Região. Adaptado de Brasil, 2012.

No Brasil, o agente etiológico da LVA é *Leishmania (Leishmania) infantum* ou *L.(L.) infantum chagasi*, tendo como principal espécie vetora *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, que ocorre em praticamente todo o país (21 das unidades federativas) de forma coincidente com os casos registrados de LVA. Apenas nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul

uma outra espécie foi associada a transmissão da LVA, *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Galati et al. 1997, Santos et al. 1998, 2003; Pita-Pereira, 2008; Missawa, 2011). Mais recentemente, estudos realizados em áreas com ocorrência de casos de LVA, onde não foi observada a presença de *Lu. (L.) longipalpis* e *Lu. (L.) cruzi*, a alta incidência de *Migonemyia migonei* levou os pesquisadores a indicar essa espécie como provável vetor da doença na área de estudo, como sugerido nos trabalhos de Salomón et al. (2010), na Argentina, e Carvalho et al. (2010), no Estado de Pernambuco, onde inclusive, a espécie foi encontrada infectada por *L.(L.) infantum chagasi*, confirmada através de técnicas de PCR.

1.1.3 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil

A LTA é uma doença que está presente em todas as Unidades Federativas do país e possui diferentes vetores, agentes etiológicos e hospedeiros, com ciclos de transmissão em nichos ecológicos restritos, o que torna o seu controle complexo. Segundo o Ministério da Saúde, foram registrados, de 1990 até 2010, 572.231 casos de LTA em todo o país, número quase 9 vezes maior que o registrado para a forma visceral (Figura 1.3) (Brasil, 2007, 2012).

Diferentemente da LVA, onde a maior parte dos casos está concentrada em duas regiões geográficas (Norte e Nordeste), na LTA, os casos estão mais distribuídos, a região Norte apresenta o maior número de casos (36,06%), seguido do Nordeste (35,01%), do Centro-Oeste (15,21%), Sudeste (10,35%) e Sul (2,24%) (Figura 1.4). O número de casos da doença começa a aumentar a partir da década de 80, quando a doença é registrada em 19 UFs e, duas décadas depois, em 2003, a doença já passa a ser registrada em todos os estados (Brasil, 2007, 2012).

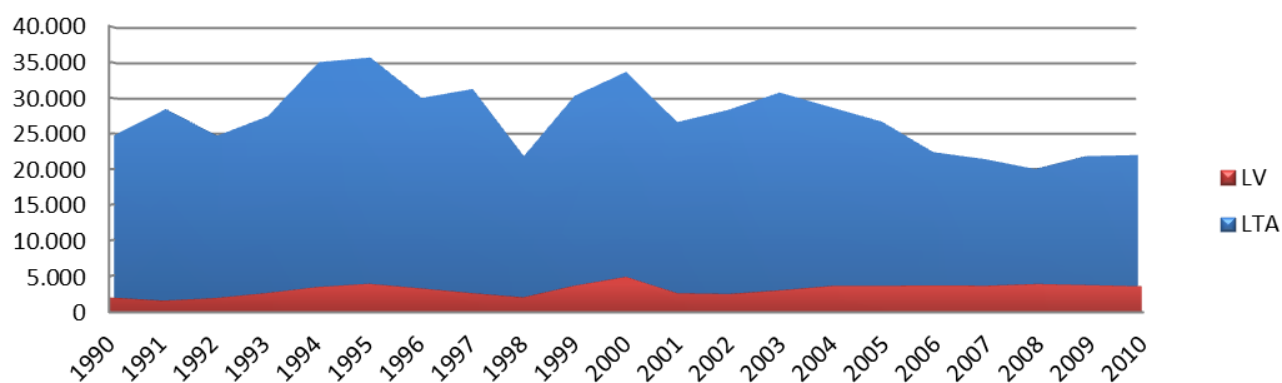


Figura 1.3 – Comparação entre o número de casos de LTA e LVA entre os anos de 1990 e 2010 no Brasil. Adaptado de Brasil, 2012

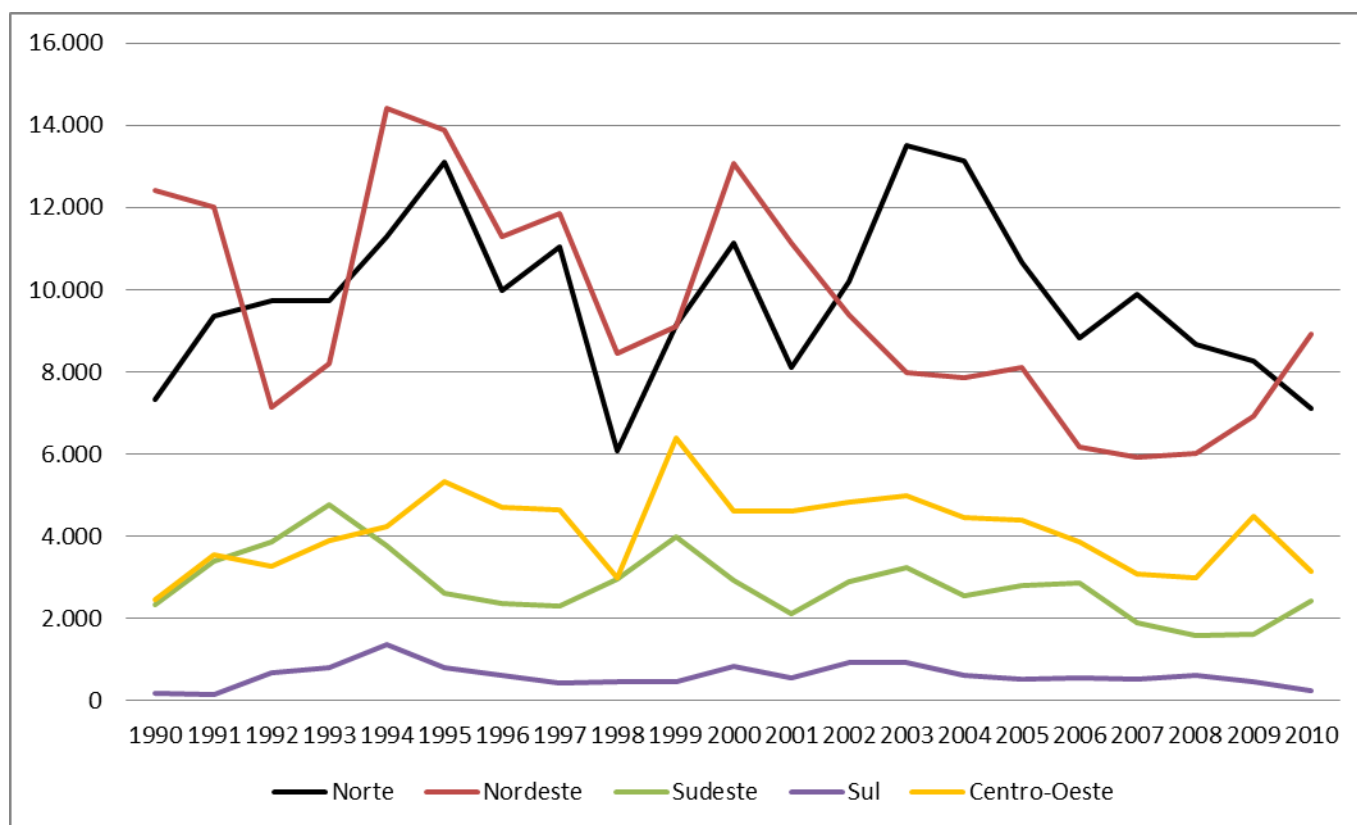


Figura 1.4 – Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana entre os anos de 1990 e 2010 no Brasil por Região. Adaptado de Ministério da Saúde, 2012.

A LTA, no Brasil, inicialmente esteve associada a um padrão de transmissão ocupacional, que ainda é comum em algumas áreas, especialmente na Amazônia. Porém o perfil da doença tem sido alterado nos últimos anos, passando a ocorrer em áreas desmatadas e periurbanas (Brasil, 2007).

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2007) existem hoje três padrões epidemiológicos: a) Silvestre: onde ocorre o ciclo enzoótico da doença, onde o homem adentra a mata (vegetação primária) acaba se infectando acidentalmente, b) Áreas impactadas - ocupacional e lazer: associado a atividades antrópicas que modificam o ambiente natural, como extrativismo, construção de rodovias, estradas, hidrelétricas, c) Rural e periurbano: em áreas de colonização antiga, devido aos processos migratórios e consequente favelização, e áreas associadas a matas residuais e secundárias, nesse padrão, costuma se manter endêmica.

1.1.3.1 Ciclos de Transmissão

Como mencionado anteriormente os ciclos de transmissão da LTA são muito diversos, tendo variações de acordo com a região, espécie de vetor, hospedeiro e de *Leishmania*. No Brasil, ao todo são conhecidas 7 espécies de *Leishmania*, onde 6 delas já foram encontradas infectando homens. As características dos ciclos, bem como a espécie de *Leishmania*, flebotomíneo vetor e provável hospedeiro estão descritas na tabela 1.2.

1.1.3.1.1 *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911

Leishmania (Viannia) braziliensis é a espécie mais importante, do ponto de vista epidemiológico, causadora de LTA em toda a América Latina. No Brasil, está amplamente distribuída sendo encontrada em todas as regiões do país, porém, segundo Lainson & Shaw (2005), a distribuição dessa espécie pode não corresponder a realidade devido a métodos de identificação inadequados usados no passado. A transmissão da doença está associada principalmente a atividades na mata e desmatamentos, onde o risco maior está relacionado a populações que adentram ou vivem nestes ambientes (WHO, 2002, 2010a; Brasil, 2007).

Os ciclos de transmissão estão relacionados a espécies diferentes de flebotomíneos dependendo da área de ocorrência. Na Amazônia, *Psychodopygus wellcomei* é considerado o principal vetor de *L. (V.) braziliensis*, e *Migonemyia migonei* geralmente é considerado um vetor secundário em muitas áreas do Ceará e do Rio de Janeiro onde este flebotomíneo já foi encontrado naturalmente infectado. Algumas espécies do gênero *Nyssomyia* são importantes transmissoras desse agente etiológico no país, como, *Nyssomyia neivai* no Sudeste e Sul, *Ny. intermedia* no Sudeste e *Ny. whitmani* no Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste (Lainson; Shaw, 2005; Brasil, 2007; Rangel; Lainson 2009).

1.1.3.1.2 *Leishmania (Leishmania) guyanensis* Floch, 1954

A transmissão desse agente etiológico está associada a atividades ocupacionais, como extrativismo ou atividades militares em florestas primárias ou quando as casas se encontram muito próximas da mata (Manaus, AM). Casos de LTA causados por essa leishmânia já foram

registrados nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roráima, com a transmissão podendo ocorrer durante todo o ano (Lainson; Shaw, 2005, Brasil, 2007; WHO, 2010a).

O principal vetor, *Ny. umbratilis*, apresenta atividade tanto na copa das árvores quanto no solo; acredita-se que o ciclo enzoótico tenha como reservatórios as preguiças (*Choloepus didactylus*), tamanduás (*Tamandua tetradactyla*) e gambás (*Didelphis albiventris*), que servem de fonte alimentar para fêmeas de *Ny. umbratilis* nas copas das árvores a noite, a transmissão para o homem pode ocorrer nos primeiros períodos da manhã, quando os homens adentram a mata, principalmente para a derrubada de árvores. Outra espécie, *Ny. anduzei* pode desempenhar um papel secundário na transmissão deste parasito (Lainson; Shaw, 2005, Brasil, 2007; WHO, 2010a).

1.1.3.1.3 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972

A transmissão *L. (L.) amazonensis* vem ocorrendo em florestas primárias e secundárias principalmente na região Norte, na área da Amazônia Legal, que inclui o Maranhão e o norte do Tocantins, mas também é reportada nos seguintes estados: Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e Goiás. Esta leishmânia tem como seu principal vetor *Bichromomyia flaviscutellata*, que tem ampla distribuição geográfica, sendo pouco antropofílico, porém com alta atratividade por roedores silvestres, tais como espécies dos gêneros *Proechymis* e *Oryzomys* que já foram encontrados infectados por *L. (L.) amazonensis*. (Ashford, 2000; Dorval et al., 2006; Brasil, 2007; Azeredo-Coutinho et al., 2007; Rangel; Lainson, 2009).

1.1.3.1.4 *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira et al., 2002

Essa espécie foi recentemente descrita, a partir do registro de oito casos de LTA acometendo soldados de uma unidade militar, após a realização de manobras de campo em área com vestígios de mata primária na periferia de Belém, estado do Pará. A partir de dados obtidos em estudos epidemiológicos e entomológicos, foi levantada a hipótese de que *Ny. antunesi* seria um potencial vetor desse agente etiológico, por seus hábitos antropofílicos e por sua alta densidade na área de transmissão (Silveira et al., 2002; Brasil, 2007; Rangel; Lainson, 2009).

1.1.3.1.5 *Leishmania (V.) lainsoni* Silveira et al., 1987, *Leishmania (V.) naiffi* Lainson & Shaw, 1989 e *Leishmania (V.) shawi* Lainson et al., 1989

Essas espécies têm seus ciclos descritos na região Norte e sua epidemiologia ainda é pouco conhecida, tendo poucos casos registrados oficialmente em humanos. Os vetores desses agentes etiológicos são respectivamente *Trichophoromyia ubiquitalis*; *Ps. ayrozai*, *Ps. paraensis*, *Ps. squamiventris* e *Ny. whitmani*, espécies de flebotomíneos encontrados com infecção natural em áreas de transmissão (Lainson; Shaw, 2005; Brasil, 2007, Rangel; Lainson, 2009).

Tabela 1.2 Tabela com as associações dos prováveis ciclos de transmissão envolvendo potenciais/prováveis vetores, hospedeiros e reservatórios das leishmânias encontradas no Brasil. Adaptado de WHO, 2010a.

<i>Leishmania</i> spp.	Forma Clínica	Vetor Suspeito ou Comprovado	Possível Mamífero Hospedeiro ou Reservatório
<i>L. guyanensis</i>	LTA	<i>Ny. umbratillis</i> , <i>Ny. anduzei</i>	<i>Choloepus</i> spp., <i>Tamandua</i> spp., <i>Didelphis</i> spp., <i>Proechimys</i> spp.
<i>L. amazonensis</i>	LTA (LAD)	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i> , <i>Bi. reducta</i> , <i>Bi. olmeca nociva</i>	<i>Proechimys</i> spp., <i>Oryzomys</i> spp., <i>Wiedomys</i> spp.
<i>L. braziliensis</i>	LTA (LMC)	<i>Ny. whitmani</i> , <i>Ny. intermedia</i> , <i>Ny. neivai</i> , <i>Ps. complexus</i> , <i>Ps. wellcomei</i> , <i>Mg. migonei</i> , <i>Pintomyia fischeri</i>	Cães, <i>Rattus rattus</i> , <i>Akodon arviculoides</i> , <i>Bolomys</i> spp., <i>Nectomys</i> spp., <i>Thrichomys</i> spp.
<i>L. lainsoni</i>	LTA	<i>Th. ubiquitalis</i>	<i>Agouti paca</i>
<i>L. shawi</i>	LTA	<i>Ny. whitmani</i>	<i>Cebus apella</i> , <i>Chiropotes satanus</i> , <i>Nasua nasua</i> , <i>Bradypus tridactylus</i> , <i>Choloepus didactylus</i>
<i>L. naiffi</i>	LTA	<i>Ps. squamiventris</i> , <i>Ps. paraensis</i> , <i>Ps. amazonensis</i> , <i>Ps. ayrozai</i>	<i>Dasybus novemcinctus</i>
<i>L. lindenbergi</i>	LTA	<i>Ny. antunesi</i>	Desconhecido

1.2 VETORES

1.2.1 Características Gerais

Flebotomíneos são insetos holometábolos pertencentes à família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, apresentam corpo pequeno (não ultrapassando 5mm de comprimento) e recoberto por cerdas, com asas alongadas e estreitas, que quando em repouso permanecem eretas e fletidas para cima. Estes dípteros são importantes vetores naturais de patógenos de doenças humanas e de animais, como protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 e outros

tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* Strong Tyzzer, Sellards, Brues & Gastiaburu, 1915 e numerosos arbovírus (Rangel; Lainson, 2003, 2009).

Os insetos adultos possuem hábitos criptozoicos, em virtude da permeabilidade de seu revestimento, uma fina camada de quitina que recobre seu corpo, tornando-os muito sensíveis a mudanças de temperatura e umidade, fazendo com que fiquem limitados às condições macroclimáticas, estáveis mais próximas daquelas encontradas em seus abrigos naturais. Seu período preferencial de atividade é crepuscular e/ou noturno, período em que saem de seus abrigos para se alimentarem, ficando abrigados durante o período luminoso (em tocas de animais, fendas de árvores e rochas, serapilheira e outros locais abrigados da luz) (Forattini, 1943; Brazil; Brazil, 2003).

Quanto ao hábito alimentar, sabe-se que tanto machos quanto fêmeas se alimentam de carboidratos como néctares e secreções de afídeos e homópteros, contudo as fêmeas são as únicas que praticam a hematofagia (Figura 1.5), condição necessária para que ocorra a maturação de seus ovários e o que a capacita como vetor de patógenos (Brazil; Brazil, 2003). Contudo, Gontijo e colaboradores (1987) observaram flebotomíneos machos da espécie *Lutzomyia renei* Martins, Falcão e Silva, 1957 infectados com *Leishmania sp.*, após o inseto, provavelmente ter picado um hamster infectado experimentalmente. Silva & Grünewald (1999) observaram a prática da hematofagia por alguns machos de *Mg. migonei* em uma ferida na pele de uma vaca, mas as circunstâncias para ocorrência desse hábito ainda não foram explicadas.



Figura 1.5 – Fêmea de *Phlebotomus papatasi* realizando repasto sanguíneo. Fotografia por James Gathany – CDC.

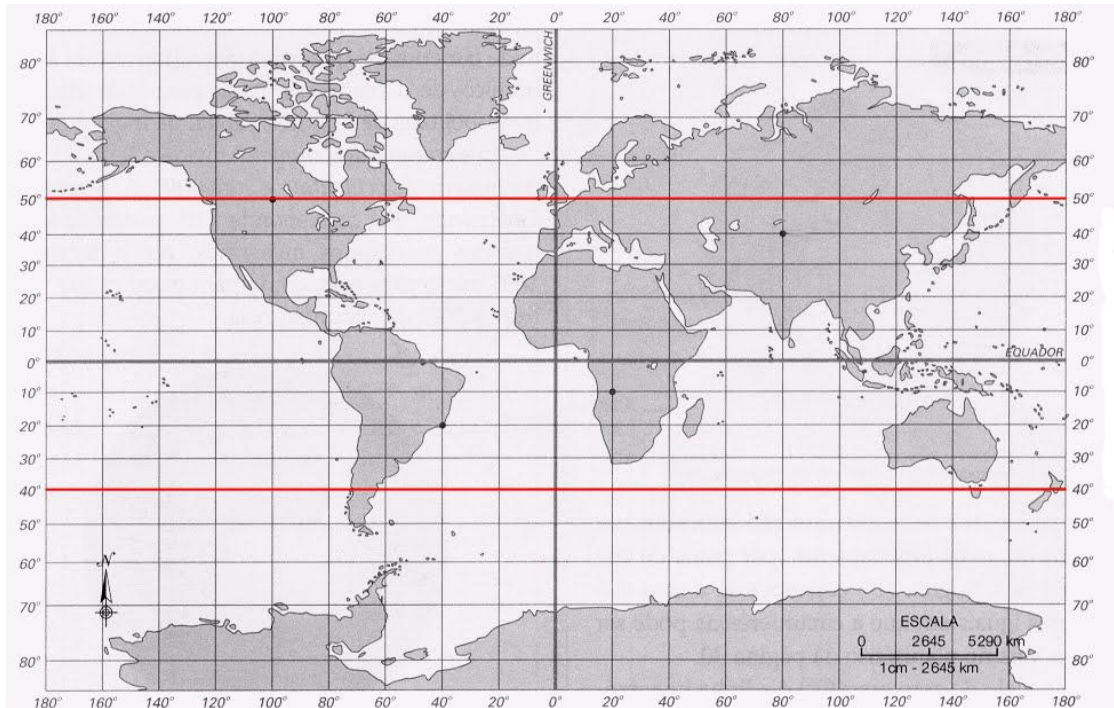


Figura 1.6 – Distribuição Geográfica de Phlebotominae segundo Killick-Kendrick (1999). A área onde são encontrados está compreendida entre as linhas vermelhas do mapa.

Os flebotomíneos se distribuem na faixa que está compreendida entre o Sudoeste do Canadá até aproximadamente a região Central da Argentina, não ocorrendo apenas na Nova Zelândia e Ilhas do Pacífico (Killick-Kendrick, 1999). Entretanto, Muzón e colaboradores (2002) encontraram um espécime identificado como *Lutzomyia sp.* (provavelmente do grupo *oswaldoi*) na região da patagônia argentina (40°S), sendo o único registro de flebotomíneos nessa área (Figura 1.6).

1.2.2 Taxonomia

Embora exista um grande conhecimento sobre esses insetos adquirido durante anos de pesquisas, desde a descrição das primeiras espécies americanas: *Flebotomus cruciatus* e *Flebotomus vexator*, por Coquillett (1907), ainda não há consenso sobre a taxonomia geral desse grupo, principalmente no que diz respeito àquelas espécies descritas no Novo Mundo. Ao todo são conhecidas cerca de 900 espécies de flebotomíneos no mundo, onde 98 delas são incriminadas como vetores (Young; Duncan, 1994; Killick-Kendrick, 1999; WHO, 2010a).

No Velho Mundo, a classificação proposta por Lewis (1977), com posterior adição do gênero *Chinius* por Leng em 1987, parece ser a mais aceita até hoje, onde são reconhecidos três gêneros: *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840 (grupo onde se encontram as espécies vetoras das leishmânias) composto de 12 subgêneros, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 com 8 subgêneros e *Chinius* Leng, 1987. Uma classificação mais recente para espécies do Velho Mundo, realizada em 1998 por Rispail & Léger, propôs a elevação de quatro subgêneros em gêneros, 3 contidos em *Phlebotomus*, sendo estes *Australophlebotomus*, (Theodor 1948), *Idiophlebotomus* (Quate & Fairchild 1961) e *Spelaeophlebotomus* (Theodor 1948), e 1 em *Sergentomyia*, *Spelaeomyia* (Theodor 1948).

Para os flebotomíneos do Novo Mundo a classificação mais aceita é a proposta por Lewis (1977) e revisada por Young & Duncan (1994), que inclui as 400 espécies neotropicais descritas até a época em 3 gêneros: *Lutzomyia* França & Parrot, 1924 (onde se encontram as espécies vetoras) composto por 15 subgêneros e 11 grupos de espécies, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1940. Apesar de ser a classificação adotada pela maioria dos pesquisadores, a falta de uma avaliação que possa determinar as relações evolutivas dessas espécies, ainda é alvo de muita discussão. Um trabalho mais recente e que tem sido observado por taxonomistas desse grupo de insetos, foi publicado em 1995 por Galati, onde através de uma análise filogenética, com base nos postulados de Hennig, as 464 espécies de flebotomíneos neotropicais foram classificadas em 2 tribos, 5 subtribos, 22 gêneros, 20 subgêneros, 28 séries e 3 grupos de espécies (Figura 1.7). Importante ressaltar que a tribo Hetigiini apresenta vários caracteres plésiomórficos em relação aos grupos irmãos, enquanto Phlebotomini apresenta o maior número de caracteres apomórficos (Andrade-Filho; Brazil, 2003).

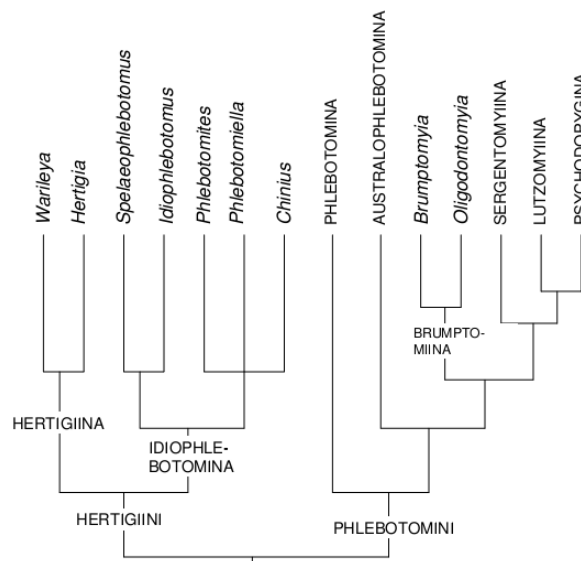


Figura 1.7 – Cladograma com tribos e subtribos de Phlebotominae. Fonte – Galati, 2003.

Nessa classificação as espécies vetoras que antes estavam incluídas apenas no gênero *Lutzomyia*, passam a ser distribuídas em 3 subtribos diferentes, *Sergentomyiina* Artemiev, 1991, *Lutzomyiina* Abonnenc & Leger, 1976 e *Psychodopygina* Galati, 1995, e em vários gêneros (Galati, 2003; WHO, 2010a).

1.2.3 Coevolução *Leishmania-Phlebotominae*

Para Noyes (1998), “a maioria das espécies de *Leishmania* é mais restrita em sua gama de vetores flebotomíneos do que em sua gama de hospedeiro mamífero, o que implica em uma relação coevolutiva muito mais próxima com o flebotomíneo do que com o mamífero”. Com base nessa afirmação, teorias vêm sendo publicadas com o intuito de tentar explicar esse processo de coevolução ocorrido entre esses dois grupos até os dias atuais. Duas dessas teorias sugerem origens distintas para as leishmânias e os flebotomíneos.

A origem Paleártica proposta por Kerr (2000) e Kerr et al. (2000), afirma que no Cretáceo (145,5 – 65,5 Milhões de anos) houve o surgimento de uma espécie de *Sauroleishmania* que infectava répteis na região Paleártica. Com o declínio dos répteis no final da mesma era, e a conseqüente ascensão e irradiação dos mamíferos no Cenozóico (65,5 Ma), o surgimento de um ancestral dos flebotomíneos recentes se adaptou a prática do repasto sanguíneo nesses mamíferos primitivos, fazendo possivelmente com que algumas *Leishmania* spp. se especializassem nesses novos hospedeiros. Posteriormente, no final do Eoceno (55 – 36 Ma) *Leishmania*, flebotomíneos e reservatórios migraram para a Região Neártica, com a separação dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, ocorrendo no Oligoceno (36 – 23 Ma), com a quebra da conexão entre as duas regiões zoogeográficas. Após a formação do Istmo do Panamá a irradiação desses três grupos se acelerou rapidamente, logo chegando a região Neotropical, e com as mudanças climáticas e o contato com novas espécies de mamíferos na América do Sul, pode ter acelerado rapidamente o processo de especiação das leishmânias levando a diversidade que vemos atualmente.

A teoria contrária a essa foi proposta por Noyes et al. (1997, 2000) e Noyes (1998). Segundo esses autores a origem das *Leishmania* se deu na Região Neotropical a partir de um tripanossomatídeo ancestral digenético dos gêneros irmãos *Endotrypanum* – *Leishmania*, provavelmente no final do Cretáceo quando houve a irradiação dos mamíferos e a região Neotropical estava começando a se isolar das demais, fato também sugerido por Shaw (1997). Por ser um dos dois únicos grupos de mamíferos presentes nessa era remanescentes até hoje e

por ser um dos hospedeiros tanto de *Endotrypanum* quanto *Leishmania* atualmente, existe a possibilidade de que preguiças tenham sido os primeiros hospedeiros do ancestral desses dois grupos. Os autores acreditam que a separação desses dois gêneros se deu durante o Paleoceno cerca de 53 a 65 milhões de anos atrás e, posteriormente, houve o surgimento do subgênero *Viannia* no início do Mioceno, e na segunda metade dessa mesma era teria ocorrido a divergência dos subgêneros *Sauroleishmania* e *Leishmania*, que hipoteticamente teria migrado para o Velho Mundo através do Estreito de Bering antes do final do Mioceno. Quanto à origem de *Sauroleishmania*, os autores apresentam duas hipóteses: a primeira é de que a divergência desse subgênero se deu a partir de membros do subgênero *Leishmania* que se adaptaram aos répteis no Velho Mundo; a segunda é de que a divergência desses subgêneros se deu no Novo Mundo e ambos migraram independentemente para o Velho Mundo, antes que indivíduos de *Sauroleishmania* fossem extintos do Novo Mundo. Shaw (1997) discute que a ausência de *Leishmania* spp. infectando aves atualmente seria um indicio de que não havia associação entre flebotomíneos e os ancestrais das aves que descenderam dos dinossauros; e ainda, que o hábito, de alguns flebotomíneos atuais, de se alimentar de aves e répteis de alguns flebotomíneos atuais seria uma modificação do hábito de se alimentarem em mamíferos. Segundo esse autor, a ausência de infecção em répteis no Novo Mundo é um indício de que *Sauroleishmania* é um grupo que se adaptou secundariamente a esses vertebrados, a partir de *Leishmania* spp. de mamíferos ou a adaptação de um flebotomíneo que o levou a picar répteis, após a separação da África e da América do Sul.

Artigos posteriores lançados por diferentes autores (Ready, 2000, Dujardin et al., 1999, Poinar G.; Poinar R., 2004, Poinar, 2008, Tuon et al., 2008) tentaram trazer luz a discussão quanto a possibilidade dessas origens e também a possibilidade da ocorrência de outras origens, porém nenhuma delas parece ser unanimidade quanto a aceitação de suas teorias. Contudo, todos são categóricos em afirmar que existe a necessidade de estudos mais abrangentes com relação à filogenia, biogeografia e paleoparasitologia, para a confirmação dessas hipóteses que são de grande importância epidemiológica, pois segundo Ready (2000) as relações evolutivas entre flebotomíneos e *Leishmania* spp. poderiam ter implicações na intervenção e controle das leishmanioses, como por exemplo, em um foco da doença inexplorado, prováveis vetores podem ser facilmente incriminados simplesmente sabendo-se a sua relação com vetores previamente conhecidos.

1.2.4 Interação *Leishmania* - Phlebotominae

Independente da grande diversidade de flebotomíneos, boa parte das espécies não é transmissora de *Leishmania*, cerca de apenas 40 delas já foram incriminadas como vetoras nas Américas (Rangel; Lainson, 2009, WHO, 2010a).

Alguns critérios para incriminação de espécies de flebotomíneos como vetores de leishmanioses foram criados por Killick-Kendrick (1990) e posteriormente mais avaliados e publicados no documento da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010a): alguns são essenciais, tais como antropofilia, distribuição espacial coincidente com a dos casos humanos, registro de infecção natural por *Leishmania* sp., a mesma circulando entre os humanos; outros critérios são complementares e incluem a atração dos flebotomíneos pelos potenciais reservatórios de *Leishmania* sp., para estabelecimento da infecção, e transmissão experimental, pela picada, no modelo de hamster para hamster.

Quanto à capacidade de se infectar, vários trabalhos atualmente associam o estabelecimento da infecção no flebotomíneo a estruturas de superfície do protozoário denominadas Lipofosfoglicanas (LPG), que se ligam a lectinas presentes na parede do intestino médio do inseto. Essa ligação é determinante para que ocorra o ancoramento dos parasitos (antes da eliminação do bolo alimentar) e consequente estabelecimento da infecção (Sacks, 2001; Myskova et al, 2007; Volf; Myskova, 2007).

Segundo Myskova e colaboradores (2007), estudos laboratoriais sobre o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* em flebotomíneos sugerem que estes podem ser divididos em dois grupos, os vetores específicos e os permissivos. Os específicos seriam aqueles refratários para a maior parte das espécies de *Leishmania*, enquanto os permissivos, a maior parte dos vetores estudados até hoje, seriam capazes de transmitir diferentes *Leishmania* spp.

1.2.5 Principais Vetores de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Brasil

1.2.5.1 *Psychodopygus wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson, 1971

Psychodopygus wellcomei é uma espécie de hábitos silvestres associados geralmente a florestas primárias, altamente antropofílica. Foi descrita em 1971 por Fraiha et al. em um surto de LTA por *L. (V.) braziliensis* no município de Serra dos Carajás, estado do Pará, em

trabalhadores, onde a construção de uma rodovia em meio a uma floresta primária estava sendo realizada. Estudos posteriores realizados nessa mesma área comprovaram a predominância dessa espécie principalmente nos meses chuvosos (entre novembro e abril), além de encontrarem indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis*. Registros da espécie em outros estados já foram reportados, como nos estados de Pernambuco e Ceará, porém até o momento sem envolvimento com a transmissão de LTA (Brandão-Filho et al., 1998; Lainson; Shaw, 2005; Rangel; Lainson, 2009).

1.2.5.2 *Nyssomyia whitmani* Antunes & Coutinho, 1939

Nyssomyia whitmani possui uma ampla distribuição pelo país estando presente em quase todas as UFs, sendo encontrada nos mais diversos habitats, das matas primárias no Norte do País, a áreas desmatadas e impactadas no Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul, possuindo diferentes hábitos e habitats. Devido a essa ampla distribuição e capacidade de adaptação e, ainda, por estar associada à maioria das áreas que apresentam casos da doença, essa espécie vem sendo considerada um dos mais importantes vetores de LTA por *L.(V.) braziliensis* no Brasil, estando ainda associada à transmissão de *L (V.) shawi* na Região Norte (Costa et al., 2007; Lainson; Shaw, 2005; Rangel; Lainson, 2009). A espécie foi encontrada com infecção natural por leishmânia em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Ceará e Bahia (Lainson; Shaw, 2005; Carvalho et al., 2008; Rangel; Lainson, 2009). Inúmeros estudos vêm registrando a ocorrência desse vetor no domicílio e no peridomicílio, associado a chiqueiros, galinheiros, em várias áreas por diferentes autores, como no Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e no Nordeste (Bahia e Ceará). Quanto a sazonalidade, *Ny. whitmani* apresenta diferentes hábitos dependendo da região, provavelmente devido a diferenças climáticas. Porém, a sua maior atividade se dá do crepúsculo vespertino até o final da noite (Lainson; Shaw, 2005; Rangel; Lainson, 2009). Mesmo em alguns estados, onde não foi encontrada naturalmente infectada, sua distribuição tem sido frequente e predominante em áreas de transmissão de LTA, como observado nos estados do Acre e Tocantins (Costa et al., 2007).

1.2.5.3 *Nyssomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912

Nyssomyia intermedia é uma espécie altamente antropofílica, que tem sua atividade do crepúsculo vespertino até o final da noite, onde costuma praticar a hematofagia em homens, animais domésticos e silvestres. Originalmente *Ny. intermedia* possuía hábitos silvestres associados a matas primárias, porém tem se adaptado muito bem ao peridomicílio, principalmente em áreas onde houve desmatamento em processos de colonização. Pode ser encontrada em matas secundárias e plantações, bem como no ambiente domiciliar (Lainson; Shaw, 2005; Rangel; Lainson, 2009). A sazonalidade de *Ny. intermedia* parece ser variável de acordo com a região, onde estudos já demonstraram maior densidade nos meses mais frios (Forattini, 1973), nos meses mais quentes (Souza et al., 2003) e em todo o ano com picos nos meses de junho, agosto e outubro (Rangel et al., 1990).

Essa espécie de flebotomíneo vem sendo considerada um importante vetor de LTA principalmente na região Sudeste do Brasil, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo (Lainson; Shaw, 2005; Andrade Filho et al., 2007; Rangel; Lainson, 2009).

A primeira incriminação de *Ny. intermedia* como vetor de LTA por *L. (V.) braziliensis*, foi descrita por Henrique Aragão pelo achado de exemplares desse flebotomíneo em áreas com casos de LTA; através de um macerado de espécimes de *Ny. intermedia*, previamente alimentados em uma lesão, reproduziu no animal uma lesão atribuída à *L. (V.) braziliensis*. Outros registros de infecção natural em *Ny. intermedia* foram obtidos no Rio de Janeiro. Rangel e colaboradores (1984) e Pita-Pereira e colaboradores (2005) encontraram espécimes de *Ny. intermedia* infectados com *L. (V.) braziliensis* na mesma região. No estado de São Paulo, os municípios que apresentam a maior concentração dos casos de LTA estão localizados em uma região denominada Vale do Ribeira, onde *Ny. intermedia* representou quase 100% dos flebotomíneos coletados no ambiente domiciliar. Para Tolezano (1980) a adaptação dessa espécie nessa área levou ao aparecimento de um novo perfil epidemiológico. Vale ressaltar que após o reestabelecimento de *Nyssomyia neivai* como espécie, estudos mostraram que essa espécie ocorre em simpatria com *Ny. intermedia* na região do Vale do Ribeira.

1.2.5.4 *Nyssomyia neivai* Pinto, 1926

Primeiramente descrita por Pinto, em 1926, através de exemplares machos coletados na cidade de São Paulo, essa espécie foi colocada em sinonímia com *Ny. intermedia* apenas 4 anos depois de sua descrição pelo mesmo autor que a descreveu (Andrade-Filho et al., 2003). Apenas 66 anos depois de colocada em sinonímia, um estudo realizado por Marcondes (1996), utilizando-se de caracteres morfológicos e morfométricos para comparar espécimes coletados na Bolívia e os holótipos de ambas as espécies, *Ny. neivai* foi revalidada como espécie. Posteriormente a esse trabalho, outros autores publicaram resultados das análises detalhadas da morfologia e estudos morfométricos extensos comparando essas duas espécies, onde alguns critérios de separação foram utilizados, como: formato da porção final dos dutos ejaculadores, comprimento do duto comum da espermateca, número de anéis do corpo da espermateca, forma da cabeça da espermateca, razão entre bomba ejaculadora e dutos ejaculadores (Marcondes; Alexander, 2003; Andrade-Filho et al., 2003; Marcondes, 1996). Segundo Marcondes e colaboradores (1997), a presença de espécies crípticas como no caso de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* provavelmente é resultado de recente alopatria, que no caso específico dessas espécies deve ter ocorrido há cerca de 250.000 anos, indicando que a separação das espécies se deu recentemente. *Nyssomyia neivai* apresenta hábitos muito semelhantes aos de *Ny. intermedia*, sendo uma espécie antropofílica e oportunista, ocorrendo em áreas de mata e em habitats modificados pelas atividades humanas, ocupando o ambiente domiciliar. Quanto a sua distribuição, segundo Marcondes et al. (1998), *Ny. neivai* ocorre em regiões mais frias e secas do Brasil diferentemente de *Ny. intermedia*, porém essas duas espécies já foram encontradas ocorrendo em simpatria em municípios do estado de São Paulo (Forattini, 1972; Marcondes et al., 1998; Andrade-Filho et al., 2007).

Essa espécie tem sido sugerida como importante vetor principalmente nos Estados da região Sudeste e Sul do País (Andrade Filho 2007). O primeiro registro do encontro de *Ny. neivai* naturalmente infectada por *L. (Viannia) spp.*, possivelmente da espécie *braziliensis*, foi feito por Marcondes et al. (2009) utilizando-se técnicas de PCR, de espécimes coletados no município de Piçarras, Santa Catarina (onde casos de LTA já haviam sido registrados). Estudos posteriores (Silva et al., 2008) no estado do Paraná, encontraram uma grande incidência de *Ny. neivai* (75,6% dos espécimes coletados) em áreas de transmissão de LTA, sugerindo sua provável participação no ciclo da doença. Hipótese que ganhou força com o encontro de espécimes de *Ny. neivai* infectados com *L. (Viannia) spp.*, nesse mesmo estado, através de técnicas de PCR multiplex (Oliveira et al., 2011). Desde o ano de 2002, casos

autóctones de LTA por *L. (V.) braziliensis* vem sendo registrados no estado do Rio Grande Sul (cerca de 20 casos até 2008). Estudos entomológicos revelaram uma grande predominância de *Ny. neivai* na área de ocorrência dos casos (Gonçalves, 2003) e, posteriormente, se deu o encontro da infecção natural nessa espécie por *L. (Viannia) spp.* através de técnicas de PCR, o que indicou esse flebotomíneo como potencial vetor de *L. (V.) braziliensis* (Pita-Pereira et al., 2009).

1.2.5.5 *Migonemyia migonei* França, 1920

Migonemyia migonei é considerada uma espécie antropofílica, silvestre sendo encontrada em mata primária e em menor número em matas secundárias. Porém, a incidência dessa espécie em abrigos de animais e no intradomicílio é evidente, tal como mostrado por Araújo Filho (1979), na Ilha Grande, RJ, que indicava a presença de uma densidade maior de espécimes desse flebotomíneo no ambiente domiciliar. Acredita-se que esta espécie possui grande capacidade de adaptação, sobrevivendo em áreas degradadas pelo homem, se aproximando de ambientes antropizados, passando a se alimentar de animais domésticos e do próprio homem e, ainda assim, possivelmente sendo capaz de manter o ciclo enzoótico da doença em áreas de mata secundária (Rangel; Lainson, 2009). De acordo com Nieves & Pimenta (2002), foi observada infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* em espécimes de *Mg. migonei* que se alimentaram de sangue de ratos selvagens, gambás, cavalos e homens. Quanto a sazonalidade, esta espécie não pode ser coletada em todos os meses, estando ausentes nos meses mais frios e secos, mas estudos realizados em Pernambuco registraram a espécie ocorrendo em todos os meses do ano (Rangel; Lainson, 2009; Guimarães et al., 2012).

A primeira referência sobre o papel de *Mg. migonei* como vetor de LTA foi o encontro de um espécime naturalmente infectado por um flagelado, provavelmente promastigotas de *Leishmania* em 1941 por Pessoa & Coutinho, em São Paulo. Estudos posteriores mostraram o aumento coincidente entre casos de LTA e espécimes de *Mg. migonei* também em São Paulo (Camargo-Neves et al., 2002; Rangel; Lainson, 2009). No Rio de Janeiro, essa espécie vem sendo incriminada como provável vetor em algumas regiões como na Ilha Grande e Jacarepaguá, onde esse inseto apresenta preferência por picar cães, sendo associada à manutenção da LTA em cães, além do seu registro com infecção natural por *L. (V.) braziliensis* em Jacarépaguá (Pita-Pereira et al., 2005; Rangel; Lainson, 2009). Nos estados do Espírito Santo e Minas Gerais esse flebotomíneo também foi associado a áreas de ocorrência

de casos de LTA. No Nordeste, mais precisamente no estado do Ceará, Azevedo e colaboradores (1990) e Queiroz e colaboradores (1994) identificaram espécimes de *Mg migonei* naturalmente infectados por *L. (Viannia.) braziliensis*. Porém, como a espécie apresentava pouca antropofilia na região foi considerada apenas como um vetor secundário de LTA (Rangel; Lainson, 2009).

1.2.6 *Bichromomyia flaviscutellata* Mangabeira, 1942

Bichromomyia flaviscutellata possui uma ampla distribuição geográfica sendo encontrada em diferentes habitats como florestas primárias, secundárias e igapós. É uma espécie de hábitos essencialmente noturnos, altamente atraída por roedores, contudo pouco antropofílica, o que torna a transmissão da doença por esta espécie rara para humanos. Alguns autores citam a capacidade desse flebotomíneo de se adaptar rapidamente à áreas de vegetação modificada, podendo ser capturado até no peridomicílio, quando a habitação está próxima a mata (Ready et al., 1983; Lainson et al., 1994; Rangel; Lainson, 2009; Machado et al., 2012)

A competência vetorial de *Bi. flaviscutellata* como vetor de *L. (L.) amazonensis* está embasada em evidências: achado de infecção natural por *L. (L.) amazonensis*, atração por reservatórios, roedores, distribuição espacial coincidente com as áreas de transmissão, infecção e transmissão experimental da leishmânia pela picada, de hamster para hamster (Lainson; Shaw 1972, 1987, 2005; Rangel; Lainson 2009).

Esse flebotomíneo tem se dispersado por regiões geográficas no Brasil e, mais recentemente, Azeredo-Coutinho et al. (2007) reportaram o primeiro caso autóctone de leishmaniose anérgica difusa no Estado do Rio de Janeiro, no município de Paraty.

A Figura 1.8 ilustra a distribuição das principais espécies de vetores da LTA aqui discutidas.

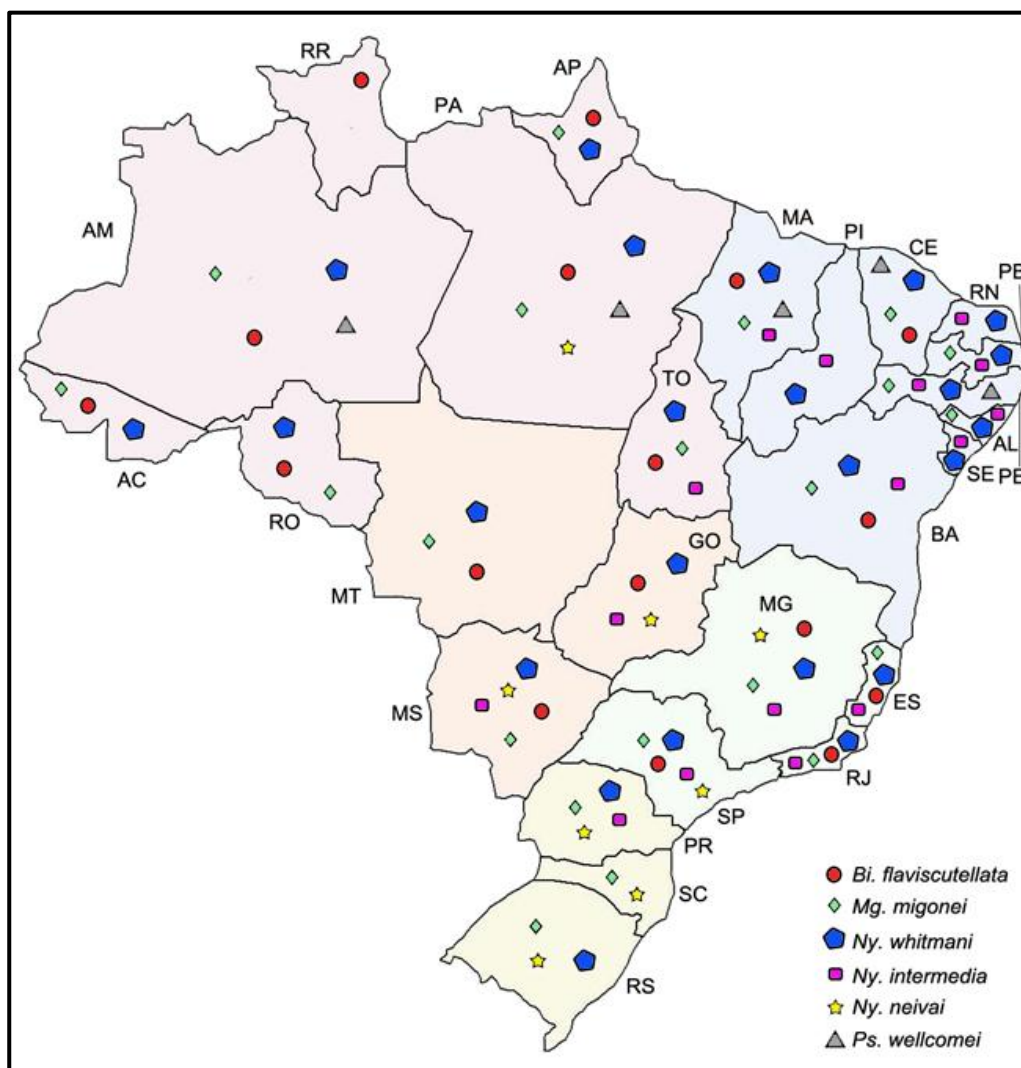


Figura 1.8 – Mapa com a distribuição das espécies vetoras mais importantes de *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* do Brasil. Criado a partir de dados de Galati (2003).

1.3 JUSTIFICATIVA

Phlebotominae representa um dos grupos de insetos de grande importância médica, especialmente para o Brasil, estando associado à transmissão de agentes das leishmanioses tegumentar e visceral. A complexidade que envolve um conhecimento mais apurado sobre a eco-epidemiologia destas doenças está especialmente no fato de que as cadeias de transmissão das leishmanioses têm uma diversidade dos seus componentes: parasitos, vetores e reservatórios, especialmente em relação à leishmaniose tegumentar, hoje dispersa por todos os Estados.

Em termos de taxonomia, a utilização dos gêneros *Lutzomyia* para a maioria das espécies do Continente Americano, bem como *Phlebotomus* e *Sergentomyia* para as espécies do Velho Mundo, tem sido sustentada por argumentos práticos no sentido de dar sustentabilidade a nomenclatura das espécies (Lewis et al., 1977, Martins et al., 1978). Entretanto, dentro desta perspectiva perdem-se informações importantes para o melhor entendimento do processo evolutivo de Phlebotominae.

A origem do gênero *Leishmania* foi discutida (Lainson; Shaw, 1987) na lógica de que os tripanosomatídeos evoluíram a partir de flagelados monogenéticos que habitavam o intestino de invertebrados e que posteriormente se adaptaram a um ciclo de vida no vertebrado. A partir dessa premissa, Lainson (1997) e Lainson & Shaw (2005) sugeriram que os flebotomíneos seriam os hospedeiros primários de *Leishmania* e os vertebrados, meras fontes de infecção para os flebotomíneos e, sendo assim, nas leishmanioses, a competência vetorial poderia ser associada a um processo co-evolutivo parasito-hospedeiro.

Estudos filogenéticos entre espécies de Phlebotominae, especialmente os vetores, podem inferir um processo evolutivo que levou o grupo a ser bem sucedido na transmissão de *Leishmania spp.* Sob esta ótica, a proposta taxonômica neste grupo de insetos com base na hipótese evolutiva merece estudos mais focados em flebotomíneos associados com a transmissão de leishmânias dos subgêneros *L. (Viannia)*, *Nyssomyia whitmani*, *Ny. neivai*, *Ny. intermedia*, *Migonemyia migonei*, e *L. (Leishmania)*, *Bichromomyia flaviscutellata*, inclusive apontando a consistência de grupos monofiléticos (Artemiev, 1991).

A geração de conhecimentos sobre a morfologia e morfometria de ambos, machos e fêmeas de flebotomíneos vetores de LTA, poderão indicar estruturas diagnósticas importantes como subsídios para estudos filogenéticos e co-evolutivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar por meio de análise morfológica/morfométrica comparativa a relação entre algumas espécies de flebotomíneos dos gêneros *Nyssomyia*, *Bichromomyia* e *Migonemyia*: *Ny. intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata*, vetores de *Leishmania* spp., responsáveis pela leishmaniose tegumentar americana no Brasil, além de *Brumptomyia troglodytes*, e avaliar se estas análises podem ser úteis para a separação dos grupos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a morfometria clássica e geométrica de caracteres das espécies supracitadas e identificar aqueles que possam servir de parâmetros para melhor distinção das espécies transmissoras de *Leishmania* dos Subgêneros *Viannia* e *Leishmania*;
- Identificar, através das morfometrias geométrica e clássica, variações nessas espécies de flebotomíneos que possam sugerir algum grau de relação entre elas.
- Estudar detalhadamente a morfologia de adultos (machos e fêmeas) das espécies supracitadas para selecionar caracteres que forneçam informações taxonômicas que possam subsidiar estudos filogenéticos futuros;

3 METODOLOGIA

3.1 NOMENCLATURA TAXONÔMICA

A nomenclatura taxonômica para Phlebotominae utilizada neste trabalho segue o proposto por Galati (1995) e as abreviaturas referentes aos gêneros seguem o proposto por Marcondes (2007).

3.2 CAPTURAS DE FLEBOTOMÍNEOS

As capturas foram realizadas no horário de atividade desses insetos, que vai do crepúsculo vespertino ao matutino (18:00h – 6:00h), utilizando-se dois tipos de armadilhas: luminosa do tipo HP (Pugedo et al., 2005), CDC modificada (Sudia; Chmaberlain, 1962), (Figura 3.1A) e armadilha de Shannon (Shannon, 1939) (Figura 3.1B) com auxílio do capturador manual de castro (Castro, 1937) (Figura 3.1C).

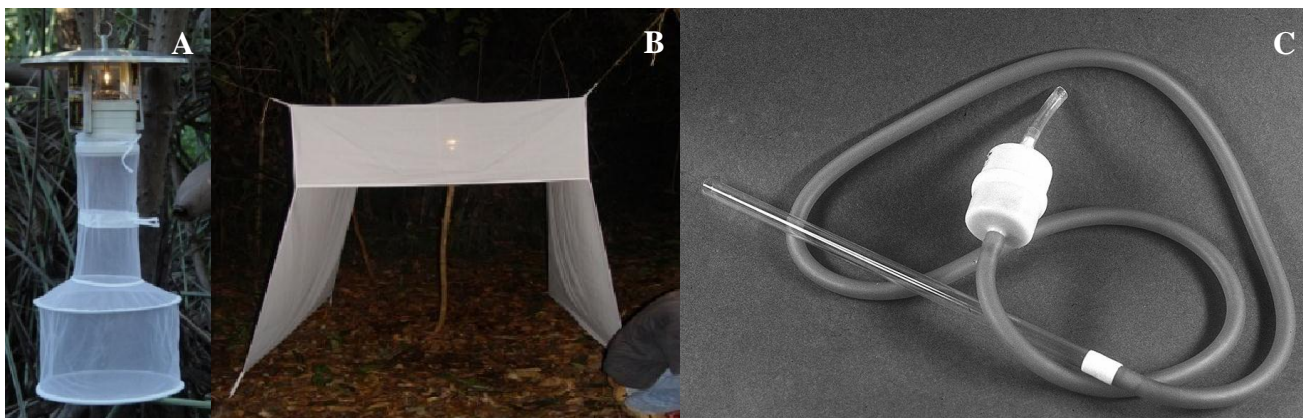


Figura 3.1 – Armadilhas utilizadas para captura de flebotomíneos: A – Armadilha luminosa do tipo HP, B – Armadilha de Shannon, C – Capturador manual de Castro.

3.2.1 Procedência das espécies capturadas

Na Figura 3.2 estão as localidades onde as quatro espécies foram capturadas durante o ano de 2011 e 2012.

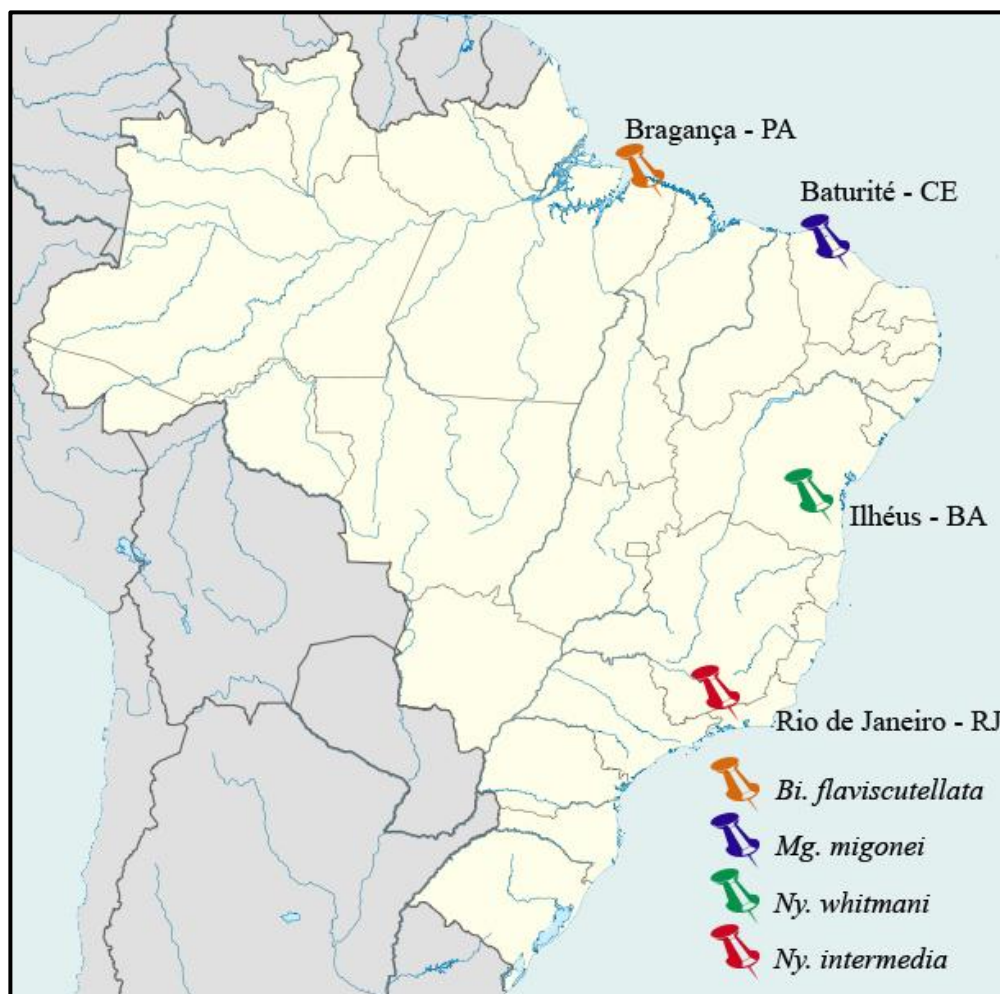


Figura 3.2 – Mapa com as áreas de capturas de cada espécie de flebotomíneo utilizada no trabalho.

3.3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL DOS FLEBOTOMÍNEOS

Após as capturas, os insetos foram triados, separando-se os flebotomíneos (machos e fêmeas) dos demais insetos e acondicionando-os em álcool 70%, em tubos falcon separados e devidamente identificados, constando o local da captura, a data e a identificação da espécie.

3.3.1 Clarificação e Diafanização

Para estes procedimentos foi utilizado o tratamento proposto por Forattini (1973), onde: em capela de exaustão de gases (Q216-11 e Q216-21 Marca Quimis®), machos e fêmeas foram separados em cavidades diferentes de placas de toque de 9 poços, onde estes foram primeiramente colocados em fenol P.A. por 24 horas para diafanizar, seguido de 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 solução de fucsina ácida e ácido acético P.A., nas concentrações de 5% para fêmeas e 1% para os machos, 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.

3.3.2 Montagem

Após o processo de clarificação os espécimes foram montados entre lâmina e lamínula em meio de montagem Enecê (Cerqueira, 1943), com auxílio de microscópio estereoscópico (Estereomicroscópio Stemi DV4 Marca Zeiss®). Os insetos foram seccionados, para a visualização das estruturas de importância taxonômica. Nos machos a cabeça foi separada do tórax e colocada em vista dorsal e o tórax e abdômen foram mantidos juntos e colocados em vista lateral (Figura 3.3 A); nas fêmeas, foram separadas a cabeça, o tórax e o abdômen, colocando-os em vista ventral (visualização do cibário), lateral e ventral (visualização da espermateca), respectivamente (Figura 3.3B). Em todos os espécimes uma das asas foi retirada e colocada longitudinalmente para realização das morfometrias clássica e geométrica.



Figura 3.3 – Flebotomíneos montados entre lâmina e lamínula com meio Enecê. A – espécime Macho, B – espécime Fêmea.

3.4 MATERIAL DE COLEÇÃO BIOLÓGICA

Foram utilizados flebotomíneos, de duas espécies, provenientes das Coleções da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP): *Ny. neivai* dos municípios de Eldorado, Itariri, Iporanga e Pedro de Toledo, todos esses fazendo parte da região conhecida como Vale do Ribeira no Estado de São Paulo (Figura 3.4).

A espécie *Brumptomyia troglodytes* foi utilizada como grupo externo, onde os espécimes foram capturados nas localidades Iporanga, Barra Bonita e Ariri municípios do estado de São Paulo. Os espécimes da coleção foram clarificados e montados utilizando-se a mesma metodologia descrita acima.

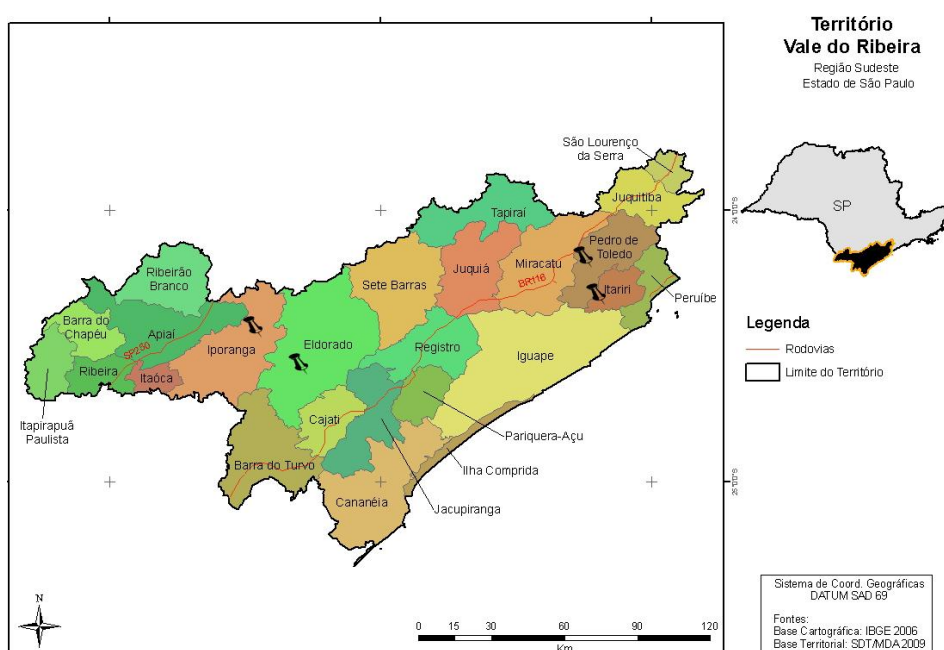


Figura 3.4 – Mapa dos municípios localizados no Vale do Ribeira destacando-se aqueles onde os espécimes de *Nyssomyia neivai* utilizadas no projeto foram capturados.

3.5 MORFOLOGIA

Para a descrição da morfologia foram utilizados 20 machos e 20 fêmeas de cada espécie analisando-se 52 caracteres, da cabeça, do tórax e do abdômen considerados importantes para a caracterização taxonômica das espécies. Os caracteres avaliados, separados por segmento do corpo e a localização da figura demonstrativa (Anexo) estão listados na Tabela 3.1. Quanto a coloração de estrutura do tórax foram utilizadas 3 cores para definir a variação das espécies, Pálido, castanho claro e castanho escuro.

Tabela 3.1 – Caracteres utilizados para avaliação da morfologia das espécies de flebotomíneo.

	Caracteres Morfológicos	Figuras
Cabeça	Presença/Ausência de Sutura-Interocular	A1.A
	Fórmula Palpal	A1.B
	Presença/Ausência de Forquilha Labial	A1.C
	Prolongamento dos Ascóides	A1.D
	Presença/Ausência de Prolongamento anterior dos Ascóides (AIII e AIV)	A1.E
	Local de Implantação dos Ascóides	A1.F
	Presença/Ausência de Papila em AIII, AIV e AV	A1.E
	Presença/Ausência e Posição dos Espinhos de Newstead no Palpômero III	A1.G
	Número de fileiras de dentes na Lacínia da Maxila	A1.H
	Número de Dentes na Lacínia da Maxila	A1.H
	Presença/Ausência de Área Esclerosada na Câmara Cibarial	A1.I
	Número e Posição dos Dentes Horizontais no Cibário	A1.J,K
	Tórax	Presença/Ausência de Cerdosidade na Parte Anterior do Catepisterno
Presença/Ausência de Sensila Ventrocervical		A2.B
Pigmentação do Escudo (Pronoto, Paratergito, Escutelo)		A2.C
Pigmentação dos Escleritos Torácicos (Anespisterno (superior e inferior), Anepímero, Catepisterno, Catepímero, Metepímero e Metepisterno)		A2.C
Aspecto do Duto comum		A2.E
Aspecto do Duto Individual		A2.D,E
Abdômen Fêmea	Aspecto do Corpo da Espermateca	A2.D,E,F,G,H
	Presença/Ausência e Número de Anéis da Espermateca	A2.D,E,H
	Presença/Ausência de Cabeça na Espermateca	A2.D,E,F,G,H
	Ângulo da Cabeça em relação ao corpo da Espermateca	A2.D,E,F,G,H
	Presença/Ausência de Protuberância Esclerotizada no 9º Tergito	A2.I
	Abdômen Macho	Aspecto da Parte Apical do Lobo Lateral
Forma e Aspecto do Edeago		A3.A e A4.E
Presença/Ausência de Processos no Parâmero		A3.B
Presença/Ausência de Cerdas Diferenciadas		A3.B
Aspecto da Parte Apical do Parâmero		A3.B,C,E
Presença/Ausência de Tudo de Cerdas na Base do Gonocoxito		A3.D,E
Número de Cerdas na Base do Gonocoxito		A3.D,E
Presença/Ausência de Cerda Subterminal no Gonocoxito		A3.F
Número de Espinhos do Gonóstilo		A3.C,F
Posição dos Espinhos no Gonóstilo		A3.C,F
Forma da Porção Final dos Filamentos Genitais		A4.A,B,C,D,E,F
Presença de Cerdas Longas na Parte Apical do Gonocoxito		A4.G
Presença/Ausência de Protuberância Esclerotizada na Base do Gonocoxito		A3.G

3.6 MORFOMETRIA CLÁSSICA

As medições das estruturas foram realizadas utilizando o programa AxioVision versão 4.7 (Zeiss, 2008), através de imagens capturadas com microscópio óptico (Primo Star Marca Zeiss®) acoplado a câmera AxioCam ICc1 (Figura 3.5). As medidas foram realizadas em micrômetros (μm) utilizando-se os aumentos de 4x, 10x, 20x, e 40x.



Figura 3.5 – Microscópio óptico Primo Star Marca Zeiss® acoplado com câmera AxioCam ICc1.

Foram utilizados 20 machos e 20 fêmeas de cada espécie para realizar as medidas, com um total de 59 estruturas, sendo 10 próprias de machos e 9 de fêmeas. Essas estruturas estão listadas na Tabela 3.2, bem como a metodologia utilizada para medi-las.

Tabela 3.2 – Caracteres utilizados na morfometria clássica com respectiva metodologia adotada para medição.

Caracteres Morfométricos		
Estrutura	Método de Medição	
Cabeça	Comprimento da Cabeça	da Parte Apical até o Final do Clípeo
	Comp. do Clípeo	da Sutura Frontoclipeal até o final da estrutura
	Comp. do Labroepifarínge	da inserção no clípeo até o ápice
	Comp. do Lábio	da inserção na cabeça até o ápice
	Comp. dos Palpos (I - V)	da Base ao ápice de cada artícuo
	Menor Distância Entre os Olhos	próximo a inserção da Sutura Inter-ocular
	Comp. dos Flagelômeros (AIII, AIV, AXIII e AXIV)	da Base ao ápice de cada artícuo
	Largura da Câmara Cibarial	Maior distância entre os escleritos laterais
Comp. da Câmara Cibarial	do ápice dos escleritos laterais até a base dos dentes horizontais	
Tórax	Comp. R5	da Base da nervura ao ápice da asa
	Comp. α	Comprimento da nervura R2
	Comp. β	Comprimento do Ramo R2+3
	Comp. δ	do ponto de bifurcação de R2 e R3 Até o ápice de R1
	Comp. γ	Comprimento do Ramo R2+3+4
	Comp. do Fêmur (Anterior, Médio e Posterior)	da Inserção na Coxa até o Início da Tíbia
	Comp. da Tíbia (Anterior, Médio e Posterior)	da Inserção no Fêmur até o início do 1º Tarsômero
	Comp. Do Tarsômero I - V (Anterior, Médio e Posterior)	da Inserção até o Início do artícuo posterior
Abdomen Fêmea	Comp. Corpo da Espermateca	do final dos dutos individuais até o ápice (sem incluir a cabeça)
	Largura Corpo da Espermateca	medida no Anel mais largo ou na porção mais larga
	Comp. Dos Cercos	da sua inserção no 10º tergito até a extremidade da estrutura
	Comp. Dutos Individuais	da base da Inserção no Duto Comum até o início do Corpo da Espermateca
	Largura dos Dutos Individuais	Maior largura entre as laterais do duto individual
	Comp. Duto Comum	da Abertura da Câmara genital até o Início dos Dutos Individuais
	Largura do Duto Comum	Maior largura entre as laterais do duto comum
Abdomen Macho	Comp. Gonocoxito	da sua inserção no 9º tergito até a extremidade da estrutura na inserção do Gonóstilo
	Largura Gonocoxito	Maior Largura próxima a Base da Estrutura
	Comp. Gonóstilo	da sua inserção no Gonocoxito até o ápice da estrutura
	Comp. Lobo Lateral	da inserção no Abdomen a extremidade da estrutura
	Largura Lobo Lateral	No meio da estrutura
	Comp. Pistão	da base da Estrutura até a extremidade bifurcada
	Comp. Bomba Genital	da base do Pistão a inserção dos dutos ejaculadores
	Comp. Filamentos Genitais	da inserção na bomba ejaculadora até a extremidade
	Comp. da ponta dos Filamentos Genitais	da base da parte modificada até o ápice
Distância entre o Espinho Apical e o Externo Superior	da implantação do espinho externo Apical até a implantação do Espinho Apical	

A análise intraespecífica foi feita nos 40 espécimes de cada espécie comparando-se estruturas pertencentes tanto em macho quanto em fêmea para a definição de caracteres que poderiam ser significativamente diferentes entre os sexos. Foram utilizados os comprimentos das seguintes estruturas: Cabeça, Clípeo, Labro-epifarínge, Lábio, Palpos I, II, III, IV e V, Flagelômeros I, II, XIII e XIV, Menor Distância entre os Olhos, nervura R5, Alfa, Beta, Gama, Delta, Fêmures, Tíbias e Tarsômeros I, II, III, IV e V, anteriores, medianos e posteriores.

Para a análise interespecífica foram utilizados testes de variância (ANOVA) com pós-testes de Student Newman Keuls e Tukey para os caracteres paramétricos e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para os não paramétricos (sendo estes os comprimentos da cabeça, do lábio e do labro, dos palpos I, II, III e IV e da Largura do duto comum e da razão dos filamentos genitais em relação a bomba genital) para identificação de caracteres que mais diferenciam ou agrupam as espécies. Para isso foram realizadas análises diferentes, uma análise geral com os caracteres presentes tanto em macho quanto em fêmea (mesmos utilizados na análise intraespecífica), uma análise específica de características do abdômen de fêmeas e uma específica do abdômen de machos. Estruturas como o Duto comum (ausente em *Br. troglodytes*), Comprimento da ponta do filamento genital (estrutura não diferenciada em *Mg. migonei* e *Br. troglodytes*) e a razão do filamento genital pelo final do filamento genital foram analisados separadamente por não estarem presentes em todas as espécies.

Para fazer o agrupamento das espécies através dos dados morfométricos foram feitas 3 análises discriminantes, uma com as características compartilhadas (encontradas em machos e fêmeas) (240 espécimes), uma com as características compartilhadas mais as características específicas de machos (120 espécimes) e uma com as características compartilhadas mais estruturas específicas de fêmeas (120 espécimes). Para os dados específicos de cada sexo algumas estruturas que não estão presentes em todas as espécies foram excluídas, para que a análise pudesse ser realizada, com isso foram utilizados 38 caracteres para análise com as características compartilhadas, 48 para análise dos machos e 43 para a análise das fêmeas. As estruturas utilizadas para fazer cada uma das análises estão citadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Índice com as estruturas utilizadas nas análises discriminantes.

Estruturas utilizadas na Análise Discriminante		
Características compartilhadas	Características Específicas de Macho	Características Específicas de Fêmea
Comp. frontal cabeça	Comp. coxito	Comp. corpo da espermateca
Comp. labro-epifaringeo	Lar. coxito	Lar. corpo da espermateca
Comp. labio	Comp. dististilo	Comprimento dos cercos
Comp. palpo I - V	Comp. lobo lateral	Comp. dutos individuais
Comp. clipeo	Lar. lobo lateral	Larg. dutos individuais
Menor distância entre olhos	Comp. pistão	
Comp. flagelômero I e II	Comp. bomba genital	
Comp. R5	Comp. filamento genital	
Comp. alfa	Razão filamento/bomba	
Comp. beta	Distância entre o espinho apical e o externo sup.	
Comp. gama		
Comp. delta	Mais as Características compartilhadas	Mais as Características compartilhadas
Comp. fêmur anterior, mediano, posterior		
Comp. tíbia anterior, mediana, posterior		
Comp. tarsômero I - V anterior, media e posterior		

3.7 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS

A análise da Morfometria Geométrica foi realizada considerando 13 marcos anatômicos (landmarks) 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 (1992) (Figura 3.6).

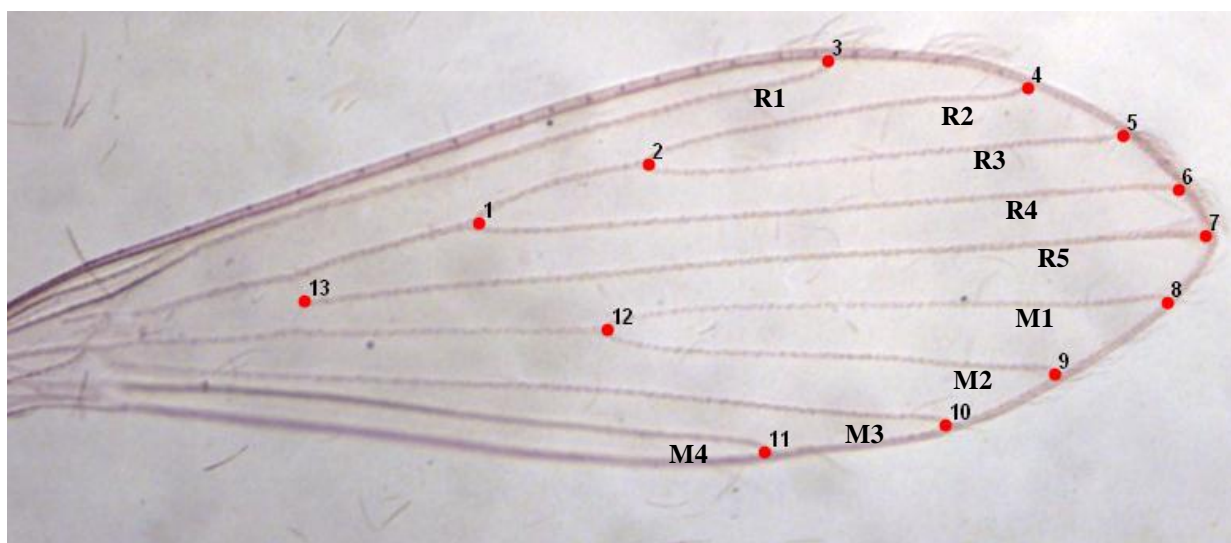


Figura 3.6 – Marcos anatômicos utilizados para Análise da Morfometria Geométrica das asas das espécies de flebotomíneos. Asa de *Ny. whitmani*.

Os marcos anatômicos foram marcados nas seguintes posições da asa: marco 1 na bifurcação R2+3+4, marco 2 na bifurcação R2+3, marcos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 correspondendo respectivamente ao ápice de R1, R2, R3, R4, R5, M1, M2, M3, M4, marco 12 na bifurcação de M1+2 e marco 13 na base de R5.

Para a marcação dos pontos, foram tiradas fotos das asas de um total de 52 espécimes para cada espécie, utilizando-se microscópio óptico (Primo Star Marca Zeiss®), com aumento de 4x, acoplado a câmera AxioCam ICc1, ligados a um computador rodando o programa AxioVision versão 4.7 (Zeiss®, 2008). Todas as imagens foram identificadas com o nome da espécie e um número para registro do material que foi utilizado, para facilitar a posterior identificação nos processos de análise da morfometria. As fotos, então, foram catalogadas em ordem alfabética em uma mesma pasta e com o auxílio do programa TpsUtil, versão 1.47 (Rohlf, 2010), 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, 2010). Usando o TpsDig 2.16 (Rohlf, 2010) foram marcados os 13 marcos anatômicos, como mostrado na figura anterior, de todos os 260 espécimes, gerando um arquivo de texto com as coordenadas cartesianas que foram utilizadas posteriormente para analisar aspectos da geometria da asa e identificar as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs).

Foram analisadas 305 asas das 6 espécies estudadas, sendo 52 para cada, metade para cada sexo, exceto para *Ny. neivai* (para a qual foram utilizados 29 asas de fêmeas e 23 de machos) e *Br. troglodytes* (onde foram utilizadas 17 asas de fêmeas e 28 de machos). Foi realizada primeiramente a Análise Generalizada de Procrustes (AGP), onde as formas passam por 3 passos: (1) Translação, onde os centróides são centralizados na origem, (2) Proporcionalização, transformando o tamanho de centroide para 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 1000 testes de permutação, para medir a acurácia. Para identificar se a diferenciação das espécies foi significativa foram realizados os teste 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 centróide foram exportados do MorphoJ e analisados utilizando análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey no programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, 2007)

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados morfométricos, primeiramente as variáveis foram avaliadas separadamente por espécie através do teste de Kolmogorov-Smirnov, para identificar se seguiam uma distribuição normal (paramétricos) ou não (não paramétricos). Após esse teste, os caracteres paramétricos foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA), com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey, para avaliar os possíveis agrupamentos das espécies através de suas médias. Para as variáveis não paramétricas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, visando obter os mesmos resultados dos testes paramétricos.

Para a análise discriminante das espécies, foram realizadas análises de variáveis canônicas e função discriminante para obter o melhor agrupamento entre os grupos de espécies. Nessa análise, também foram avaliados os valores de F e do teste de Wilks' Lambda, para avaliar os caracteres que mais contribuíram para a discriminação dos grupos específicos na função discriminante.

A análise intra-específica foi realizada utilizando teste t de amostras independentes para avaliar se havia variação significativa entre as medidas dos caracteres compartilhados de machos e fêmeas da mesma espécie. A avaliação dos dados morfológicos foi feita através da análise de frequência para verificar a ocorrência de cada característica nas espécies.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

4.1.1 Tamanho dos Centróides e ANOVA de Procrustes

A análise de Variância de Procrustes para as formas das asas mostrou valor dos quadrados médios de aproximadamente 0,014 (valor que representa a distância da amostra em relação à média), com 110 graus de liberdade e valor de $F = 178,93$ (valor da variância entre os grupos), com significância de $p < 0,0001$ (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Valores dos Quadrados médios de Procrustes, Graus de liberdade, Valor de F e significância do teste de ANOVA de Procrustes.

	Quadrados Médios	Graus de Liberdade	Valor de F	Valor de p
ANOVA de Procrustes para Forma	0,014000258	110	178,93	<.0001

A análise do tamanho do centróide mostrou uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre *Br. troglodytes* e as demais espécies, o mesmo ocorrendo para *Mg. migonei*, tendo estes o maior e o menor valor para essa variável respectivamente, e também em *Ny. neivai*. *Bi. flaviscutellata* não apresentou diferença significativa para *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*. A comparação entre apenas as espécies do gênero *Nyssomyia* mostrou que não há diferença entre as espécies de *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*, porém ambas são significativamente diferentes de *Ny. neivai* (Figura 4.1).

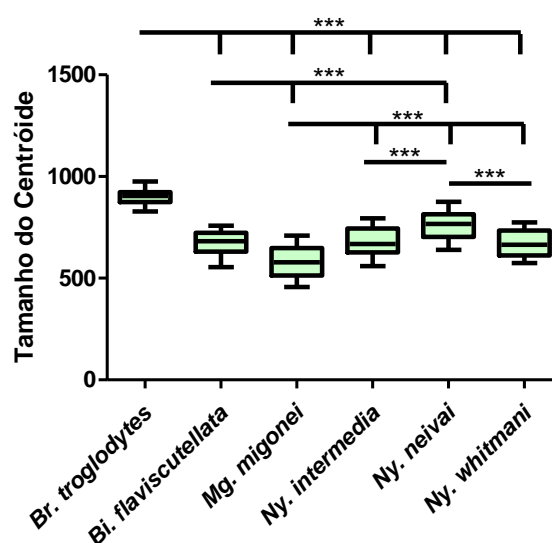


Figura 4.1 Gráfico mostrando a comparação entre o tamanho dos centróides das espécies estudadas. (***) = $P < 0,0001$)

4.1.2 Análise dos Componentes Principais

A utilização de 13 marcos anatômicos em 2 dimensões (eixo X e Y), resultou em 22 variáveis (Componentes Principais), sendo esse número obtido através da multiplicação do número de marcos anatômicos pelo número de dimensões menos 4 que é o número de graus de liberdade perdidos após a Análise Generalizada de Procrustes. Os 3 primeiros componentes principais apresentaram 85,088% da variação presente na amostra, sendo a representação deles respectivamente 46,108% (PC1), 27,928% (PC2) e 11,052% (PC3), visto que a ordenação dos componentes se dá em ordem decrescente de acordo com a variação.

Analisando a variação nos componentes principais podemos perceber que no primeiro componente a asa apresenta tendência (pontos negativos para os positivos) no alargamento da parte mediana da asa, com grande deslocamento do ponto 3 (extremidade de R1), para um região mais anterior e mais externa e que conseqüentemente leva ao deslocamento do ponto 11 (Figura 4.2A) e na diminuição da parte anterior de R5 (marco anatômico 13). Essas modificações podem ser observadas nas figuras 4.2D e 4.3B, onde se nota que as formas com R5 mais alongada e mais estreita na parte mediana pertencem às espécies de *Nyssomyia* (traço azul claro na figura 4.2A), havendo uma gradativa diminuição de R5 anteriormente e alargamento da parte mediana, com o máximo dessa diferenciação ocorrendo em *Br. troglodytes* e *Bi. flaviscutellata* (traço azul escuro Figura 4.2A). No segundo componente, a variação ocorre nos pontos 13, com redução acentuada de R5, grande deslocamento para a parte anterior do ponto 1 e diminuição da largura na parte mediana da asa (Figura 4.2B). A modificação das asas pode ser vista na Figura 4.2B com a forma da asa representada pela linha azul clara representando as formas médias mais próximas ao formato da asa de *Br. troglodytes* (pontos mais negativos na Figura 4.2D e 4.3A), e a linha azul escura representando as asas com forma mais próximas a *Bi. flaviscutellata* (formas mais positivas na Figura 4.2D). O componente principal 3 pouco separa os grupos, devido à baixa variabilidade deste componente, porém podemos perceber que sua variação se dá principalmente no alongamento do ápice da asa e deslocamento do marco 12 posteriormente, onde pontos mais negativos representam as formas mais próximas a *Br. troglodytes* (linha azul clara na Figura 4.2C) e as mais positivas de *Mg. migonei* (linha azul escura Figura 4.2C). A análise dos gráficos mostrou que pode se diferenciar os gêneros de espécie quando comparados os dois componentes principais correspondentes a maior variação (PC1 e 2), havendo apenas alguns espécimes de *Mg. migonei* em ponto de interseção com espécimes do gênero *Nyssomyia* (Figura 4.2D). Foi observado que o PC1 separa as formas das asas em dois

grupos, um com os pontos negativos representadas pelas espécies de *Nyssomyia* e de *Mg. migonei* e outro grupo apresentando pontos positivos com *Bi. flaviscutellata* e *Br. troglodytes* (Figura 4.2 D e 4.3B), o PC2 apresentou diferença acentuada entre essas duas últimas espécies (Figura 4.2 D e 4.3A), enquanto que o PC3 adicionou pouca variabilidade para diferenciação dos grupos (Figura 4.3A e B).

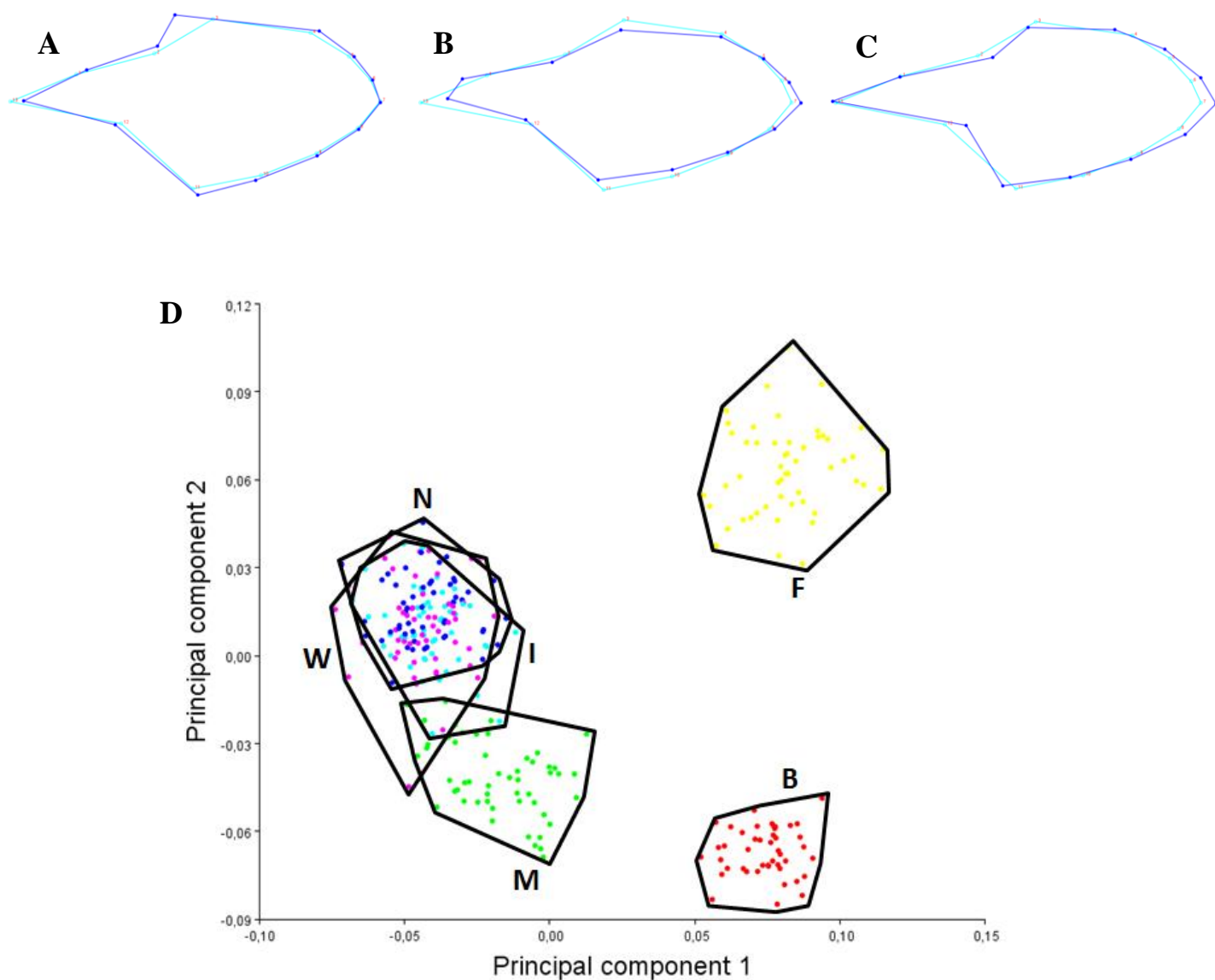


Figura 4.2 Análise dos Componentes Principais que apresentaram maior variação. Variação das Asas nos Componentes Principais 1 -A, 2 -B e 3 -C, mostrando as formas médias negativas (linha azul clara) e positivas (azul escuro). D – Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparados os PC1 e 2. B, *Br. troglodytes*; F, *Bi. flaviscutellata*; I, *Ny. intermedia*; M, *Mg. migonei*; N, *Ny. neivai*; W, *Ny. whitmani*.

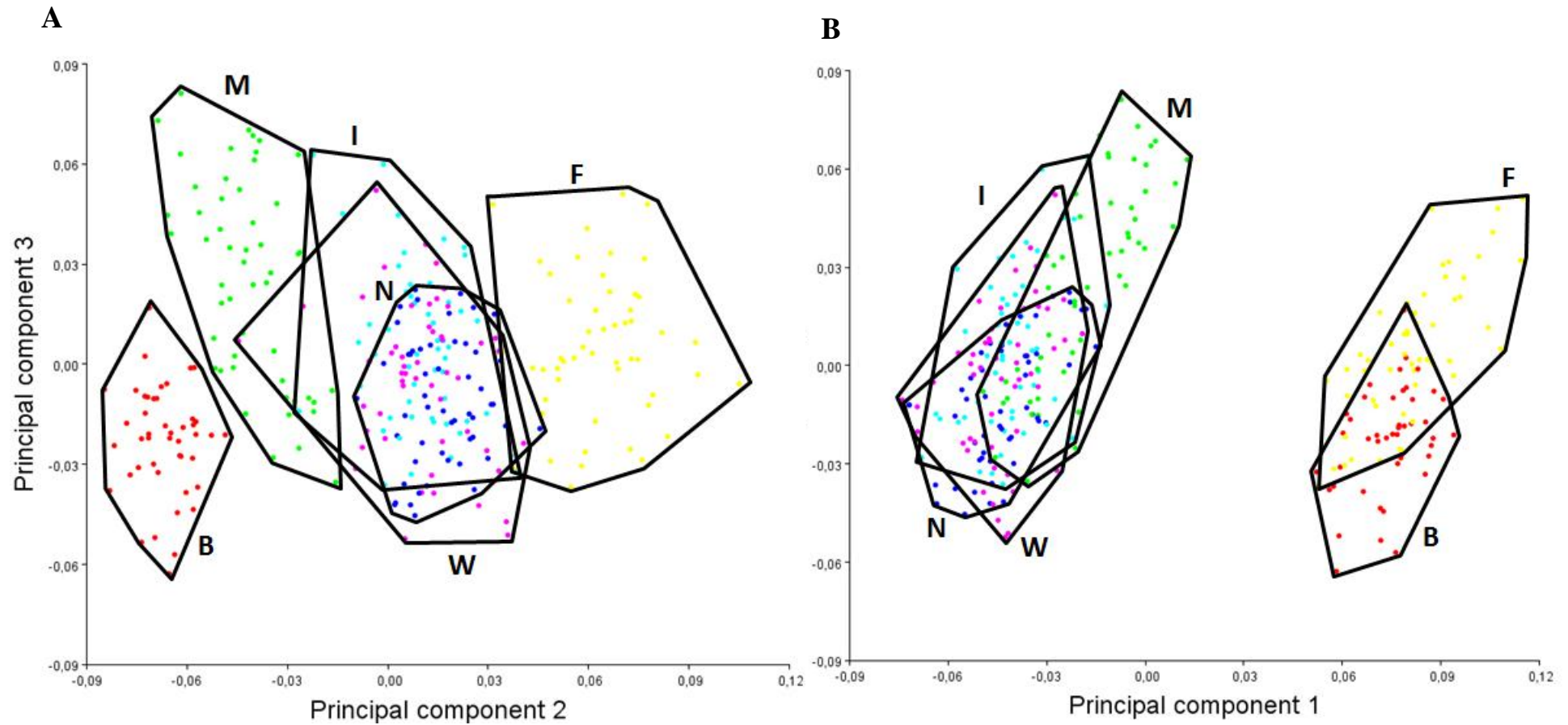


Figura 4.3 Análise dos Componentes Principais 1 e 2 em comparação com o PC3. A – Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparados os PC2 e 3. B – Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparados os PC1 e 3. B, *Br. troglodytes*; F, *Bi. flaviscutellata*; I, *Ny. intermedia*; M, *Mg. migonei*; N, *Ny. neivai*; W, *Ny. whitmani*

4.1.3 Análise das Variáveis Canônicas

A análise das asas das 6 espécies utilizadas no projeto resultou em 5 variáveis canônicas, que, assim como os componentes principais são ordenadas em forma decrescente de variação. Destas 5 variáveis, as 3 primeiras corresponderam a 99,059% de toda a variabilidade da amostra, sendo suas respectivas contribuições de 59,451% para a Variável Canônica 1 (CV1), 33,402% Variável Canônica 2 (CV2) e de 6,206% para a Variável Canônica 3 (CV3).

A separação dos gêneros pode ser visualizada nos CV1 e 2, havendo apenas interseção nas espécies do gênero *Nyssomyia*, podendo-se perceber que a primeira variável separa bem todos os grupos e a segunda mostra de forma mais clara a diferenciação entre *Bi. flaviscutellata* e *Br. troglodytes*.

As variações na forma da asa apresentadas no CV1 mostram uma tendência para o alargamento da asa na parte mediana da asa devido principalmente ao deslocamento dos pontos 3 (para região basal) e 11 (para região apical) (Figura 4.4 A e D). A variação no CV1 se dá de espécimes de *Nyssomyia* (pontos mais negativos) com asas mais estreitas medialmente até espécimes de *Br. troglodytes* (pontos mais positivos) com asas mais largas na parte mediana (4.4 D e 4.5 A).

O CV2 mostra a tendência no aumento de R5 anteriormente (marco 13) e deslocamento dos marcos 3 (para região apical) e 11 (para a região basal) e uma ligeira diminuição da parte apical da asa (Figura 4.4 B e D). Na CV2 a variação ocorre de espécimes de *Bi. flaviscutellata* que possui asas com R5 mais curta basalmente e ápice mais alongado até espécimes de *Mg. migonei* e *Br. troglodytes* com asas pouco mais largas na parte mediana e R5 mais longa basalmente (4.4 D e 4.5 B).

O CV3 mostrou uma tendência para o deslocamento do marco 13 (base de R5) 12 e 11 e diminuição do ápice da asa (asa mais abaulada) (4.4 C e 4.5 A e B). A análise das figuras 4.5 A e B mostrou que existe pouca separação das espécies, devido a baixa variabilidade de CV3, e que as formas mais negativas são aquelas representadas pelos espécimes de *Mg. migonei* e as mais positivas nas espécies *Ny. whitmani* e *Br. troglodytes*.

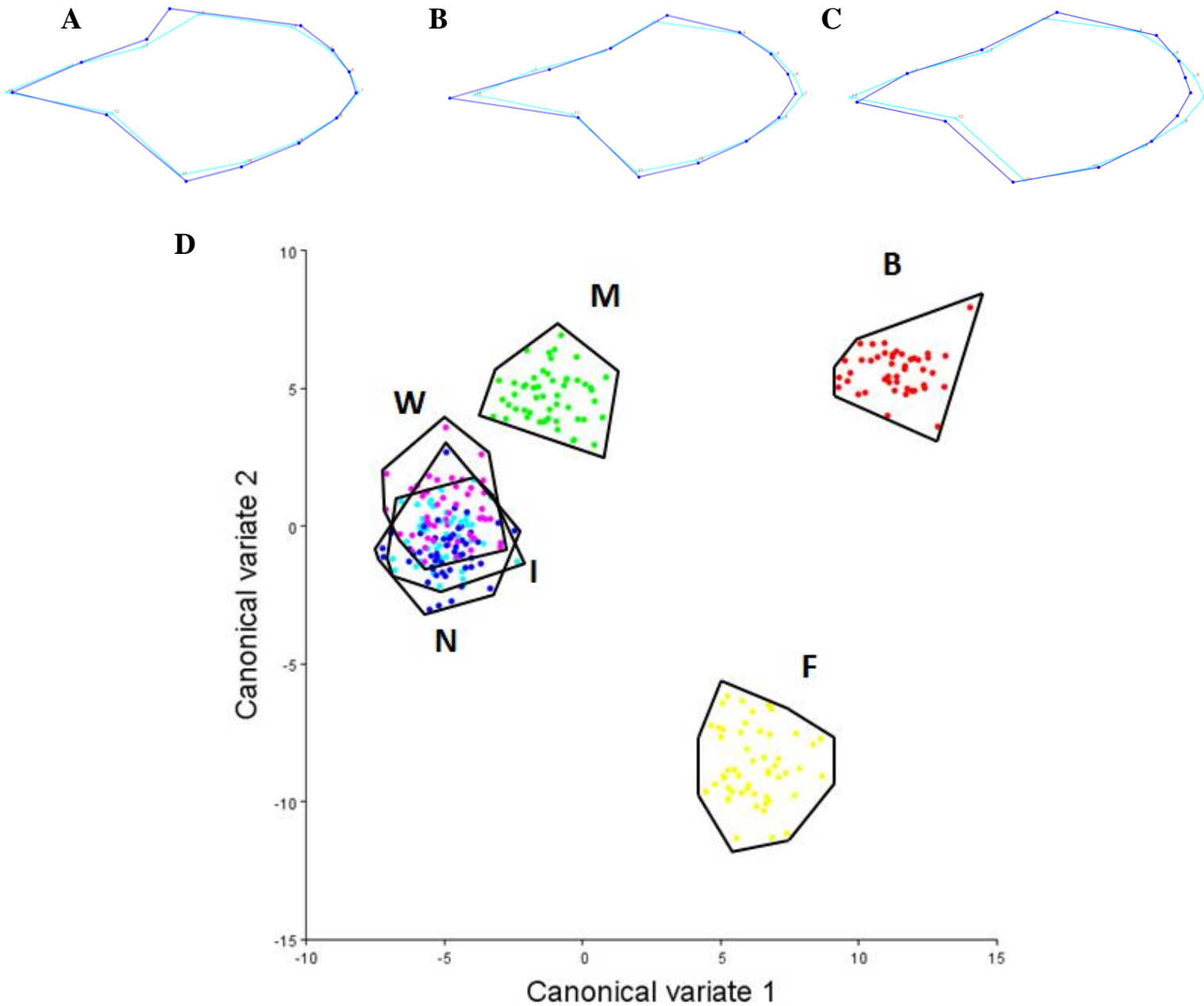


Figura 4.4 Análise das Variáveis Canônicas que apresentaram maior variação. Variação das Asas nas Variáveis Canônicas 1 -A, 2 -B e 3 -C, mostrando as formas médias negativas (linha azul clara) e positivas (azul escuro). D – Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparados os CV1 e 2. B, *Br. troglodytes*; F, *Bi. flaviscutellata*; I, *Ny. intermedia*; M, *Mg. migonei*; N, *Ny. neivai*; W, *Ny. whitmani*.

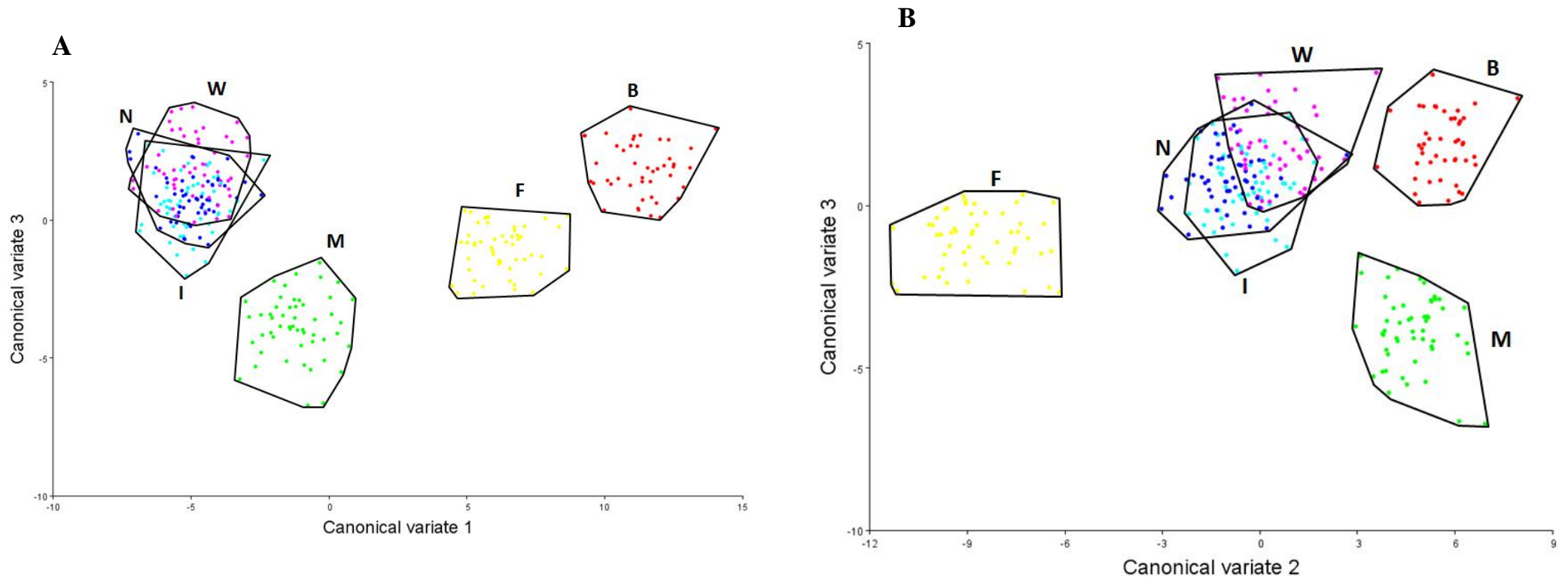


Figura 4.5 Análise das Variáveis Canônicas 1 e 2 em comparação com o PC3. A – Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparados os CV1 e 3. B – Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparados os CV2 e 3. B, *Br. troglodytes*; F, *Bi. flaviscutellata*; I, *Ny. intermedia*; M, *Mg. migonei*; N, *Ny. neivai*; W, *Ny. whitmani*.

A análise das variáveis canônicas utilizando apenas as espécies do gênero *Nyssomyia* mostrou uma área de interseção entre as três espécies, com alguns poucos espécimes sendo 4 de *Ny. intermedia*, 2 de *Ny. neivai* e 6 de *Ny. whitmani*, sendo estes respectivamente 7,7%, 3,9% e 11,5% do total de espécimes analisados de cada uma. A sobreposição de espécies ocorre principalmente entre *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* e entre a primeira e *Ny. whitmani* (Figura 4.6).

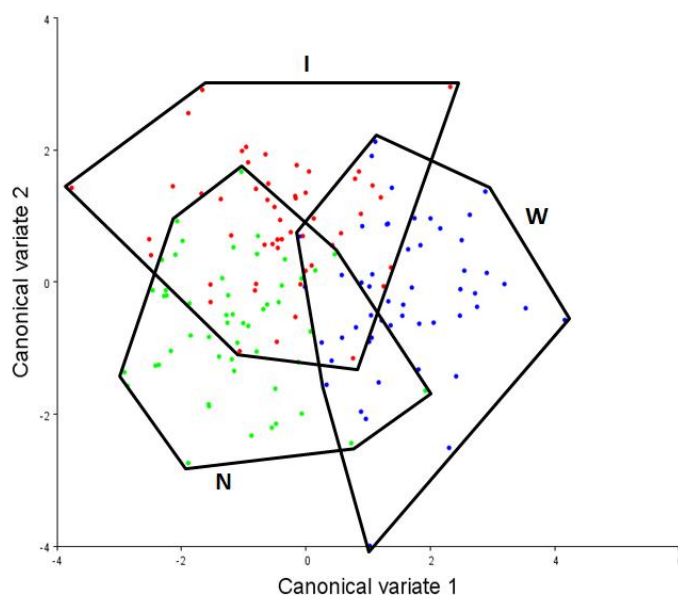


Figura 4.6 Análise das Variáveis Canônicas das espécies do gênero *Nyssomyia*. I, *Ny. intermedia*; M, *Mg. migonei*; N, *Ny. neivai*; W, *Ny. whitmani*.

As distâncias de Mahalanobis, obtidas através da distância entre as formas médias dos grupos, gerada após a discriminação das mesmas, mostrou que *Br. troglodytes* está feneticamente mais próxima de *Mg. migonei* (13,7931) do que de *Bi. flaviscutellata* (15,4929) e das espécies de *Nyssomyia* respectivamente. As espécies do gênero *Nyssomyia* também se apresentam mais próximas de *Mg. migonei* do que de *Bi. flaviscutellata*. Dentro do gênero *Nyssomyia* as distâncias foram muito reduzidas sendo a menor entre *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* (1,6403) e a maior entre *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* (2,8317) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Distâncias de Mahalanobis entre as formas médias das asas das espécies de flebotomíneos utilizadas no projeto.

Espécies	<i>Br. troglodytes</i>	<i>Bi. flaviscutellata</i>	<i>Mg. migonei</i>	<i>Ny. intermedia</i>	<i>Ny. neivai</i>
<i>Bi. flaviscutellata</i>	15,4929				
<i>Mg. migonei</i>	13,7931	15,5696			
<i>Ny. intermedia</i>	17,5565	14,1328	7,8832		
<i>Ny. neivai</i>	17,6093	13,8055	8,347	1,6403	
<i>Ny. whitmani</i>	17,054	14,6954	8,0886	2,3242	2,8317

4.1.4 Análise da Função Discriminante

Os resultados obtidos com a Análise da Função Discriminante, utilizando-se 1000 testes de permutação, mostraram que houve 100% de classificação correta (CC) mesmo após a validação cruzada (VC), quando comparadas às asas de *Brumptomyia troglodytes*, *Bichromomyia flaviscutellata* e *Migonemyia migonei* com as demais espécies, onde os valores de p para as distâncias de Procrustes e de Mahalanobis após os testes de permutação e para o teste t^2 foram menores que 0,0001 (Tabela 4.3). Com relação às 3 espécies do grupo *Nyssomyia* os valores de p para estes três testes também foram significativos com $p < 0,0001$, apenas entre *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* que o valor de p após os 1000 testes de permutação para a distância de procrustes foi menor que 0,001.

Tabela 4.3 Resultados da Análise Discriminante mostrando os valores do teste t^2 e dos valores de p após os 1000 testes de permutação para as distâncias de Procrustes e de Mahalanobis, entre os pares de espécies.

	T ²	Valor de p após 1000 testes de permutação	
		para as Distâncias de Procrustes	para as Distâncias de Mahalanobis
<i>Br. troglodytes</i> -- <i>Bi.flaviscutellata</i>	5748,1154	<.0001	<.0001
<i>Br. troglodytes</i> -- <i>Mg.migonei</i>	5177,8407	<.0001	<.0001
<i>Br. troglodytes</i> -- <i>Ny.intermedia</i>	8557,7401	<.0001	<.0001
<i>Br. troglodytes</i> -- <i>Ny.neivai</i>	8838,3772	<.0001	<.0001
<i>Br. troglodytes</i> -- <i>Ny.whitmani</i>	8615,2572	<.0001	<.0001
<i>Bi.flaviscutellata</i> -- <i>Mg.migonei</i>	5785,9566	<.0001	<.0001
<i>Bi.flaviscutellata</i> -- <i>Ny.intermedia</i>	5835,4748	<.0001	<.0001
<i>Bi.flaviscutellata</i> -- <i>Ny.neivai</i>	5656,8801	<.0001	<.0001
<i>Bi.flaviscutellata</i> -- <i>Ny.whitmani</i>	5541,5548	<.0001	<.0001
<i>Mg.migonei</i> -- <i>Ny.intermedia</i>	1977,8307	<.0001	<.0001
<i>Mg.migonei</i> -- <i>Ny.neivai</i>	2307,8875	<.0001	<.0001
<i>Mg.migonei</i> -- <i>Ny.whitmani</i>	1788,7296	<.0001	<.0001
<i>Ny.intermedia</i> -- <i>Ny.neivai</i>	97,1981	<.0001	<.0001
<i>Ny.intermedia</i> -- <i>Ny.whitmani</i>	154,3771	<0,001	<.0001
<i>Ny.neivai</i> -- <i>Ny.whitmani</i>	253,6792	<.0001	<.0001

Essas três espécies ao serem comparadas mostraram um grau de erro na classificação, principalmente entre *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*, como mostrado na tabela (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Índices de Classificação Correta (CC) e Validação Cruzada (VC) indicando as porcentagens e o número de espécies corretamente classificados sobre o número de total de indivíduos comparados (dentro dos parênteses) entre as espécies de *Nyssomyia*.

	<i>Ny. intermedia</i>		<i>Ny. neivai</i>	
<i>Ny. neivai</i>	83,65% (87/104)	72,12% (75/104)		
<i>Ny. whitmani</i>	89,42% (93/104)	78,85% (82/104)	94,23% (98/104)	86,54% (90/104)
	CC	VC	CC	VC

Esses resultados mostram que as asas de *Ny. whitmani* parecem se diferenciar melhor daquelas de *Ny. neivai* e *Ny. intermedia* e que essas duas últimas espécies apresentam um maior índice de espécimes alocados de forma errônea, onde 16,35% dos espécimes tiveram sua classificação errada e após a validação cruzada esse número foi elevado para 27,88% dos espécimes.

Figuras das formas médias das asas comparando cada uma das espécies são mostradas abaixo nas figuras 4.7, 4.8, onde as diferenças nas asas das espécies de *Br. troglodytes* (Figura 4.7), *Bi. flaviscutellata* (Figura 4.7 A - D) e *Mg. migonei* (Figura E - G), em comparação com as demais, podem ser visualizadas nitidamente e na figura 4.9 onde foram comparadas as espécies de *Nyssomyia*. Analisando as figuras percebe-se que a principal diferença das asas de *Ny. whitmani* para as duas outras é a externalização posterior do marco 11 (ápice de M4) (Figura 4.9 B e C). Quanto a diferença entre *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* existem alguns desvios nos pontos como no ápice da estrutura e no marco 11 (Figura 4.9A).

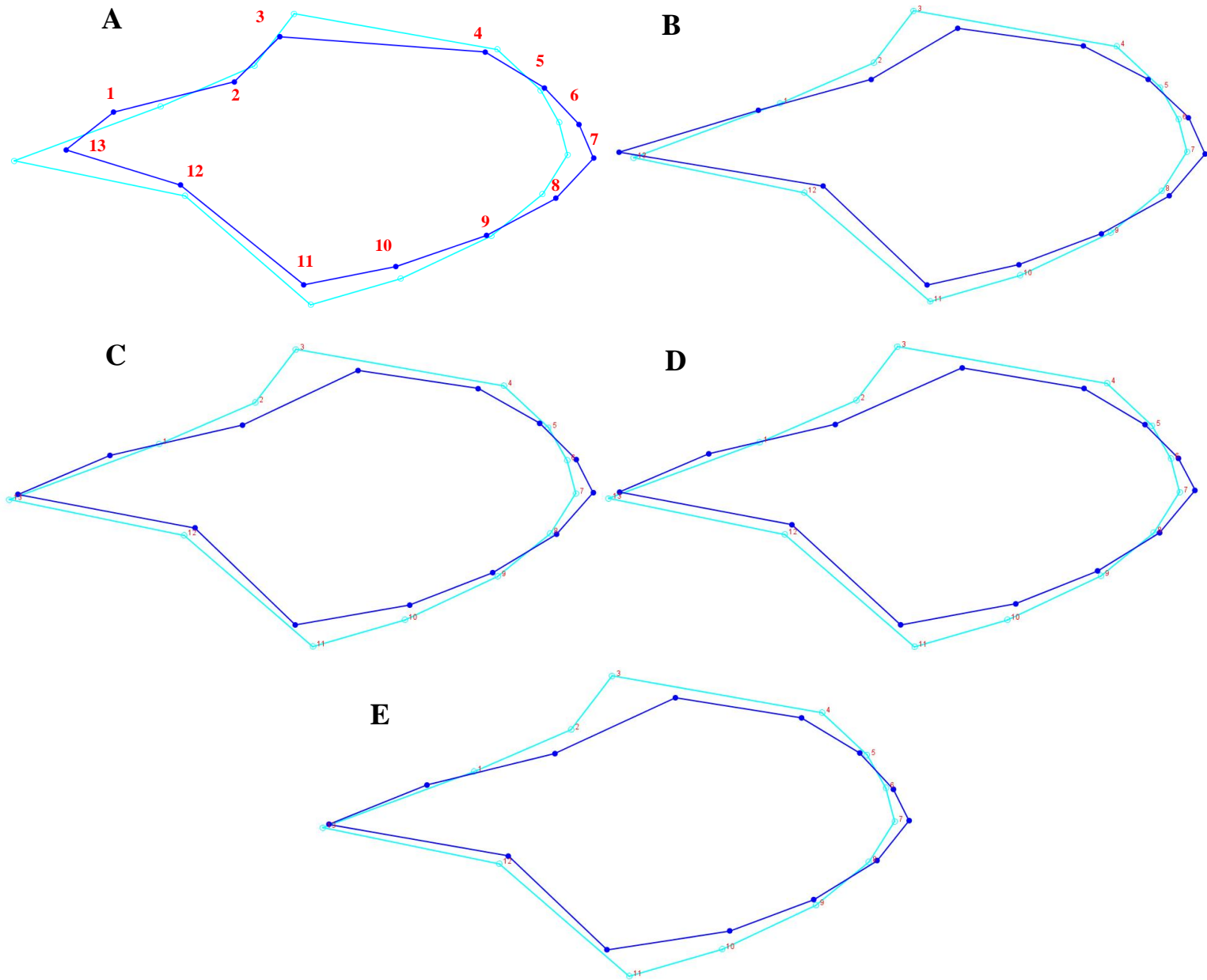


Figura 4.7 Formas médias das Asas após Análise da Função Discriminante entre *Br. troglodytes* e as demais espécies. Comparação entre a forma média das Asas de *Br. troglodytes* (linha azul clara) e *Bi. flaviscutellata* –A; *Mg. migonei* – B; *Ny. intermedia* – C; *Ny. neivai* – D; *Ny. whitmani* – E.

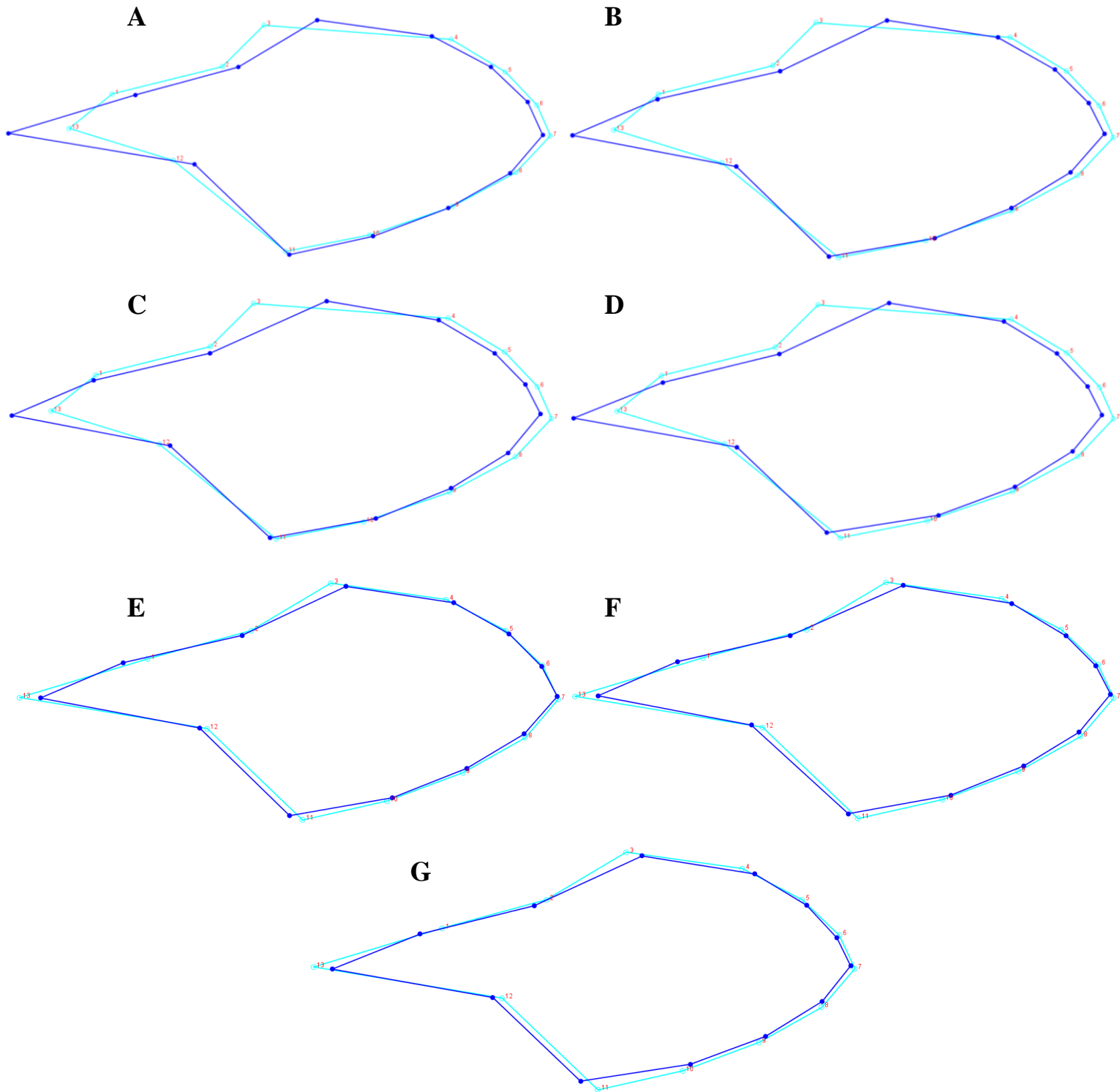


Figura 4.8 Formas médias das Asas após Análise da Função Discriminante de *Bi. flaviscutellata* e *Mg. migonei* com as demais espécies. Comparação entre a forma média das Asas de *Bi. flaviscutellata* (linha azul clara) e *Mg. migonei* – A; *Ny. intermedia* – B; *Ny. neivai* – C; *Ny. whitmani* – D; e *Mg. migonei* (linha azul clara) e *Ny. intermedia* – E; *Ny. neivai* – F; *Ny. whitmani* – G.

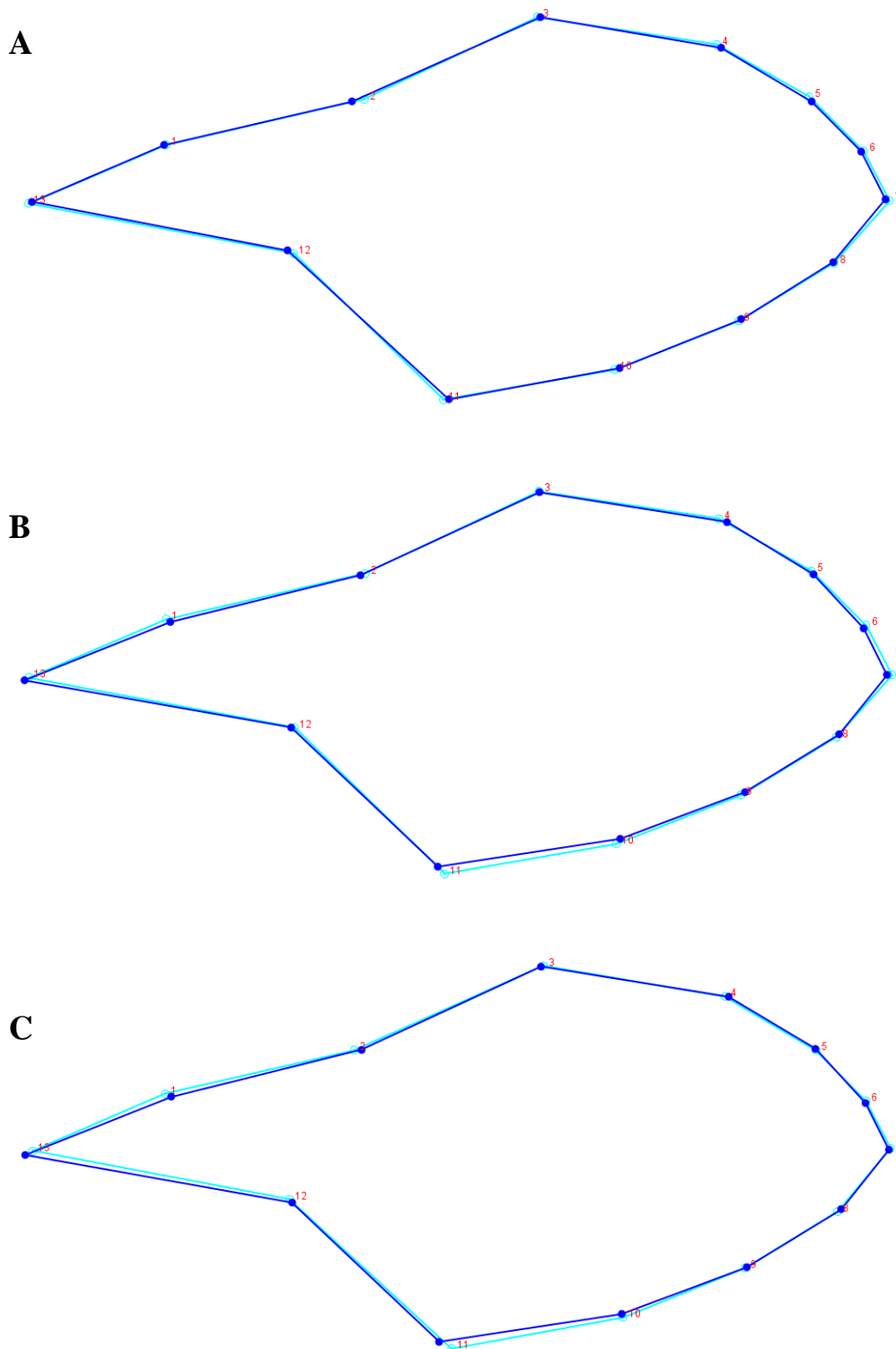


Figura 4.9 Formas médias das Asas após Análise da Função Discriminante entre espécies do gênero *Nyssomyia*. Comparação entre a forma média das Asas de *Ny. intermedia* (linha azul clara) e *Ny. neivai* –A; *Ny. whitmani* – B; e entre *Ny. neivai* (linha azul clara) e *Ny. whitmani* – C.

4.2 ANÁLISE MORFOMETRIA CLÁSSICA

Foram realizadas as medidas de 61 caracteres em até 240 espécimes, para características compartilhadas entre machos e fêmeas, e até 120, para características exclusivas de cada sexo, das 6 espécies utilizadas no trabalho (Tabela 3.2, 4.7, 4.8 e 4.9). Alguns dos caracteres avaliados não foram adicionados às análises devido à inexistência da característica em alguma das espécies utilizadas, esses caracteres podem ser visualizados nas Tabelas 4.3.

4.2.1 Análise Intraespecífica

O resultado observado através da análise utilizando-se teste t de variáveis independentes mostrou que em *Brumptomyia troglodytes* os comprimentos das estruturas: cabeça ($p = 0,003$), labro-epifaringe ($p = 0,000$), Lábio ($p = 0,000$), Palpo I, II, IV ($p = 0,000$) e V ($p = 0,002$), Flagelômeros I, II ($p = 0,000$) e XIV ($p = 0,017$), nervura R5 ($p = 0,000$), Alfa ($p = 0,017$), Beta ($p = 0,040$), Gama ($p = 0,000$), Delta ($p = 0,000$), Fêmur anterior ($p = 0,024$) e mediano ($p = 0,014$), Tíbia anterior, mediana e posterior ($p = 0,000$), Tarsômeros I anterior, mediano e posterior ($0,001$), II anterior ($p = 0,005$), mediano ($p = 0,000$) e posterior ($0,012$) e III mediano ($p = 0,037$), tiveram diferença significativa quando comparados entre machos e fêmeas.

Para *Mg migonei* todas as estruturas analisadas apresentaram diferenças significativas entre machos e fêmeas com valores de p entre 0,000 e 0,002.

Comparação entre os sexos em *Bi. flaviscutellata* mostrou que há diferença significativa nos comprimentos das seguintes estruturas: Cabeça ($p = 0,000$), Clípeo ($p = 0,000$), Labro-epifaringe ($p = 0,000$), Lábio ($p = 0,000$), Palpos I, II, III, IV e V ($p = 0,000$), Flagelômeros II ($p = 0,001$), Menor Distância entre os Olhos ($p = 0,006$), nervura R5 ($p = 0,000$), Alfa ($p = 0,000$), Beta ($p = 0,001$), Gama ($p = 0,000$), Delta ($p = 0,000$), Fêmur anterior, mediano e posterior ($p = 0,000$) e Tarsômeros I mediano ($p = 0,022$) e V, anterior ($p = 0,000$), mediano ($p = 0,032$) e posterior ($p = 0,004$). Para essa espécie foram excluídos da análise o comprimento dos flagelômeros XIII e XIV devido ao número pequeno de características medidas para os machos da espécie ($n = 2$).

Em *Ny. whitmani* todos os caracteres apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), exceto o comprimento do Flagelômeros XIV, Tíbia anterior e Tarsômeros I e II anteriores.

Para *Ny. neivai* os caracteres significativos foram: Cabeça ($p = 0,000$), Clípeo ($p = 0,000$), Labro-epifaringe ($p = 0,000$), Lábio ($p = 0,000$), Palpos I, II, III, IV e V ($p = 0,000$), Flagelômeros I ($p = 0,001$), II ($p = 0,000$) e XIII ($p = 0,024$), Menor Distância entre os Olhos ($p = 0,000$), nervura R5 ($p = 0,000$), Alfa ($p = 0,000$), Beta ($p = 0,002$), Gama ($p = 0,000$), Delta ($p = 0,000$), Fêmur anterior ($p = 0,002$), mediano e posterior ($p = 0,000$), Tíbia posterior ($p = 0,000$) e Tarsômeros I posterior ($p = 0,000$), III posterior ($p = 0,015$), IV anterior ($p = 0,012$), mediano ($p = 0,008$) e posterior ($p = 0,012$) e V mediano ($p = 0,015$) e posterior ($p = 0,000$).

Machos e fêmeas de *Ny. intermedia* apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) em todas as estruturas exceto pelos comprimentos da Tíbia anterior e dos Tarsômeros I e II anteriores.

4.2.2 Análise Interespecífica

4.2.2.1 Análise Descritiva e de Variância

A análise feita com os caracteres que estão presentes em ambos os sexos, mostrou alguns padrões de separação das espécies para determinadas estruturas, porém algumas outras não mostraram tal correlação apresentando diferentes agrupamentos entre as espécies. As características do comprimento do flagelômero I e II, de gama, do fêmur anterior (Figura 4.10A), da Tíbia mediana e posterior e do Tarsômero I anterior, mediano e posterior, mostraram um agrupamento (sem diferença significativa entre as medidas das estruturas) das 3 espécies de *Nyssomyia* e uma diferenciação significativa das espécies de *Mg. migonei*, *Bi. flaviscutellata* e de *Br. troglodytes* para com todas as outras (como exemplificado na Tabela 4.3). Outro padrão foi encontrado para o comprimento das estruturas R5 (Figura 4.10B), Fêmur Posterior e Tarsômeros II, III, IV e V anteriores, medianos e posteriores, mostrou que as espécies de *Mg. migonei*, *Bi. flaviscutellata*, *Br. troglodytes* e *Ny. neivai* se separam significativamente das demais, e as espécies de *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia* se agrupam, não apresentando diferença significativa entre elas (como exemplificado na Tabela 4.4).

Tabela 4.5 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pelo comprimento do Flagelômero II.

		Comp. Flagelômero II				
Especie		N	1	2	3	4
Student-Newman-Keuls	<i>Mg. migonei</i>	40	77,940			
	<i>Ny. whitmani</i>	40		99,030		
	<i>Ny. intermedia</i>	40		101,963		
	<i>Ny. neivai</i>	40		102,608		
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	40			121,643	
	<i>Br. troglodytes</i>	40				155,808
	Sig.		1,000	,420	1,000	1,000
Tukey	<i>Mg. migonei</i>	40	77,940			
	<i>Ny. whitmani</i>	40		99,030		
	<i>Ny. intermedia</i>	40		101,963		
	<i>Ny. neivai</i>	40		102,608		
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	40			121,643	
	<i>Br. troglodytes</i>	40				155,808
	Sig.		1,000	,807	1,000	1,000

Tabela 4.6 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pelo comprimento do da nervura R5.

		Comprimento da nervura R5					
Espécie		N	1	2	3	4	5
Student-Newman-Keuls	<i>Mg. migonei</i>	40	1081,623				
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	40		1136,068			
	<i>Ny. whitmani</i>	40			1214,253		
	<i>Ny. intermedia</i>	40			1248,675		
	<i>Ny. neivai</i>	40				1324,780	
	<i>Br. troglodytes</i>	40					1586,088
	Sig.		1,000	1,000	,160	1,000	1,000
Tukey	<i>Mg. migonei</i>	40	1081,623				
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	40	1136,068				
	<i>Ny. whitmani</i>	40		1214,253			
	<i>Ny. intermedia</i>	40		1248,675			
	<i>Ny. neivai</i>	40			1324,780		
	<i>Br. troglodytes</i>	40				1586,088	
	Sig.		,229	,722	1,000	1,000	

O comprimento da cabeça mostrou um agrupamento das espécies de *Nyssomyia* e a ausência de diferenciação de *Br. troglodytes* e de *Mg. migonei* com *Ny. intermedia*. Para o

comprimento de delta e da tibia anterior as espécies de *Mg. migonei* e *Ny. neivai* se separam das demais e *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* não se separam, o que ocorre igualmente com *Br. troglodytes* e *Bi. flaviscutellata*. Para o comprimento do Labro-epifaringe não houve diferenciação entre as espécies do gênero *Nyssomyia* e *Br. troglodytes*, e entre as espécies de *Bi. flaviscutellata* e *Mg. migonei*. Para o Lábio, as espécies de *Nyssomyia* não se separam de *Br. troglodytes* e *Bi. flaviscutellata* não se separa de *Mg. migonei* (o mesmo ocorrendo para o palpômero II – Figura 4.10C) e *Ny. intermedia*. O comprimento do palpômero I mostrou não separar as espécies de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* sendo que essa última não se separa de *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata* o mesmo para *Ny. whitmani* e *Br. troglodytes*, contudo *Br. troglodytes* e *Bi. flaviscutellata*. Para o palpômero III observou-se que não houve diferenciação das espécies de *Nyssomyia*, e que *Mg. migonei* não se separou de *Bi. flaviscutellata* e *Ny. neivai*, sendo que essa última também se separa de *Br. troglodytes*. As espécies do gênero *Nyssomyia* não apresentaram diferença significativa entre elas e para com *Bi. flaviscutellata* e *Br. troglodytes* o mesmo ocorrendo para com *Br. troglodytes* e *Mg. migonei* quanto a análise do palpômero IV. Analisando o palpômero V pode-se perceber que as espécies *Ny. intermedia*, *Bi. flaviscutellata* e *Ny. neivai* não se separam e que *Ny. whitmani* não se separa desta última, porém *Mg. migonei* e *Br. troglodytes* se separam de todas as outras. Essa última espécie também se separa de todas quando analisamos o comprimento do clípeo, mas as espécies *Ny. intermedia*, *Ny. neivai* e *Mg. migonei* e *Ny. whitmani* e *Bi. flaviscutellata* não se separam. Para o comprimento da menor distância entre os olhos apenas as espécies de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* não se separam. O comprimento de alfa diferencia as espécies de *Mg. migonei*, *Ny. neivai* e *Br. troglodytes* das demais que não se separam entre elas. Na análise de beta as espécies de *Nyssomyia* não se separaram de *Br. troglodytes* e *Ny. whitmani* não teve diferença significativa para *Bi. flaviscutellata* e *Mg. migonei* se separou de todas. O comprimento do Fêmur Mediano mostrou que *Br. troglodytes* e *Mg. migonei* possuem diferenças significativas com relação as demais e que as espécies de *Nyssomyia* novamente não se separam e que *Bi. flaviscutellata* não tem diferença para *Ny. neivai*.

As características analisadas apenas para o abdômen de fêmea mostraram as seguintes diferenciações: o comprimento do corpo da espermateca mostrou diferenciação para todas as espécies menos para *Ny. intermedia* e *Bi. flaviscutellata*, o mesmo ocorrendo para a largura porém nessa característica são as espécies de *Bi. flaviscutellata* e *Ny. neivai* que não se diferenciam. O comprimento dos cercos mostra diferenciação entre *Mg. migonei* e *Br. troglodytes* para com todas as outras e a não separação das espécies de *Nyssomyia* e de *Bi. flaviscutellata* e *Ny. whitmani*. A largura dos Dutos Individuais (Figura 4.11A) diferencia

todas as espécies enquanto que o seu comprimento separa as espécies de *Bi. flaviscutellata* e *Br. troglodytes* das demais, porém não diferencia *Ny. neivai* de *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* de *Mg. migonei* (Tabela 4.5). Na análise do comprimento e largura dos dutos comuns a espécie de *Br. troglodytes* não foi utilizada devido a ausência dessa estrutura nesta espécie. Para o comprimento dessa estrutura apenas *Ny. whitmani* e *Mg. migonei* não tiveram diferença significativa, enquanto para a largura *Mg. whitmani* não se separou de *Mg. migonei* e *Ny. neivai* de *Ny. intermedia* e *Bi. flaviscutellata* se diferenciou de todas elas.

As estruturas do abdômen do macho mostraram diferenciação entre as espécies como mostrado a seguir: o comprimento do coxito separou as espécies de *Ny. whitmani* e *Br. troglodytes* das outras e não separou *Mg. migonei* de *Bi. flaviscutellata* e *Ny. neivai* de *Ny. intermedia*. A largura dessa estrutura diferenciou todas as espécies menos *Ny. neivai* de *Ny. whitmani* e de *Mg. migonei*. O comprimento do Gonóstilo não mostrou diferença significativa quando comparada as espécies de *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata* e *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. A medida do comprimento do lobo lateral separou todas as espécies menos *Ny. whitmani* de *Ny. neivai*. Enquanto que a largura não separou as espécies de *Br. troglodytes* daquelas do gênero *Nyssomyia* onde desse grupo *Ny. whitmani* se separa apenas de *Ny. intermedia*. Analisando o comprimento da Bomba Genital (Figura 4.11B) todas as espécies mostraram diferenciação entre elas (Tabela 4.6), o que ocorre também para o comp. do pistão excetuando as espécies *Bi. flaviscutellata* e *Ny. intermedia* que não se separam. Para o comprimento do filamento genital e para a distância entre o espinho apical e o externo superior todas as espécies tem diferenças significativas exceto as espécies *Ny. neivai* e *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia* respectivamente para essas estruturas. A razão entre filamento genital e Bomba genital (Figura 4.11C) não mostrou diferenciação entre as espécies de *Mg. migonei* com *Br. troglodytes* e *Ny. whitmani* e esta última com *Ny. whitmani* as outras duas espécies de *Nyssomyia* também não se separam por essa características. Ao analisar o comprimento da ponta do filamento genital e a razão do filamento genital e da ponta do filamento as espécies de *Mg. migonei* e *Br. troglodytes* foram retiradas devido a ausência de diferenciação no final do filamento o que impossibilita a medição. Os resultados mostraram que não há diferenciação apenas entre as espécies de *Ny. whitmani* e *Bi. flaviscutellata* para a primeira característica e que esta última espécie não se diferencia de *Ny. intermedia* quando feita a razão do filamento e da ponta do filamento.

Tabela 4.7 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pela largura dos Dutos Individuais.

		Largura dos Dutos Individuais						
	Especie	N	1	2	3	4	5	6
Student-Newman-Keuls	<i>Br. troglodytes</i>	20	2,405					
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	20		3,200				
	<i>Mg. migonei</i>	20			4,365			
	<i>Ny. whitmani</i>	20				6,405		
	<i>Ny. neivai</i>	16					10,625	
	<i>Ny. intermedia</i>	20						11,620
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Tukey	<i>Br. troglodytes</i>	20	2,405					
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	20		3,200				
	<i>Mg. migonei</i>	20			4,365			
	<i>Ny. whitmani</i>	20				6,405		
	<i>Ny. neivai</i>	16					10,625	
	<i>Ny. intermedia</i>	20						11,620
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabela 4.8 Teste de Variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls e Tukey mostrando os agrupamentos das espécies pelo comprimento da Bomba Genital.

		Comp. Bomba Genital						
	Especie	N	1	2	3	4	5	6
Student-Newman-Keuls	<i>Mg. migonei</i>	20	116,285					
	<i>Ny. whitmani</i>	20		157,430				
	<i>Ny. neivai</i>	20			185,115			
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	20				195,685		
	<i>Ny. intermedia</i>	20					202,880	
	<i>Br. troglodytes</i>	20						223,975
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Tukey	<i>Mg. migonei</i>	20	116,285					
	<i>Ny. whitmani</i>	20		157,430				
	<i>Ny. neivai</i>	20			185,115			
	<i>Bi. flaviscutellata</i>	20				195,685		
	<i>Ny. intermedia</i>	20					202,880	
	<i>Br. troglodytes</i>	20						223,975
	Sig.			1,000	1,000	1,000	,094	1,000

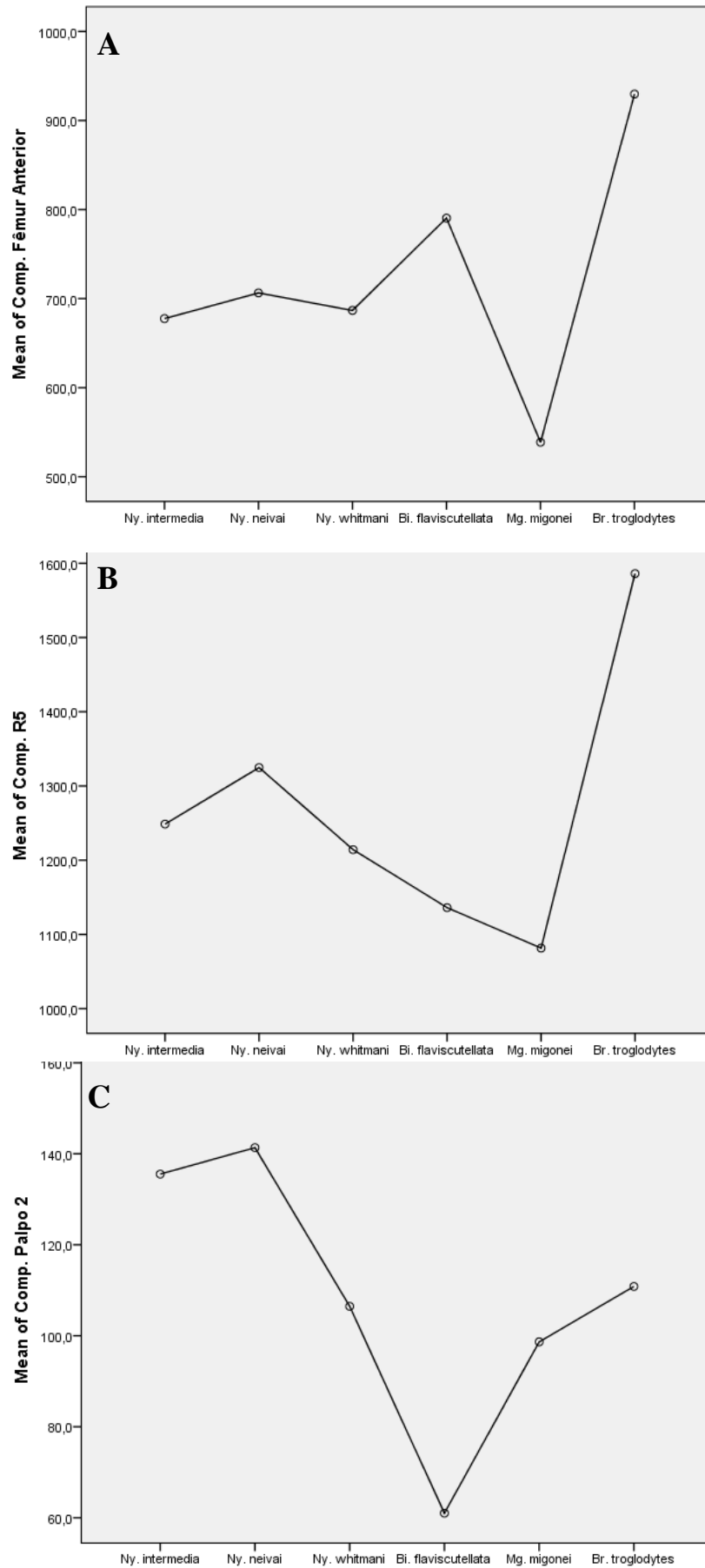


Figura 4.10 – Gráficos mostrando as médias das medidas de cada espécie após a análise de variância. A. Médias dos comprimentos do Fêmur anterior. B. Médias dos comp. de R5. C. Médias dos comprimentos do Palpo II.

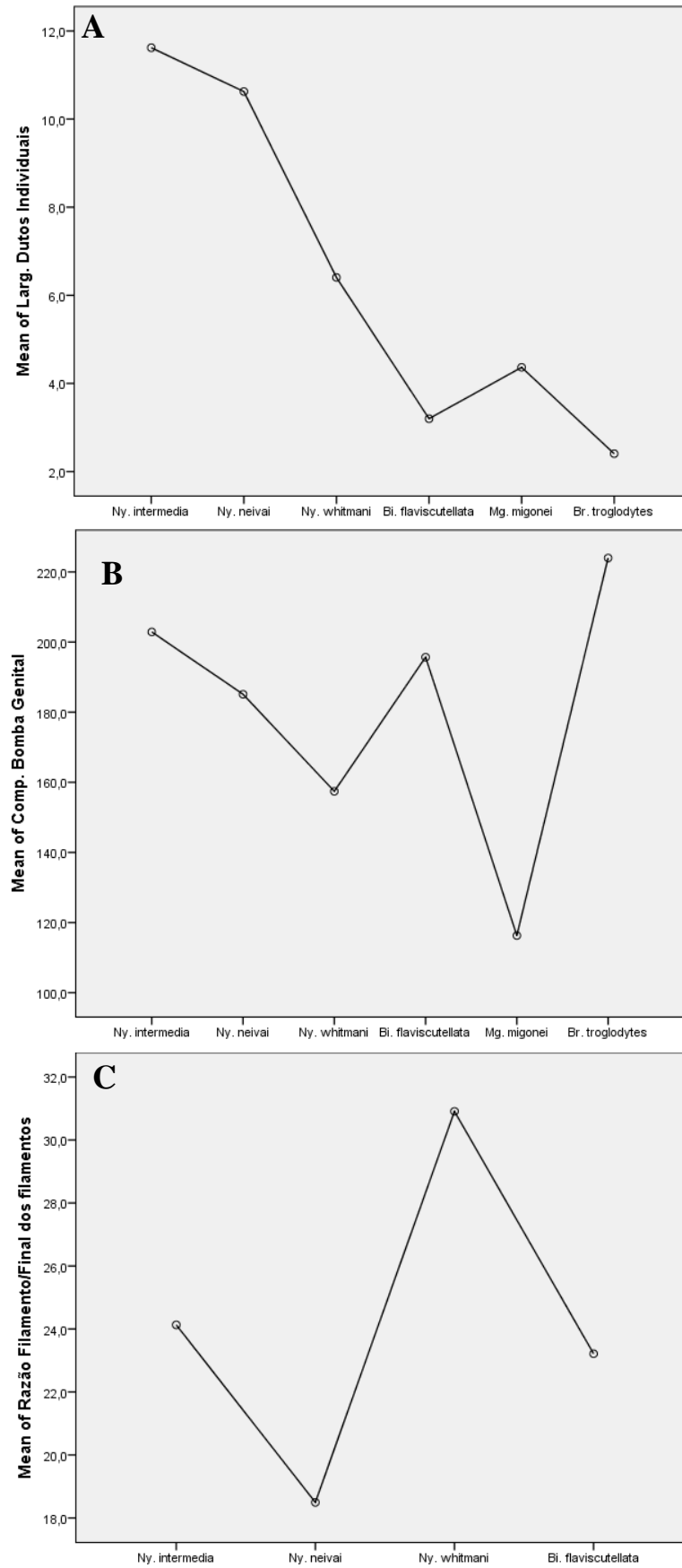


Figura 4.11 Gráficos mostrando as médias das medidas de cada espécie após a análise de variância. A. Médias das larguras dos Dutos Individuais. B. Médias dos comprimentos da Bomba Genital. C. Médias das razões entre os Filamentos genitais e os Finais dos filamentos genitais.

Tabela 4.11 Índice descritivo com os caracteres específicos do abdômen de macho e de fêmea utilizados nas análises intra e interespecíficas mostrando o número de espécimes, a média, o desvio padrão e os valores mínimos e máximos para cada estrutura de cada espécie.

	<i>Ny. intermedia</i>				<i>Ny. neivai</i>				<i>Ny. whitmani</i>				<i>Bi. flaviscutellata</i>				<i>Mg. migonei</i>				<i>Br. troglodytes</i>									
	N	Média	DP	Min.	Max.	N	Média	DP	Min.	Max.	N	Média	DP	Min.	Max.	N	Média	DP	Min.	Max.	N	Média	DP	Min.	Max.	N	Média	DP	Min.	Max.
Abdômen de Macho																														
C. Coxito	20	285,7	9,8	251,8	295	20	283,7	11,2	266,4	305,2	20	320	10	298,2	339,7	20	270,2	7,2	257,9	282,2	20	264,4	7,2	249,8	281,5	20	667,7	26,5	603,4	706,5
L. Coxito	20	54,7	3,1	50,2	60,6	20	61,1	6,1	51,1	73	20	62,6	3,8	55,4	70,2	20	49,4	2,8	43,4	54,4	20	65,3	4,2	60,6	73,3	20	152,1	7,9	141,7	172,9
C. Dististilo	20	135,1	5	124,4	148,5	20	128,5	5,7	115,6	138,4	20	139,7	6,2	126,7	152,7	20	118,5	5,2	110,1	129,2	20	115,7	4,9	106,6	123,4	20	402,6	16,8	360,2	437,7
C. Lobo Lateral	20	276	8,3	256,2	292,8	20	263	11,8	235,3	276,5	20	264,4	9,4	246,4	281,8	20	203,3	8,2	187,9	217,9	20	223,4	7,8	209,8	236,6	20	608,7	31,3	527,5	671,5
L. Lobo Lateral	20	23,5	1,2	20,8	25,5	20	24,4	1,9	20,2	28,2	20	24,8	1,7	22,2	28,1	20	20,5	1	18	22,4	20	18,4	1	16,4	20	20	24,4	1,6	21,5	27
C. Pistão	20	168,2	9,5	151,9	189,2	20	153,8	7,6	142,9	167,1	20	133,7	6,9	117,5	143,2	20	164	10,3	150,2	181,8	20	95,4	5,6	83,2	105,3	20	180,9	7,4	172,6	197,3
C. Bomba Genital	20	202,9	9,4	188,5	216,5	20	185,1	9,2	165,6	199,9	20	157,4	7,1	144,5	171	20	195,7	10,4	181,7	216,6	20	116,3	6,1	104,4	126,3	20	224	8,6	211,7	243,3
C. Fil. Genital	20	287,4	17,3	240,6	321,4	20	285,4	14,8	244,7	305,2	20	521	44,6	425,8	594,4	20	401,4	22,3	332	436,2	20	429,1	28	376,4	467,9	20	1252	78,7	1130,5	1355,3
Filamento/Bomba	20	1,2	0,4	1	2	20	1,6	0,1	1,3	1,8	20	3,3	0,3	2,5	3,9	20	2,1	0,1	1,7	2,2	20	3,7	0,3	3,1	4,2	20	5,6	0,3	4,9	6,1
C. Final dos fil. genitais	20	12	0,9	10,1	13,4	20	15,5	1,5	13,6	18,9	20	17	1,6	14	20	15	17,7	2,7	10	20	0					0				
Fil./Final do fil.	20	24,1	1,8	21,6	27,8	20	18,5	1,7	15,7	21,7	20	30,9	4,1	22,8	39,9	15	23,2	4,9	19,3	39,7	0					0				
Dist. espinho apical e o ext. sup.	20	27,7	2,4	22	31	20	22,6	2,1	19	26	20	26,3	2,8	21,5	31	20	15,6	1,7	12,3	18,8	20	31,4	2,8	21,6	35,1	20	181,4	9,7	154	195,7
Abdômen de Fêmea																														
C. Corpo da Espermoteca	20	38,9	6,7	23,7	49	16	33,9	2,6	29,8	40	20	44,7	5,2	37,6	56,6	20	39,7	3,7	31	45	20	23	3,2	17,4	30	20	59,2	7,6	48,5	73,4
L. Corpo da Espermoteca	20	16,3	1,5	14,4	19,2	16	13,9	1,3	11,4	17,1	20	10,3	0,9	9	11,7	20	13,5	1	10,9	15,9	20	4,1	0,6	3,1	5,1	20	18,7	2,6	12,7	21,7
C. dos Cercos	20	120,6	12	93	135,4	20	118,5	6,3	107,1	131	20	129,4	6,1	114,3	139,1	20	124,1	10,6	107,9	143,2	20	107,9	7,7	94,2	124,1	20	139,2	8,3	127,1	159,9
C. D. Individuais	20	99,4	9,5	77,5	109,8	17	96,5	10,6	75,6	109,5	20	164,9	19	130	202,2	20	37,9	5,6	26,9	49,2	20	184,1	20,8	152,2	223,3	20	773,6	96,2	531,7	913,8
L. D. Individuais	20	11,6	1,4	8,1	14,2	16	10,6	1	9	12,3	20	6,4	0,7	4,9	7,5	20	3,2	0,4	2,6	3,9	20	4,4	0,6	3,5	5,4	20	2,4	0,5	1,7	3,4
C. D. Comum	20	42,4	8,4	23,9	58,7	17	20	4,4	13,6	28	20	9,6	1,4	8	14	20	75,9	6,8	57	88	20	11,7	1,8	8	14	0				
L. D. Comum	20	24,8	5	12	31,5	18	26,1	3,9	16,3	31,9	20	14	2,3	10	18	20	8,2	1,1	7	11	20	12,5	1,7	10	16	0				

Abreviações: C. = comprimento; L. = largura; Fil. = filamento; Dist. = distância; Ext. = externo; Sup. = superior; D. = Duto.

4.2.2.2 Análise Discriminante

A análise discriminante com as características compartilhadas avaliou 228 espécimes dos 240 utilizados, sendo 12 deles (5% da amostra), retirados devido à ausência de pelo menos uma variável discriminante, onde desse total 11 espécimes pertenciam a *Bi. flaviscutellata* e 1 a *Br. troglodytes*, sendo assim foram avaliadas 29 espécimes da primeira e 39 da segunda. Analisando as características podemos ver os caracteres que mais acrescentam na diferenciação entre as espécies (Valor de F) (Tabela 4.12). Onde observamos que os caracteres que apresentam maior valor de F são respectivamente Menor distância entre olhos (F = 1131,914), Comp. Tarsômero I anterior (F = 1124,480), Comp. Palpo III (821,429), Comp. Tarsômero I mediano (F = 718,990) e Comp. Tarsômero III anterior (F = 699,668).

Ao todo foram geradas 5 variáveis, obtidas através da subtração do número de grupos (espécies) por 1. Essas variáveis obedecem a uma ordem decrescente de variação, com isso a primeira variável apresenta a maior variação de todas. Desse total de variáveis, as 3 primeiras correspondem a 92,1% de toda a variação da amostra, onde essas representam respectivamente 50,1%, 27,3% e 14,6% da variabilidade. As duas últimas variáveis apresentaram 7,7% e 0,2% da variabilidade total da amostra. O teste de Wilk's Lambda mostrou que as três primeiras variáveis apresentam valores de 0,000 para as duas primeiras e de 0,001 mostrando a importância das variáveis para a determinação da discriminação dos grupos (Figura 4.12). Através da análise das variáveis 1 e 2 observamos que as espécies de *Nyssomyia* se encontram mais próximas entre si que das demais sendo que *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* se encontram sobrepostas. *Bi. flaviscutellata* está mais distante que dos grupos de *Nyssomyia* que *Mg. migonei*.

Tabela 4.12 Resultado da Análise discriminante mostrando os caracteres analisados, o valor de Wilks' Lambda, o valor de F, de df1 (variáveis discriminantes), df2 (número total de espécimes) e a Significância.

Caracteres	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
Comp. Frontal cabeça	,305	101,130	5	222	,000
Comp. Labroepifaringeo	,613	28,072	5	222	,000
Comp. Labio	,673	21,572	5	222	,000
Comp. Palpo 1	,132	291,573	5	222	,000
Comp. Palpo 2	,357	80,011	5	222	,000
Comp. Palpo 3	,051	821,429	5	222	,000
Comp. Palpo 4	,156	240,250	5	222	,000
Comp. Palpo 5	,484	47,247	5	222	,000
Comp. Clípeo	,118	331,050	5	222	,000
Menor distância entre olhos	,038	1131,914	5	222	,000
Comp. Flagelômero 1	,161	231,491	5	222	,000
Comp. Flagelômero 2	,212	165,355	5	222	,000
Comp. R5	,312	97,795	5	222	,000
Comp. Alfa	,346	84,017	5	222	,000
Comp. Beta	,570	33,460	5	222	,000
Comp. Gama	,107	372,112	5	222	,000
Comp. Delta	,300	103,491	5	222	,000
Comp. Fêmur Anterior	,126	307,391	5	222	,000
Comp. Fêmur Mediano	,137	278,899	5	222	,000
Comp. Fêmur Posterior	,104	383,789	5	222	,000
Comp. Tíbia Anterior	,065	642,774	5	222	,000
Comp. Tíbia Mediana	,089	453,773	5	222	,000
Comp. Tíbia Posterior	,100	401,673	5	222	,000
Comp. Tarsômero I Anterior	,038	1124,480	5	222	,000
Comp. Tarsômero I Mediano	,058	718,990	5	222	,000
Comp. Tarsômero I Posterior	,065	637,600	5	222	,000
Comp. Tarsômero II Anterior	,060	692,136	5	222	,000
Comp. Tarsômero II Mediano	,077	530,697	5	222	,000
Comp. Tarsômero II Posterior	,100	398,278	5	222	,000
Comp. Tarsômero III Anterior	,060	699,668	5	222	,000
Comp. Tarsômero III Mediano	,071	578,827	5	222	,000
Comp. Tarsômero III Posterior	,083	487,542	5	222	,000
Comp. Tarsômero IV Anterior	,074	555,241	5	222	,000
Comp. Tarsômero IV Mediano	,086	469,931	5	222	,000
Comp. Tarsômero IV Posterior	,126	308,599	5	222	,000
Comp. Tarsômero V Anterior	,071	581,467	5	222	,000
Comp. Tarsômero V Mediano	,061	684,917	5	222	,000
Comp. Tarsômero V Posterior	,079	514,235	5	222	,000

Essas variáveis obedecem a uma ordem decrescente de variação, com isso a primeira variável apresenta a maior variação de todas. A análise da Função Discriminante mostrou que as espécies de *Br. troglodytes*, *Mg. migonei*, *Bi. flaviscutellata* e *Ny. whitmani* tiveram 100%

de classificação correta dos espécimes mesmo após a validação cruzada, enquanto que as espécies de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* apresentaram 91,25% (73/80 espécimes) de classificação correta e na validação cruzada 81,25% (65/80 espécimes).

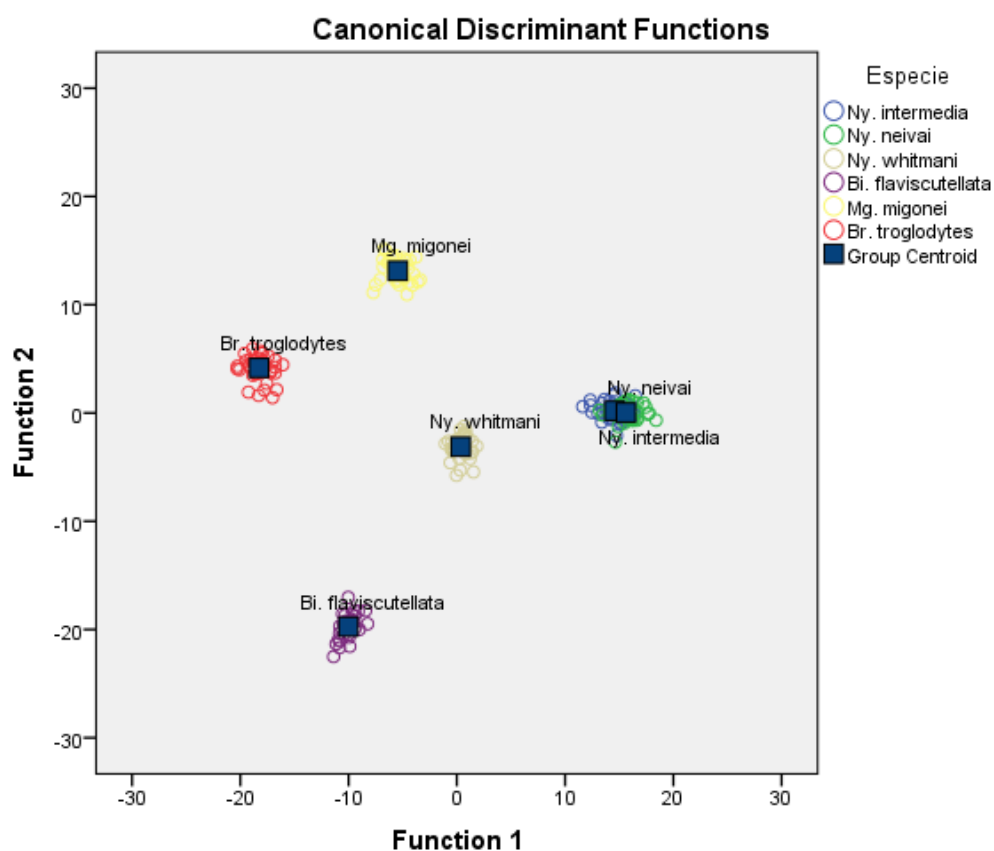


Figura 4.12 – Gráfico mostrando a distribuição das espécies em função das variáveis canônicas discriminantes 1 e 2, utilizando-se os caracteres gerais encontrados em machos e fêmeas.

A análise discriminante das características específicas de macho (incluindo as características compartilhadas) avaliou 110 dos 120 espécimes totais, onde 10 deles foram retirados devido à ausência de variáveis discriminantes (sendo todos esses da espécie *Bi. flaviscutellata*). Analisando as características podemos ver os caracteres que mais acrescentam na diferenciação entre as espécies (Valor de F) nos espécimes machos sendo estes: distância do espinho apical para o externo superior ($F = 3603,978$), comp. do gonóstilo ($F = 3225,954$), comp. do gonocoxito ($F = 2411,754$), comp. palpômero III ($F = 2090,521$) e I ($F = 1817,666$), mostrando que as estruturas do abdômen apresentam a maior parte da variação entre as espécies. As 5 variáveis discriminantes apresentaram as seguintes porcentagens de variação 55,8%, 25,3%, 13,2%, 5,3% e 0,4%, onde as três primeiras apresentam 94,3% de toda a variação. Essas 3 variáveis apresentaram valores de 0,000 para o teste de Wilk's Lambda. A análise das variáveis mostrou que a interseção das espécies de *Ny. neivai* e *Ny. intermedia* e *Br. troglodytes* apresenta maior distância para com todas as

espécies. *Ny. whitmani* se apresentou mais próxima das espécies de *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata* que das demais espécies de *Nyssomyia* (Figura 4.13).

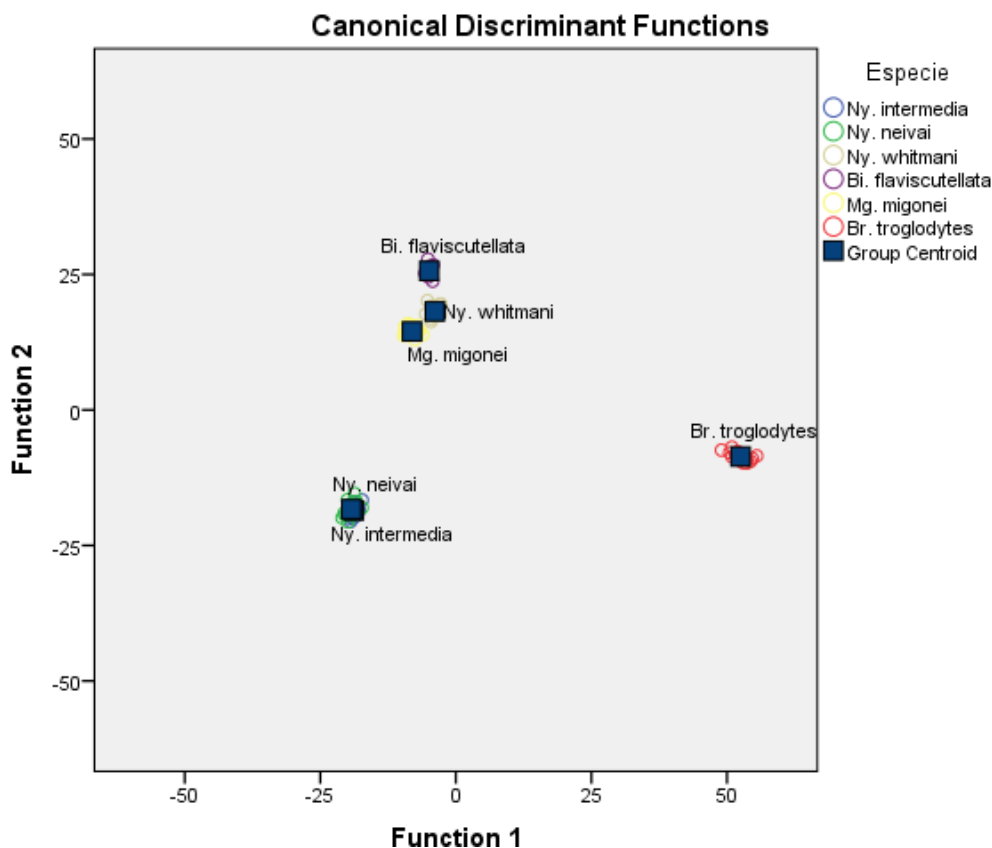


Figura 4.13 Gráfico mostrando a distribuição das espécies em função das variáveis canônicas discriminantes 1e 2, utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de machos.

Assim como na análise utilizando apenas as características compartilhadas, todas as espécies apresentaram 100% de classificação correta, mesmo após a validação cruzada. Com essas características, contudo, houve 100% de classificação correta entre *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* que, após a validação cruzada, diminuiu para 85% (34/40 espécimes).

A análise discriminante em fêmeas foi realizada em 114 dos 120 espécimes utilizados, onde 6 deles foram retirados devido a ausência de variáveis discriminantes, sendo 4 deles de *Ny. neivai*, 1 de *Bi. flaviscutellata* e 1 de *Br. troglodytes*. Analisando as características podemos ver os caracteres que mais acrescentam na diferenciação entre as espécies (Valor de F) nos espécimes de fêmeas sendo estes: comp. palpômero III (F = 2100,806) e I (F = 1714,920), Menor distância entre olhos (F = 1052,577), comp. dos dutos individuais (F = 794,833) e comp. Palpômero IV (F = 723,564), mostrando que essas variáveis específicas do abdômen de fêmea não acrescentam muito a diferenciação das espécies.

As 5 variáveis discriminantes apresentaram as seguintes porcentagens de variação 51,4%, 27,8%, 13,0%, 7,6% e 0,2%, onde as três primeiras apresentam 92,2% de toda a

variação. As 3 primeiras variáveis apresentaram valores de 0,000 para o teste de Wilk's Lambda. A análise das variáveis mostrou uma distribuição semelhante a ocorrida na avaliação dos dados gerais, devido a pouca variação acrescentada pelas características específicas das fêmeas (Figura 4.14).

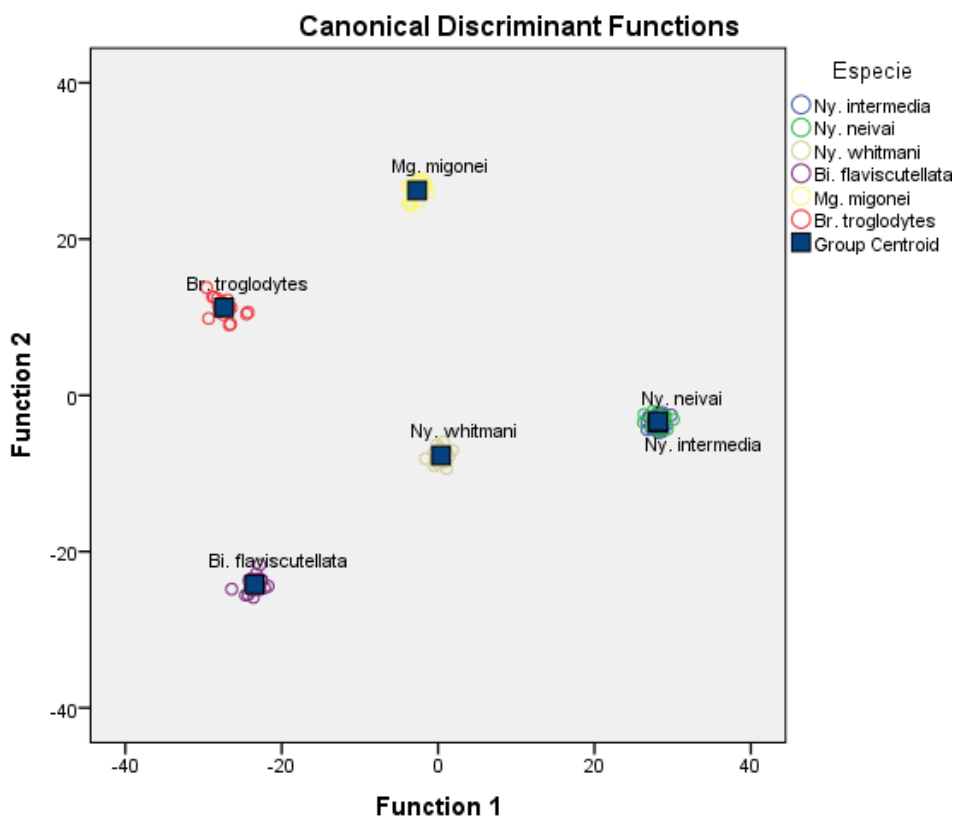


Figura 4.14 Gráfico mostrando a distribuição das espécies em função das variáveis canônicas discriminantes 1e 2, utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de fêmeas.

A análise da Função Discriminante mostrou que as espécies de *Br. troglodytes*, *Mg. migonei*, *Bi. flaviscutellata* e *Ny. whitmani* tiveram 100% de classificação correta dos espécimes mesmo após a validação cruzada, enquanto que as espécies de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* apresentaram 94,44% (34/36 espécimes) de classificação correta e na validação cruzada 80,55% (29/39 espécimes).

Análise discriminante usando apenas as espécies de *Nyssomyia* também foi realizada, onde foram usadas as mesmas características usadas na análise específica de machos e fêmeas de todas as espécies, foram utilizados um total de 60 espécimes.

A análise dos caracteres compartilhados mais os específicos de machos mostrou que as espécies de *Nyssomyia* se separam onde apenas após a validação cruzada existe uma classificação correta menor que 100% entre as espécies de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* (92,5%) (Figura 4.15). Na análise das fêmeas, 5 espécimes foram retirados da análise (todos

da espécie *Ny. neivai*). Quanto a classificação correta segue o mesmo padrão da análise com os machos havendo uma classificação correta após a validação cruzada de 65,71%, entre *Ny. neivai* e *Ny. intermedia*, com isso as espécies apresentam menor diferenciação do que aquela vista nos machos (Figura 4.16).

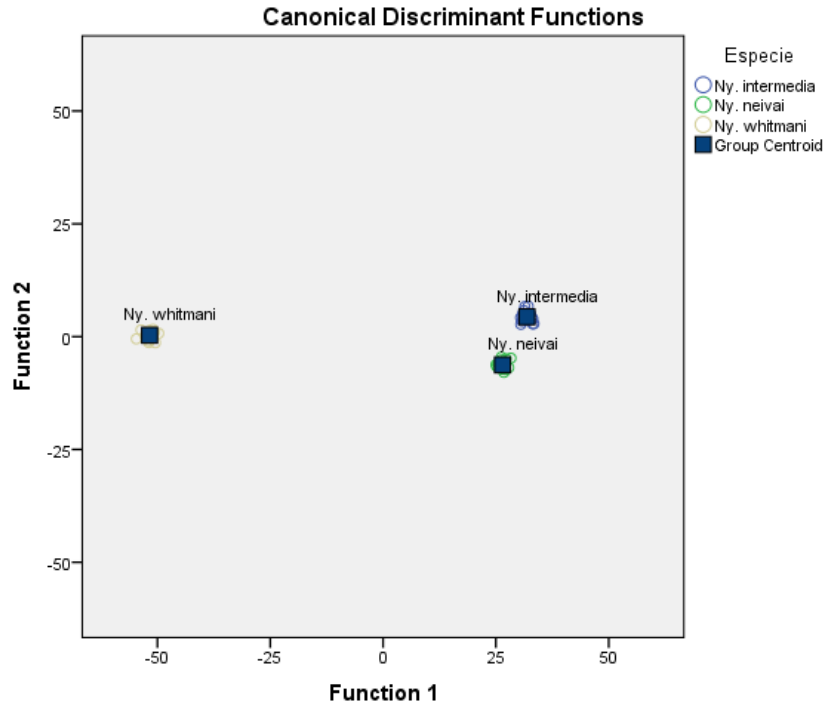


Figura 4.15 Gráfico mostrando a distribuição das espécies de *Nyssomyia* em função das variáveis canônicas discriminantes 1e 2 utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de machos.

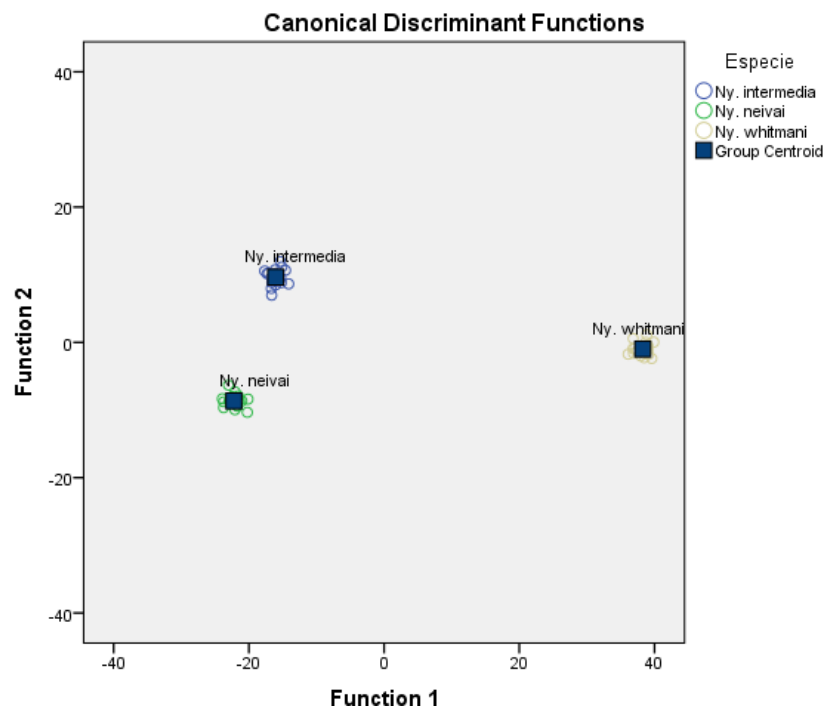


Figura 4.16 Gráfico mostrando a distribuição das espécies de *Nyssomyia* em função das variáveis canônicas discriminantes 1e 2 utilizando-se os caracteres gerais e os específicos de fêmeas.

4.3 ANÁLISE DA MORFOLOGIA

Foram analisados um total de 45 caracteres presentes nas espécies inclusas no projeto. As análises de frequência foram realizadas entre machos e entre fêmeas de todas as espécies e também dentro de cada espécie para ver o quanto cada característica é expressa, sendo que a análise intraespecífica foi feita apenas em espécimes fêmeas (20 indivíduos). Foram utilizadas as seguintes características número de dentes da lacínia, número de dentes do cibário e número de anéis na espermateca, quando essas anelações estão presentes.

Brumptomyia troglodytes para as características analisadas apresenta 1 fileira de dentes na lacínia, onde a quantidade de dentes variou de 6 a 7 onde a frequência de expressão do primeiro é de 90%. O número de dentes do cibário apresentou uma variação de 15 a 20, onde 18 e 19 dentes foram as formas mais encontradas com frequência de 31,6% cada (6 espécimes cada), seguido de 17 (15,8%), 20 (10,5%) e 15 (5,3%) e 16 (5,3%). Essa espécie apresenta espermateca fracamente anelada (Tabela 4.13).

Para *Mg. migonei* o número de dentes da lacínia variou de 3 a 5 onde 4 dentes mostrou-se mais frequente (55%) seguido de 5 dentes (40%) e de 3 dentes (5%), quanto a característica dentes no cibário 100% dos espécimes apresentaram 4 dentes nessa estrutura. Essa espécie não possui anelações no corpo da espermateca (Tabela 4.13).

Bichromomyia flaviscutellata apresentou de 9 a 11 dentes na lacínia onde a frequência para cada uma foi de 55% para 10 dentes, 35% para 11 e 10% para 9. Quanto aos dentes do cibário 100% dos espécimes apresentaram 6 dentes na estrutura. O número de anéis da espermateca variou de 8 a 11, onde a frequência de cada um foi: 40% para 9, 30% para 10, 25% para 8 e 5% para 11 anéis (Tabela 4.13).

Para *Ny. whitmani* o número de dentes da lacínia teve grande variação indo de 15 a 21 dentes onde as frequências em ordem decrescente foram 20 (25%), 21 (20%), 17 (20%), 18 (15%), 19 (10%), 16 (5%) e 15 (5%) dentes. A variação dos dentes do cibário foi menor, sendo observado de 8 a 11 dentes na estrutura, onde a frequência para cada um foi, 45% (9 dentes), 30% (10), 15% (11) e 10% (8 dentes). O número de anéis da espermateca variou de 13 a 17 onde as frequências foram de 35% (16 anéis), 25% (14 e 15), 10% (13) e 5% (17 anéis) (Tabela 4.13).

Nyssomyia neivai apresentou de 15 a 19 dentes na lacínia, onde as frequências em ordem decrescente foram de 35% (17 dentes), 25% (16 e 18), 10% (15) e 5% (19 dentes). O número de dentes do cibário teve sua menor quantidade composta por 8 e a maior por 12 dentes, sendo que 10 dentes foram os mais frequentes (40%) seguido de 9 (35%), 8 (15%) e

de 11 e 12 dentes (5% cada). Foram observados de 8 a 11 anéis na espermateca desta espécie onde os mais frequentes foram, 9 (50%), 8 (20%) e 10 e 11 anéis (15% cada) (Tabela 4.13).

Para *Ny. intermedia* o número de dentes da lacínia variou de 12 a 19 onde as frequências em ordem decrescente foram de 30 % (17 dentes), 20% (16), 15% (15), 10% (14, 18 e 19, totalizando 30%) e 5% (12 dentes). O número de dentes no cibário observados foram 8 (35%), 9 (25%) e 10 dentes com 40% de frequência. A quantidade de anéis no corpo da espermateca foi de 10 a 13 onde as frequências em ordem decrescente para cada número foram de 35 % para 11 anéis, 25% para 10 e 20% para 12 e 13 anéis (Tabela 4.13).

Tabela 4.13 Resultado da Análise morfológica intraespecífica de fêmeas mostrando a variação e a moda dos caracteres analisados.

Caracteres	Espécies											
	<i>Br. troglodytes</i>		<i>Mg. migonei</i>		<i>Bi. flaviscutellata</i>		<i>Ny. whitmani</i>		<i>Ny. neivai</i>		<i>Ny. intermedia</i>	
	Variação	Moda	Variação	Moda	Variação	Moda	Variação	Moda	Variação	Moda	Variação	Moda
Número de dentes na lacínia	6 - 7	6 (90%)	3 - 5	4 (55%)	9 - 11	10 (55%)	15 - 21	20 (25%)	15 - 19	17 (35%)	12 - 19	17 (30%)
Número de dentes no cibário	15 - 20	18 - 19 (31,6%)	4	4 (100%)	6	6 (100%)	8 - 11	9 (45%)	8 - 12	10 (40%)	8 - 10	10 (40%)
Número de anéis na espermateca					8 - 11	9 (40%)	13 - 17	16 (35%)	8 - 11	9 (50%)	10 - 13	11 (35%)

A análise interespecífica foi realizada usando dados presentes em ambos os sexos e análises separadas para características específicas de macho e fêmea foram realizadas. A análise dos caracteres presentes nos dois sexos mostrou a frequência dos mesmos utilizando-se todas as espécies como referência. A frequência para cada cor em cada estrutura foi de: 83,3% para castanho escuro, e 16,7% para pálido analisando-se o pronoto; mesma porcentagem encontrada para o pré-escudo só que ao invés de pálido a coloração que apresentou 16,7% foi castanho claro; no escutelo castanho escuro foi a mais frequente em 66,7% dos espécimes seguido da cor pálida e castanho claro cada uma com 16,7%. Para o anepisterno superior e inferior, catepisterno, catepímero e metepímero a frequência de 66,7% de coloração pálida e 16,7% para castanho escuro e para castanho claro foi observada. Para o metepisterno 83,3% dos espécimes apresentou coloração pálida e 17,7% castanho escuro, proporção encontrada também para o paratergito, porém com as frequências entre as colorações invertidas.

Foram observadas também as frequências da presença de cerdosidade na parte anterior do catepisterno que se mostrou presente em 50% dos espécimes, de sensila ventro-cervical

presente em 16,7% dos espécimes, de sutura inter-ocular presente em 16,7%, de forquilha labial presente em 100% dos espécimes, de prolongamento anterior dos ascóides presente em 16,7%, de papila em AIV presente em 100% dos indivíduos e em AV presente em 16,7 dos espécimes, foi observado também 100% de presença de espinhos de newstead no terceiro palpômero. Foram analisadas também a implantação dos ascóides, onde estes se apresentaram pareados em 83,3% dos casos e não pareados em 17,7%. Também foi analisado a até que posição a parte apical dos ascóides se prolongam, podendo estes apresentar o seu prolongamento até a papila pré-apical, ultrapassar a papila ou então apenas um dos ascóides ultrapassa a papila, a frequência obtida para essas características foi respectivamente, 16,7%, 66,7% e 16,7%. Foi observado o número de papilas em AIII onde a frequência de 1 papila foi de 83,3% e 17,7% para 2 papilas. A distribuição dos espinhos de Newstead no palpômero III tiveram as seguintes características, agrupados no meio de região proeminente, agrupados no segundo terço da estrutura e dispersos na estrutura, onde as frequências respectivamente foram de 66,7%, 16,7% para cada uma das duas últimas características.

A análise das frequências das características específicas de fêmea mostraram que o número de fileiras de dentes da lacínia apresentam 50% com 1 fileira e a outra metade com 2 fileiras. O número de dentes da lacínia como mostrado anteriormente mostraram que 6 e 17 dentes são os mais frequentes respectivamente, 15% e 14,2%. Para o número de dentes do cibário foram as maiores frequências foram observadas para 4, 6, 9 e 10 dentes, sendo estas respectivamente 16,7% para as duas primeiras, 17,5% e 18,3%. A posição desses dentes foram avaliados onde o posicionamento longitudinal foi frequente em 83,3% e o transversal em 17,7% dos espécimes. Quanto à área esclerosada na câmara do cibário sua presença foi observada em 16,7% dos espécimes. No abdômen das fêmeas, o do duto comum apresentou aspecto liso 80% de frequência enquanto o estriado esteve presente em 20% dos indivíduos. O aspecto do corpo da espermateca apresentou as seguintes frequências para as características a seguir: liso e estriado 16,7% cada um e 66,7% para anelado. O duto individual apresentou aspecto liso em 66,7% e aspecto pouco estriado em 33,3% dos espécimes. Quanto a presença de cabeça da espermateca, todos indivíduos possuíam esta estrutura. O ângulo formado por essa estrutura em relação ao corpo mostrou que 83,3% dos espécimes apresentaram ângulo menor que 90° e 17,7% apresentaram ângulo maior. As maiores frequências obtidas quanto ao número de anéis no corpo da espermateca foram 9, 10 e 11 anéis. A protuberância esclerosada no 9° tergito esteve presente em 16,7% dos espécimes.

Para as características presentes apenas no abdômen dos machos foram observados, que o aspecto do edeago se apresentou simples para 100% dos espécimes, que o aspecto do

lobo lateral se mostrou oblongo para 66,7% e afilado para 33,3% do total. Cerdas diferenciadas e de processos no parâmetro estiveram presentes em 83,3% dos espécimes. A forma do parâmetro se dividiu em 50% com formato do terço apical em diante afilado, 16,7% curvo, 16,7% rombo e 16,7 em forma de clava. O tufo de cerdas na base do coxito esteve presente em 33,3% dos espécimes e desses, metade apresentou mais de 70 cerdas e a outra metade de 5 a 7 cerdas. A presença de cerda espiniforme pré-apical, de cerdas longas na parte apical do gonocoxito e de protuberância esclerosada no gonocoxito foram observadas em 16,7% dos espécimes. Quanto a presença de espinhos no gonóstilo 83,3% dos espécimes apresentaram 4 espinhos e 16,7% apresentaram 5. As formas do final dos filamentos genitais tiveram as seguintes frequências: forma de concha, de colher, e em forma de L invertido e bifurcado tiveram 16,7% de presença cada e a forma afilada em 33,3% dos espécimes.

5 DISCUSSÃO

5.1 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS

A análise da morfometria geométrica das asas das espécies de *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia*, *Ny. neivai*, *Mg. migonei*, *Bi. flaviscutellata* e *Br. troglodytes*, apresenta uma importante contribuição para a diferenciação dessas espécies, pois ainda são poucos os trabalhos que se utilizam dessa ferramenta, em flebotomíneos, para definir unidades taxonômicas operacionais (OTU), trazendo novas possibilidades para identificação de grupos taxonômicos. A utilização da asa como a principal estrutura nesse tipo de análise em insetos se deve a sua boa conservação após os métodos de processamento e de clarificação e por apresentar estruturas que facilitam à determinação dos marcos anatômicos, muito embora ainda com algumas limitações, pois a mesma apresenta poucos pontos que possam ser definidos diminuindo assim a amplitude das variações perceptíveis que poderiam existir nas asas.

Comparando o tamanho das asas das espécies do estudo através do tamanho do centróide verificamos que *Br. troglodytes* possui a maior asa, seguido de *Ny. neivai*, *Bi. flaviscutellata*, *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* com tamanhos sem diferença significativa e por último *Mg. migonei* com a menor das asas. Fato que demonstra a correlação do tamanho da asa com o tamanho do corpo do inseto, sendo as espécies de *Brumptomyia* perceptivelmente maiores que as demais. Analisando as espécies do gênero *Nyssomyia* podemos inferir que a asa de *Ny. neivai* apresenta o maior tamanho entre as espécies do gênero sendo essa diferença significativa ($p < 0,0001$) para com as duas outras.

Para a visualização dos pontos que mais apresentam variação foi realizada uma análise exploratória de componentes principais, aonde vimos que os pontos que mais influenciaram na variação das asas para o Componente principal 1 (46,108% da variação total), foram os referentes aos marcos anatômicos 3 (ápice de R1), onde essa variação parece influenciar no deslocamento dos outros pontos sendo eles 2 (bifurcação R2+3), 11 (ápice de M4) e 13 (base da nervura R5). Podemos perceber que essa variação torna as formas das asas mais largas no meio da asa no encontro de R1 e M4 com a margem da estrutura, sendo essa a forma presente nas asas dos espécimes de *Br. troglodytes*. Observamos que as formas das asas dos espécimes do gênero *Nyssomyia* e da espécie *Mg. migonei* ficam mais próximas, sendo essas mais distantes das formas *Bi. flaviscutellata* e de *Br. troglodytes*, que não apresentam grande diferenciação por esse componente.

O Componente principal 2 (27,928% da variação total), apresentou uma modificação grande na forma das asas quando observamos os extremos das diferenças das formas, havendo uma grande diminuição basal da nervura R5 (marco 13), com grande aproximação do ponto 1 (bifurcação R2+3+4), diminuição da largura da parte mediana da asa (internalização dos pontos 3 e 11) e aumento do ápice da asa com deslocamento posterior (dos pontos 6, 7 e 8). Esse componente mostra a modificação ocorrida nos pontos que diferenciam principalmente as asas de *Br. troglodytes* e *Bi. flaviscutellata*, onde essas se apresentam nos extremos das formas apresentadas nessa variável.

O Componente Principal 3 (11,052% da variação total), onde podemos ver apenas uma alteração da região mais larga asa, devido principalmente ao deslocamento dos pontos 3 e 11, passando essa região a se apresentar em uma posição mais anterior, modificação essa que parece estar presente de forma semelhante na asa dessas espécies, o que pode indicar uma característica compartilhada entre elas.

Em nosso estudo a utilização de 13 marcos anatômicos nas asas permitiu a discriminação no nível de gênero onde *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Migonemyia* e *Brumptomyia* apresentam diferença significativa entre a forma de suas asas, diferenciação que corrobora com a classificação proposta por Galati, 1995. Essa diferenciação pode ser vista quando comparamos as Variáveis canônicas 1 e 2 onde as espécies dos gêneros *Nyssomyia* e *Migonemyia migonei* ficaram mais próximas que aquelas de *Bichromomyia flaviscutellata* e *Brumptomyia troglodytes*. Importante destacar que analisando apenas a variável canônica 1, estas duas últimas espécies se encontram mais próximas, enquanto que pela variável canônica 2, *Migonemyia migonei* se apresenta mais próxima da espécie *Br. troglodytes*. Isso se deve aos pontos de variação encontrados na CV1 (59,451% da variação total), que estão relacionados ao deslocamento dos marcos anatômicos 3 e 11 principalmente, mostrando um alargamento da asa na região desses pontos, modificação que está presente nas asas de *Br. troglodytes* e *Bi. flaviscutellata*. Quanto ao ocorrido na CV2 (33,402% da variação total), podemos ver que a diferenciação que ocorre nessa variável está relacionada ao aumento na base de R5 (ponto 13), deslocamento para parte apical das asas dos pontos 3 e 11 e abaulamento da parte apical da asa, variação essa que aproxima as formas das asas *Mg. migonei* e *Br. troglodytes*. A variável canônica 3 (6,206% da variação total) como apresenta pouca variabilidade não mostrou boa diferenciação entre os grupos.

A mesma análise feita apenas com as espécies do gênero *Nyssomyia* mostrou um ponto de interseção entre as três onde a espécie de *Ny whitmani* apresenta mais espécimes na região de interseção que as duas outras, provavelmente devido a maior variação na forma das

asas dos espécimes dessa espécie. Vimos também que os espécimes de *Ny. neivai* e *Ny. intermedia* são os que mais se sobrepõe, fato que só vem a acrescentar a grande semelhança entre essas que são discutidas por alguns como sendo um complexo de espécies (Marcondes, 1996).

Estudo realizado por Dujardin et al. (1993), utilizando 6 marcos anatômicos na asa para comparar as espécies de *Ps. ayrozai* e *Ps. geniculatus* de duas áreas geográficas diferentes mostrou que a análise das variáveis canônicas foi capaz de separar as espécies quando observada a CV1 e de separar as regiões geográficas quando observada a CV2. Em contraste, o trabalho feito por De la Riva et al. (2001), com populações de espécie de *L. longipalpis*, utilizando 5 marcos anatômicos nas asas, não conseguiu separar as populações entre as diferentes regiões geográficas, mas conseguiu agrupar as populações em dois grupos, um com espécimes de áreas mais heterogêneas, e um outro com espécimes de áreas mais homogêneas. Prudhomme et al. (2012) comparou as asas de *Phlebotomus papatasi*, de regiões diferentes de Marrocos (Norte e Sul), utilizando 16 marcos anatômicos nas asas, onde através da análise das variáveis canônicas e do tamanho do centróide esses conseguiram separar as populações, sugerindo que as diferenciações encontradas podem ser devido a pressões ambientais locais já que as populações são encontradas em regiões com perfis diferentes.

A avaliação das distâncias entre as formas médias das asas das espécies do nosso estudo foi demonstrada através das distâncias de Mahalanobis (distância entre as formas no espaço Euclidiano após a análise discriminatória), sendo essa uma maneira de avaliar o quão próximas as espécies são segundo as características analisadas. Como resultado tivemos que *Br. troglodytes* é a que mais se distancia das demais espécies, exceto com relação a *Mg. migonei* (distância para *Br. troglodytes* igual a 15,4929) que está um pouco mais distante de *Bi. flaviscutellata* (distância igual a 15,5696), o que mostra que a forma da asa de *Mg. migonei* é mais semelhante de *Br. troglodytes*. *Bi. flaviscutellata* apresenta distâncias maiores para as espécies do gênero *Nyssomyia* do que *Mg. migonei* sendo os valores para cada espécie, respectivamente, para *Ny. neivai* (13,8055; 8,347), *Ny. intermedia* (14,1328; 7,8832) e *Ny. whitmani* (14,6954; 8,0886). Este distanciamento de *Bi. flaviscutellata* para com as outras espécies se deve a diminuição da parte basal de R5 se aproximando da bifurcação de R2+3+4 e do grande deslocamento observado no encontro de R1 com a margem da asa, variações essas que se mostram específicas para essa espécie comparando a com as demais. Quando comparamos apenas as espécies de *Nyssomyia* percebemos que as distâncias são muito pequenas sendo a maior entre *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* (2,8317) e a menor entre a primeira e

Ny. intermedia (1,6403), corroborando com o grau de similaridade encontrado entre essas espécies quando comparadas a partir de outros caracteres.

A significância dos testes t^2 , distância de Mahalanobis e Procrustes após o teste de permutação, utilizados na análise discriminante, foram menores que 0,0001 exceto entre *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* que o valor de p após os testes de permutação para a distância de procrustes foi menor que 0,001. Quanto aos resultados do teste t^2 , os positivos indicam que as médias do primeiro grupo são maiores que as do segundo. Com isso, verificamos que os valores de *Br. troglodytes* comparados com os das demais mostram um valor t^2 alto com valores mínimos de 5177 aproximadamente (quando comparados a *Mg. migonei*) e máximo de 8838, quando comparado a *Ny. neivai*. O menor valor encontrado para t^2 entre pares de espécies foi entre *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* ($t^2= 97,1981$), resultado que corrobora com os anteriores. Os valores de t^2 obtidos mostram padrão de diferenciação entre as espécies semelhante a aqueles encontrados para as distâncias de Mahalanobis quando comparados os pares de espécies, com as espécies de *Br. troglodytes* e *Bi. flaviscutellata* sendo mais distantes das demais *Mg. migonei* em uma posição intermediária e as espécies de *Nyssomyia* apresentando baixa distância entre as formas.

Quanto à classificação entre os espécimes, quando comparados os pares de espécies observamos que foram classificados corretamente 100% dos espécimes (o mesmo ocorrendo para a validação cruzada), quando comparadas as espécies de *Br. troglodytes*, *Bi. flaviscutellata* e *Mg. migonei* com as demais, dado explicado pela diferença significativa nas formas das asas que permite a distinção dessas. Dentro do gênero *Nyssomyia*, observamos que as classificações corretas diminuem, havendo inclusão de espécimes de uma espécie em outra que não aquela a que pertence. Com isso, vemos que quando comparamos *Ny. intermedia* com *Ny. neivai* e *Ny. whitmani*, temos um número de indivíduos classificados erroneamente maior quando comparamos com a primeira (17 espécimes) e menor com a segunda (11 espécimes), para a validação cruzada essa classificação sobe para 29 e 17, número alto que mostra a similaridade entre as espécies, principalmente entre as duas primeiras. Entre *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* esse número de classificação errada é de 6 espécies e após a validação cruzada de 14 espécimes, o que demonstra que a forma das asas são mais distintas entre essas, do que quando comparadas com *Ny. intermedia*.

5.2 MORFOMETRIA CLÁSSICA E MORFOLOGIA

Os resultados obtidos na análise intraespecífica nas espécies mostraram que existe diferença significativa entre machos e fêmeas para a maioria das estruturas medidas, o que corrobora com o fato já conhecido de que fêmeas possuem o corpo maior que os dos machos, devido à necessidade de distensão do corpo para a alimentação sanguínea e albergar os ovos.

Na análise interespecífica, podemos perceber que na comparação entre as estruturas compartilhadas por machos e fêmeas, nenhuma delas separou de forma significativa todas as espécies, porém alguns agrupamentos puderam ser observados. No caso da análise dos comprimentos das estruturas, flagelômero I e II, de gama, do fêmur anterior, da Tíbia mediana e posterior e do Tarsômero I anterior, mediano e posterior, mostraram que não são capazes de diferenciar, conseqüentemente agrupando as espécies do gênero *Nyssomyia*.

Alguns caracteres puderam diferenciar as espécies *Ny. neivai* de *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* (embora as duas últimas não tiveram diferenciação significativa). Tais caracteres se referem aos comprimentos da nervura R5, Alfa, Fêmur Posterior, Tíbia anterior e Tarsômeros II, III, IV e V anteriores, medianos e posteriores. Isso sugere serem caracteres importantes para a distinção das espécies. Para todos os caracteres mencionados anteriormente, *Br. troglodytes*, *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata* se mostraram significativamente diferentes das demais, exceto para os comprimentos de alfa e da Tíbia anterior. Ainda comparando as espécies do gênero *Nyssomyia*, vemos que a menor distância entre os olhos e o comprimento do palpômero 5 separou *Ny. whitmani* de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*. Além disso, podemos perceber que a menor distância entre os olhos separa todas as espécies menos as duas últimas citadas, mostrando-se uma característica importante para diferenciação dos grupos, enquanto que o palpômero 5 separou *Mg. migonei* e *Br. troglodytes* das demais. O comprimento do Labro-epifaringeo e do Labio separaram as espécies de *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata* das demais porém agrupou as espécies de *Nyssomyia* com *Br. troglodytes*. As demais estruturas não diferenciaram bem os grupos.

As características específicas de fêmea mostraram uma completa diferenciação entre as espécies apenas para a Largura dos Dutos Individuais, sendo os de *Br. troglodytes* os mais finos e os de *Ny. intermedia* os mais calibrosos. Quanto ao comprimento dos Dutos Individuais, *Bi. flaviscutellata* (com dutos curtos) e *Br. troglodytes* (com dutos muito longos) se mostraram diferentes das demais, enquanto que *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* (com dutos intermediários entre as espécies) não apresentam distinção, assim como ocorre com *Ny.*

whitmani e *Mg. migonei*, que possuem dutos longos mais não tanto quanto os encontrados em *Br. troglodytes*.

O comprimento do corpo da espermateca se mostrou diferente para todas as espécies menos para *Ny. intermedia* e *Bi. flaviscutellata*. Quando comparamos as espécies de *Nyssomyia* para essa característica percebemos que o tamanho apresentado por *Ny. neivai* (33,938) é menor que de *Ny. intermedia* (38,895) e de *Ny. whitmani* (44,655), o que pode ser explicado pelo número de anéis presentes no corpo das espermatecas dessas espécies, onde o número mais frequentemente observado para cada uma delas respectivamente foi, 10 anéis, 11 anéis e 16 anéis. O número de anéis mais frequentes em *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* foi semelhante porém a quantidade de anéis na primeira espécies variou de 10 a 13 anéis enquanto que para a segunda variou de 8 a 11. Os achados aqui presentes estão de acordo com o achado por Marcondes (1996) onde o tamanho do comprimento da espermateca e número de anéis da espermateca são maiores em *Ny. intermedia* do que em *Ny. neivai*, mesma observação feita por Andrade Filho et al. (2006).

A largura do corpo da espermateca apresentou diferença dentre todas as espécies, com exceção de *Ny. neivai* e *Bi. flaviscutellata*. Para essa característica *Ny. whitmani* (10,250) tem menor largura que *Ny. neivai* (13,515) e *Ny. intermedia* (16,330), essa diferença se dá principal pelo tamanho dos anéis mais apicais. O comprimento dos cercos mostrou que as espécies de *Nyssomyia* se agrupam e que *Bi. flaviscutellata* não apresenta diferença significativa para *Ny. whitmani*, as outras duas espécies analisadas apresentaram diferenciação para com as demais.

O comprimento do Duto comum mostrou que todas as espécies se separam menos *Ny. whitmani* (9,600) e *Mg. migonei* (11,650) que possuem dutos muito curtos com relação as outras espécies. *Bi. flaviscutellata* (75,850) é a que apresenta maior comprimento e seguido de *Ny. intermedia* (42,515) e *Ny. neivai* (19,965). Essa característica é a que mais bem separa as fêmeas dessas duas últimas espécies. Já a sua largura apenas diferencia *Bi. flaviscutellata* das demais, sendo que aqui essa espécie apresenta os menores valores. A diferença entre o tamanho do duto comum foi salientado por Marcondes (1996) e Andrade Filho et al. (2003) como uma característica importante para a distinção dos espécimes de fêmeas.

Para os machos a única estrutura que separou todos os espécimes foi o comprimento da bomba genital onde as espécies, devido a diferenças significativas do tamanho da estrutura com *Br. troglodytes* apresentando o maior tamanho, seguido de *Ny. intermedia*, *Bi. flaviscutellata*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Mg. migonei*. O comprimento do Pistão apenas não separou *Bi. flaviscutellata* de *Ny. intermedia*, o que faz com que os tamanhos da bomba

genital sejam mais próximos como podemos ver anteriormente, sendo o pistão uma estrutura componente da bomba genital. Características como o comprimento do filamento genital, a distância entre o espinho apical e o externo superior e o comprimento do lobo lateral podem ser consideradas características que separam bem a maior parte das espécies, apenas havendo alguns agrupamentos de espécies de *Nyssomyia*. As outras estruturas estudadas não separaram bem as espécies.

A presença de diferenciações na parte final dos filamentos genitais permitiu que observássemos uma diferenciação no tamanho dessa estrutura entre as espécies, confirmando que além da forma diferente apresentada pelas espécies elas também podem ser diferenciadas pelo seu comprimento, com exceção de *Ny. intermedia* e *Bi. flaviscutellata* apresentaram tamanhos que não puderam ser separados significativamente, de qualquer forma essas espécies podem ser facilmente diferenciadas pela forma dessa estrutura. A razão entre os filamentos genitais e o final destes também mostrou diferenciação, com as espécies de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* sendo diferentes, fator esse que pode acrescentar mais uma característica para a diferenciação dessas espécies, que apresentam poucos caracteres que possam separá-las em espécimes machos.

Ainda, outras características morfológicas podem separar bem as espécies ou grupos de espécies, tais como o número e quantidade de fileiras de dentes na lácina da maxila, onde as espécies do gênero *Nyssomyia* apresentam duas fileiras de dentes com a quantidade de dentes variando de 12 a 20, e as demais espécies apresentando apenas uma fileira com *Br. troglodytes* apresentando de 6 a 7 dentes, *Mg. migonei* de 3 a 5 dentes e *Bi. flaviscutellata* variando de 9 a 11 dentes. A presença de apenas uma fileria de dentes parece ser, provavelmente, uma característica ancestral comparada com a presença de duas fileiras.

A implantação dos dentes no cibário e o número em que aparecem são fatores que mostram diferenças entre os gêneros com *Br. troglodytes* apresentando de 15 a 20 dentes implantados em 4 colunas enquanto que as demais espécies apresentam dentes em implantados em fileiras (característica mais derivada), e a quantidade de dentes variando de 8 a 19 no gênero *Nyssomyia*, 4 dentes em *Mg. migonei* e 6 dentes para *Bi. flaviscutellata*, onde esta apresenta uma característica única entre as espécies estudadas que é uma área esclerotizada na câmara do cibário. Estudo comparativo entre várias populações de *Ny. neivai* e *Ny. intermedia* realizado por Andrade Filho et al. (2006) mostrou que o número de dentes no cibário é muito variável sendo diferente dependendo da população analisada, não sendo então uma boa característica para discriminar essas espécies.

Algumas características como presença de sutura-interocular, de prolongamento anterior nos ascóides, de papila em AV, implantação dos ascóides de forma não pareada, ausência de duto comum, presença de duas papilas em AIII, 5 espinhos no gonóstilo e presença de sensila-ventrocervical são características exclusivamente encontradas em *Br. troglodytes* sendo essas condições primitivas encontradas nos flebotomíneos (Galati, 2003). Outras características como a presença de cerdas longas na parte apical do gonocoxito, protuberância na parte basal do gonocoxito, presença de cerdas e processo no parâmero também são características exclusivas dessa espécie quando comparadas com as demais.

Vale ressaltar que *Mg. migonei* não apresenta sensila-ventrocervical mas as demais espécies inseridas no gênero *Migonemyia* apresentam essa estrutura, o que leva a crer que a perda dessa estrutura ocorreu posteriormente a divisão do grupo. Outra característica que observamos em alguns espécimes de *Mg. migonei* foi a presença de 1 papila em AV, característica primitiva, que pode não ter sido totalmente perdida em grupos dessa espécie. A presença de cerda espiniforme pré-apical, que é um espinho vestigial atrofiado, apenas nessa espécie mostra também que essa espécie guarda características primitivas (Galati, 2003).

Os espinhos de Newstead no palpômero III mostra que as espécies de *Nyssomyia* e *Br. troglodytes* apresentam implantação semelhante na estrutura com essas estruturas concentradas em uma região mais proeminente no meio da estrutura, enquanto que em *Mg. migonei* estes estão agrupados no segundo terço da estrutura e *Bi. flaviscutellata* estão dispersas por todo o artícolo. Quanto à terminação dos ascóides foi observado que se prolongam até a papila pré-apical em *Bi. flaviscutellata*, apenas um dos ascóides ultrapassa a papila em *Br. troglodytes* (devido a implantação não pareada dessas estruturas) e ultrapassam a papila em todas as demais espécies. A presença de cerdasidade na parte anterior do catapisterno está ausente nas espécies do gênero *Nyssomyia*.

As características das espermatecas são importantes para a diferenciação dos grupos onde podemos observar que *Mg. migonei* apresenta o corpo da espermateca liso, com duto individual e comum lisos, para *Br. troglodytes* a espermateca tem aspecto estriado, com duto individual liso, e a cabeça da espermateca apresenta ângulo de 90° com o corpo da espermateca. As espécies do gênero *Nyssomyia* e de *Bi. flaviscutellata* apresentam corpo da espermateca anelado, porém o duto comum desta última espécime se apresenta pouco estriado enquanto das demais é liso. Os dutos individuais se apresentam pouco estriados em *Bi. flaviscutellata* e em *Ny. intermedia*, enquanto que nas demais espécies ele é liso.

Para a genitália masculina a porção final do lobo lateral se mostrou afilado em *Br. troglodytes* e *Mg. migonei* e oblongo nas demais espécies. Os parâmeros apresentam

diferenciação entre os gêneros com as espécies de *Nyssomyia* apresentando essa estrutura de forma semelhante, com grande afilamento na estrutura a partir do terço apical, *Mg. migonei* apresentando o parâmero curvo, *Bi. flaviscutellata* com parâmero rombo e *Br. troglodytes* com forma de clava. O tufo de cerdas presente *Mg. migonei* apresentou de 5 a 7 cerdas e os de *Br. troglodytes* mais de 70 cerdas, com as demais espécies não apresentando essas cerdas. O final dos filamentos genitais não apresentam diferenciação para as duas últimas espécies citadas tendo aspecto afilado, nas outras espécies essa estrutura se apresenta de forma distinta para cada uma delas, onde as formas são: Concha para *Ny. intermedia*, Colher para *Ny. neivai*, Bifurcado para *Ny. whitmani* e em forma de “L” invertido para *Bi. flaviscutellata*. Essas estruturas são importantes para a identificação dos machos dessas três espécies de *Nyssomyia*.

A coloração do tórax e dos escleritos mostrou que *Br. troglodytes* apresenta todos os escleritos e o escudo castanhos escuros, *Mg. migonei* apresenta todos os escleritos castanhos claros apenas o pronoto, o metepisterno e o paratergito pálidos. Para as espécies de *Nyssomyia* todos os escleritos torácicos são pálidos e o pronoto, o mesonoto e o escutelo são castanhos escuros e *Bi. flaviscutellata* apresenta o mesmo padrão sendo diferente apenas pela coloração do escutelo que se apresenta pálido, fato que dá nome a espécie.

5.2.1 Função Discriminante e Variáveis Canônicas

A avaliação das variáveis canônicas mostrou que as espécies se separam de forma significativa quando comparadas as características avaliadas para ambos os sexos, apenas *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* se mostraram em uma área de interseção onde 73 dos 80 espécimes se classificaram corretamente e na validação cruzada 65 destes. Mostrando que alguns espécimes apresentam medidas que poderiam estar tanto em uma quanto na outra espécie. Das estruturas que mais influenciaram na variação da amostra podemos citar as 5 primeiras sendo elas Menor distância entre olhos, Comp. Tarsômero I anterior, Comp. Palpo III, Comp. Tarsômero I mediano e Comp. Tarsômero III anterior.

Através da análise feita anteriormente para a diferença das espécies podemos ver que dessas variáveis, apenas uma delas (separava *Ny. intermedia* de *Ny. neivai*), o que pode ter influenciado na diminuição dos espécimes corretamente classificados. Comparando-se as análises feitas com as características de machos e as de fêmeas, primeiramente percebemos que as espécies se classificam 100% corretamente, havendo diminuição dessa porcentagem

apenas entre as duas espécies citadas anteriormente. Interessante notar que na análise realizada nos machos, as características específicas desse sexo se fizeram mais presentes na variação da amostra do que aquelas específicas de fêmeas, cabe aqui salientar que uma importante característica de diferenciação entre as duas espécies não foi calculada devido a ausência dessa em outras espécies, sendo essa o comprimento do duto comum, o que pode ter diminuído a discriminação entre as mesmas. Sendo assim as classificações corretas foram maiores para os machos (100%, 40/40 espécimes) e para fêmeas (94,4%, 34/36 espécimes), após a validação cruzada os valores foram respectivamente 85% (34/40 espécimes) e 80,55% (29/39 espécimes). Analisando apenas as espécies do gênero podemos comprovar que as medidas das características específicas de macho separam melhor as espécies *Ny. intermedia* de *Ny. neivai*, com classificação correta de 100% para ambos os sexos, porém após a validação cruzada os índices mudam drasticamente com a porcentagem para machos sendo igual a 92,5% e para fêmeas igual a 65,71%.

Cazorla & Acosta (2003) em um estudo comparativo entre espécies do complexo *cayennensis*, sendo elas, *Micropygomyia yencanensis*, *Micropygomyia c. cayennensis* e *Micropygomyia micropyga*, utilizando-se de análise de variáveis canônicas conseguiram discriminar as três espécies com 100% de classificação correta. Dujardin & Le Pont (2000), avaliando sub-espécies do gênero *Psychodopygus* demonstraram que era capaz de separar a espécie *Psychodopygus carrerai thula* de *Psychodopygus carrerai carrerai*, onde a primeira sempre foi associada como sub-espécie da segunda por sua semelhança e por ocorrerem em alopatria.

A ausência de classificação correta em 100% dos espécimes no nosso trabalho pode ser devido a utilização de todos os caracteres morfométricos analisados, provavelmente uma análise apenas das variáveis que mais discriminam os grupos separaria em 100% todos os espécimes de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*.

Sabidamente, a *L. (V.) braziliensis* é o agente etiológico mais importante na epidemiologia das LTA, não apenas pelo quadro de deformidades que pode estar associado, mas pela ampla distribuição no território brasileiro. Neste contexto, *Ny. intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Mg. migonei*, destacam-se como importantes vetores nas diferentes regiões geográficas do Brasil.

Entretanto, em algumas situações, como por exemplo, no Ceará, em Minas Gerais, na Bahia, no Rio de Janeiro, dentre outros, a transmissão de *L. (V.) braziliensis* está associada à participação de mais de um vetor, ocorrendo em simpatria. Nessas circunstâncias, como

definir o vetor primário e o vetor secundário, se ambos apresentam os critérios essenciais para serem os potenciais vetores?

A densidade populacional, talvez induza a alguma hipótese, mas que não leva em conta a relação *Leishmania*-flebotomíneo, na lógica do processo co-evolutivo. Alguns estudos apontam para o processo co-evolutivo entre as leishmânias e os flebotomíneos, a partir do Cretáceo, inclusive sugerindo que os vetores na verdade seriam os hospedeiros primitivos (Poinar G.; Poinar R., 2004, Poinar, 2008).

Recentemente, foi discutida a importância de se considerar as relações entre espécies de flebotomíneos, através da filogenia, para uma melhor compreensão do papel destes vetores, principalmente na categorização de primário ou secundário (Ready 2012).

Nesta perspectiva, estudos filogenéticos que analisem as espécies de flebotomíneos associados à transmissão de *L. (V.) braziliensis* poderão trazer a luz informações importantes não apenas numa avaliação evolutiva, mas também contribuir para um melhor entendimento da ecologia das LTA associada a este parasito.

Embora a morfologia, ao longo dos anos, tenha contribuído de forma significativa não apenas para a correta identificação de espécies, mas também para estudos filogenéticos de flebotomíneos (Young & Duncan 1994, Galati 2003), os estudos de morfometria clássica desenvolvidos por nós, revelou alguns caracteres que podem ser diagnósticos de espécies, como por exemplo, comprimento dos dutos comuns, largura do duto individual, razão do filamento genital pelo final dos filamentos genitais, distância entre o espinho apical e o externo superior.

Por outro lado, a morfometria geométrica, ainda pouco explorada em estudos sobre Phlebotominae, se mostra como uma ferramenta adicional e importante. A utilização de um conjunto de caracteres para análises da morfologia e da morfometria (clássica e geométricas), certamente trazem um embasamento consistente para estudos filogenéticos.

6 CONCLUSÕES

- A morfometria geométrica das asas é uma ferramenta útil que pode identificar padrões de gêneros e espécies de flebotomíneos.
- As morfometrias geométrica e clássica foram capazes de separar os gêneros *Brumptomyia*, *Migonemyia*, *Bichromomyia* e *Nyssomyia*.
- As formas médias das asas de *Nyssomyia* se apresentam mais próximas de *Mg. migonei* do que de *Bi. flaviscutellata*.
- A análise do tamanho do centróide mostrou diferenciação significativa entre as espécies do complexo *intermedia*, *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*.
- Dados morfométricos de estruturas da genitália masculina separam melhor as espécies do que os da genitália feminina.
- Dentre todos os caracteres observados, para ambos os sexos, os que mais contribuíram para a diferenciação das espécies foram: o comprimento da bomba genital, o comprimento do corpo da espermateca e a largura dos dutos individuais.
- A razão entre os filamentos genitais e o final dos filamentos genitais pode ser mais uma característica útil para a diferenciação das espécies *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*.
- As análises corroboraram com a separação de *Bichromomyia* e *Nyssomyia*.
- As espécies vetoras de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Nyssomyia intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Migonemyia migonei* são feneticamente mais próximas entre si do que *Bi. flaviscutellata*, vetor de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

REFERÊNCIAS

- Adler S. Observations on *Leishmania chagasi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1940 Jan;35(1):173–9.
- Afonso MMDS, Gomes AC, Meneses CRV, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2005 Dec;21(6):1816–20.
- Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. Polymorphism, inter-population and inter-specific variation in *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) and *Nyssomyia neivai* (Pinto) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Revista Brasileira de Entomologia. 2006 Sep;50(3):385–93.
- Andrade Filho JD, Brazil RP. Relationships of new world Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) based on fossil evidence. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003 Jan;98:145–9.
- Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007 Jun;102(4):481–7.
- Araújo Filho NA. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Ilha Grande. Rio de Janeiro. Tese [Pós-Doutorado] Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1979.
- Artemiev MM. A classification of the subfamily Phlebotominae. Parasitologia. 1991 Dec;33 Suppl:69–77.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1269–81.
- Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2007 Jul;101(7):735–7.
- Azevedo AC, Rangel EF, Queiroz RG. *Lutzomyia migonei* (França 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990 Dec;85(4):479.

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

Brandão-Filho SP, de Brito ME, Martins CA, Sommer IB, Valença HF, Almeida FA, et al. American cutaneous leishmaniasis in a military training center located in Zona da Mata, Pernambuco, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998 Dec;31(6):575–8.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [homepage na internet]. Leishmaniose Tegumentar Americana [acesso em 22 ago 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [homepage na internet]. Leishmaniose Visceral [acesso em 22 ago 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

Brazil RP, Brazil BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In, Rangel, E. F.; Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2003. p. 257-274.

Camargo-Neves VLF, Gomes A de C, Antunes JLF. [Correlation of the presence of phlebotominae species (Diptera: Psychodidae) with records of American tegumentary leishmaniasis cases in the State of São Paulo, Brazil]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002 Aug;35(4):299–306.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcao AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008 Jun;8(3):407–14.

Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araújo Pereira T, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 2010 Oct;116(1):108–10.

Castro GO. Sobre o processo de cultura de flebótomos Nota prévia. In. Sociedade de Biologia, sessão de 8 de outubro, Rio de Janeiro, 1937.

Cazorla D, Acosta M. Multivariate morphometric discrimination among three species of *Lutzomyia* subgenus *Micropygomyia* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 2003 Nov;40(6):750–4.

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

Costa SM da, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *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.* 2007 Mar;102(2):149–53.

Dantas-Torres F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006 Dec;101(8):929–30.

De la Riva J, Le Pont F, Ali V, Matias A, Mollinedo S, Dujardin JP. Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001 Nov;96(8):1089–94.

Dias-Sversutti A, de L Scodro RB, Reinhold-Castro KR, Neitzke HC, Teodoro U. Preliminary study on feeding preference of *Nyssomyia neivai* (Pinto) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) in a rural area of the State of Paraná, South Brazil. *Neotrop. Entomol.* 2007 Dec;36(6):953–9.

Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro ACC de, Alves TP. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006 Feb;39(1):43–6.

Dujardin J-C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol.* 2006 Jan;22(1):4–6.

Dujardin JP, Le Pont F, Martinez E. Quantitative phenetics and taxonomy of some phlebotomine taxa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999 Nov;94(6):735–41.

Dujardin JP, Le Pont F. Morphometrics of a neotropical sandfly subspecies, *Lutzomyia carrerai thula*. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie.* 2000 Mar;323(3):273–9.

Dujardin J-P, Pont FL, Baylac M. Geographical versus interspecific differentiation of sand flies (Diptera: Psychodidae): a landmark data analysis. *Bul Entomol Res.* 2003;93(01):87–90.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Rev de Saúde Pública. 1972 Dec;6(4):431–3.

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

Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. Bol Dir Malariol San Amb. 1995; 35(1): 133-142.

Galati EAB Nunes VL; Rego-Jr FA, Oshiro ET, Rodrigues M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saúde Pública 1997; 31(4):378-90.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae e Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In, Rangel, E. F.; Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2003. p. 23-175.

Gonçalves BRD. Identificação da fauna de flebotomíneos em função de casos autóctones de LTA. Boletim Epidemiológico, Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, 2003. 21:5.

Gontijo CMF, Coelho MV, Falcão AR, Falcão AL. The finding of one male specimen of *Lutzomyia renei*: (Martins, Falcão; Silva, 1957) experimentally infected by *Leishmania*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987; 82(3):445.

González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Cochrane Database Syst Rev. 2009;(2).

Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ da, Silva KT da, Silva KG da, Araújo AIF de, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012 Feb;45(1):66–70.

Kerr SF, Merkelz R, Mackinnon C. Further support for a Palaearctic origin of *Leishmania*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000 Aug;95(4):579–81.

Kerr SF. Palaearctic origin of *Leishmania*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000 Jan;95(1):75–80.

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

Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Rioux JA, Lanotte G, Leaney AJ. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1980;74(5):563–5.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 1999 Jun;17(3):279–89.

Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 2011,11:353-357.

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In Lumsden WHR, Evans DA. *Biology of the Kinetoplastidae*, Vol. 2, London, New York, San Francisco: Academic Press; 1979. p. 1-116.

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.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA de, Braga RR, Ishikawa EAY, et al. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1994 Sep;89(3):435–43.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic Problems. *Br Med Bull.* 1972 Jan 1;28(1):44–8.

Lainson R, Shaw JJ. *New World Leishmaniasis*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2005.

Lainson R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1997; 92:377-387,.

Leng YJ. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1987 Jun;81(3):311–7.

Lewis DJ, Young D g., Fairchild GB, Minter DM. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Entomol.* 1977;2(4):319–32.

Machado TO, Bragança MAL, Carvalho ML, Andrade Filho JD. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in different environments in the district of Taquarucú, state of Tocantins, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012 Nov;107(7):955–9.

Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH. Geographic distribution of phlebotomine sandflies of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) complex (Diptera, Psychodidae). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998 Feb;31(1):51–8.

Marcondes CB, Lozovei AL, Falqueto A, Brazil RP, Galati EAB, Aguiar GM, et al. Influence of altitude, latitude and season of collection (Bergmann's Rule) on the dimensions of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999 Sep;94(5):693–700.

Marcondes CB, Alexander B. Correlation of male genital filaments and female spermathecal ducts in New World sand flies of the *Lutzomyia intermedia* species complex (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003 Jul;98(5):611–3.

Marcondes CB, Day JC, Ready PD. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani* and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997; 91: 725-726.

Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (diptera: psychodidae: phlebotominae) of the world. Entomol. News. 2007 Sep 1;118(4):351–6.

Marcondes CB. A Redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and Resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1996 Aug;91(4):457–62.

Marcondes CB, Bittencourt IA, Stoco PH, Eger I, Grisard EC, Steindel M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) *spp.* in Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2009 Nov;103(11):1093–7.

Martins A.V.; Williams P.; Falcão A.L. American Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), An. Acad. Bras. Ciênc. Rio de Janeiro, p. 195, 1978.

Marzochi MC de A, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad. Saúde Pública. 1994 Jul;10:S359–S375.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology. 1999 Sep;119 (Pt 3):237–46.

Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky ÉM, Dias ES. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011 Feb;44(1):76–8.

Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000 Aug;95(4):583–8.

Momen H, Grimaldi Junior G, Deane LM, Momen H, Grimaldi Junior G, Deane LM. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of american visceral Leishmaniasis (AVL)? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1987 Sep;82(3):447–8.

Muzón J, Spinelli GR, Salomón OD, Rossi GC. A first record of phlebotominae from Argentinean Patagonia (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002;97(6):797–8.

Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect.* 2007 Mar;9(3):317–24.

Nieves E, Pimenta PFP. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002 Dec;67(6):640–7.

Noyes H. Implications of a Neotropical Origin of the Genus *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1998 Sep;93(5):657–62.

Noyes HA, Arana BA, Chance ML, Maingon R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1997 Oct;44(5):511–7.

Noyes HA, Morrison DA, Chance ML, Ellis JT. Evidence for a neotropical origin of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000 Aug;95(4):575–8.

Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MVZ, de Oliveira Legriffon CM, Lonardon MVC, Teodoro U, et al. Natural Infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia) spp.* in the State of Paraná, Southern Brazil, Detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 Feb;11(2):137–43.

Pimenta PF, Secundino NFC, Blanco EEN. Interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. In: Rangel, E. F.; Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003. p. 275-289.

Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Franco A, Meneses C, Rangel E, Mayrink A, Gonçalves AJ, Fernandes O, Grimaldi G. Edentates as a possible reservoir of *L. (V.) braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92 (Suppl. I): 119.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, de Figueiredo Barbosa A, et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2005 Dec;99(12):905–13.

Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. Acta Trop. 2008 Jul;107(1):66–9.

Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009 Apr;80(4):593–5.

Poinar G Jr, Poinar R. Evidence of vector-borne disease of Early Cretaceous reptiles. Vector Borne Zoonotic Dis. 2004;4(4):281–4.

Poinar G. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. Parasit Vectors. 2008 Jul 15;1:22.

Prudhomme J, Gunay F, Rahola N, Ouanaimi F, Guernaoui S, Boumezzough A, et al. Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. J. Vector Ecol. 2012 Jun;37(1):137–47.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2005 Feb;38(1):70–2.

Queiroz RG, Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Pessoa FA, Souza RN, David JR 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. Ann J Trop Med Hyg 50: 693-698

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED, Rangel EF, et al. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990 Mar;85(1):39–45.

Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009 Nov;104(7):937–54.

Rangel EF, Souza NA de, Wermelinger ED, Barbosa AF, Rangel EF, Souza NA, et al. Natural infections of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in a endemic area of cutaneous leishmaniasis of Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1984 Sep;79(3):395–6.

Ready P. Sand fly evolution and its relationship to *Leishmania* transmission. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000 Aug;95(4):589–90.

Ready PD, Ribeiro AL, Lainson R, Alencar JE, Shaw JJ. Presence of *Psychodopygus wellcomei* (Diptera: Psychodidae), a proven vector of *Leishmania braziliensis braziliensis*, in Ceara State. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1983;78(2):235–6.

Rispail P, Léger N. Numerical Taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae): 2. Restatement of Classification upon Subgeneric Morphological Characters. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998 Nov;93(6):787–93.

Sacks DL. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. Cell. Microbiol. 2001 Apr;3(4):189–96.

Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. Acta Trop. 2010 Jan;113(1):84–7.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 1998 Jul;12(3):315–7.

Santos SO dos, Arias JR, Hoffmann M de P, Furlan MBG, Ferreira WF, Pereira C, et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003 Oct;36(5):633–4.

Shannon RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. Am J Trop Med. 1939; 19: 131-140.

Shaw, Jeffrey. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. Braz. J. Genet.[online]. 1997; 20.

Shaw J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007 Aug;102(5):541-7.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2006 Aug;101(5):577-9.

Silva O, Grünewald J. Natural haematophagy of male *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). Med. Vet. Entomol. 1999 Oct;13(4):465-6.

Silva AM da, Camargo NJ de, Santos DR dos, Massafera R, Ferreira AC, Postai C, et al. Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Parana State, Southern Brazil. Neotropical Entomology. 2008 Apr;37(2):209-25.

Silveira FT, Corbett CEP. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. Revista Pan-Amazônica de Saúde. 2010 Jun;1(2):143-7.

Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite. 2002 Mar;9(1):43-50.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA, Souza AAA. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1991 Feb;33(1):18-22.

Souza MB, Cardoso PG, Sanavria A, Marzochi MCA, de Carvalho RW, Ribeiro PC, Ponte CS, Meira AM, Meródio JC. Fauna flebotomínica do município de Bom Jardim, Região Serrana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet. 2003;12: 150-153.

Sudia WD, Chamberlain RW. Battery operated light trap, an improved model. Mosq. News. 1962; 22: 126-129.

Tolezano JE, Marcoris SAG, Diniz JMP 1980. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz 40: 49-54.

Tuon FF, Neto VA, Amato VS. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008 Nov;54(2):158–66.

Volf P, Myskova J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trends Parasitol. 2007 Mar;23(3):91–2.

Ward RD, Lainson R, Shaw JJ. Experimental transmissions of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson & Shaw, between hamsters by the bite of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1977;71(3):265–6.

WHO. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010a. Geneva: WHO Press; 2010a. (WHO Technical Report Series, n° 949).

WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. Wkly. Epidemiol. Rec. 2002 Nov 1;77(44):365–70.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, First WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2010b.

Young, D. G. and M. A. Duncan. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem. Am. Entomol. Institute, Associated Publishers, Gainesville, Florida, 1994.

ANEXO I – Estruturas utilizadas na Morfologia e Morfometria Clássica

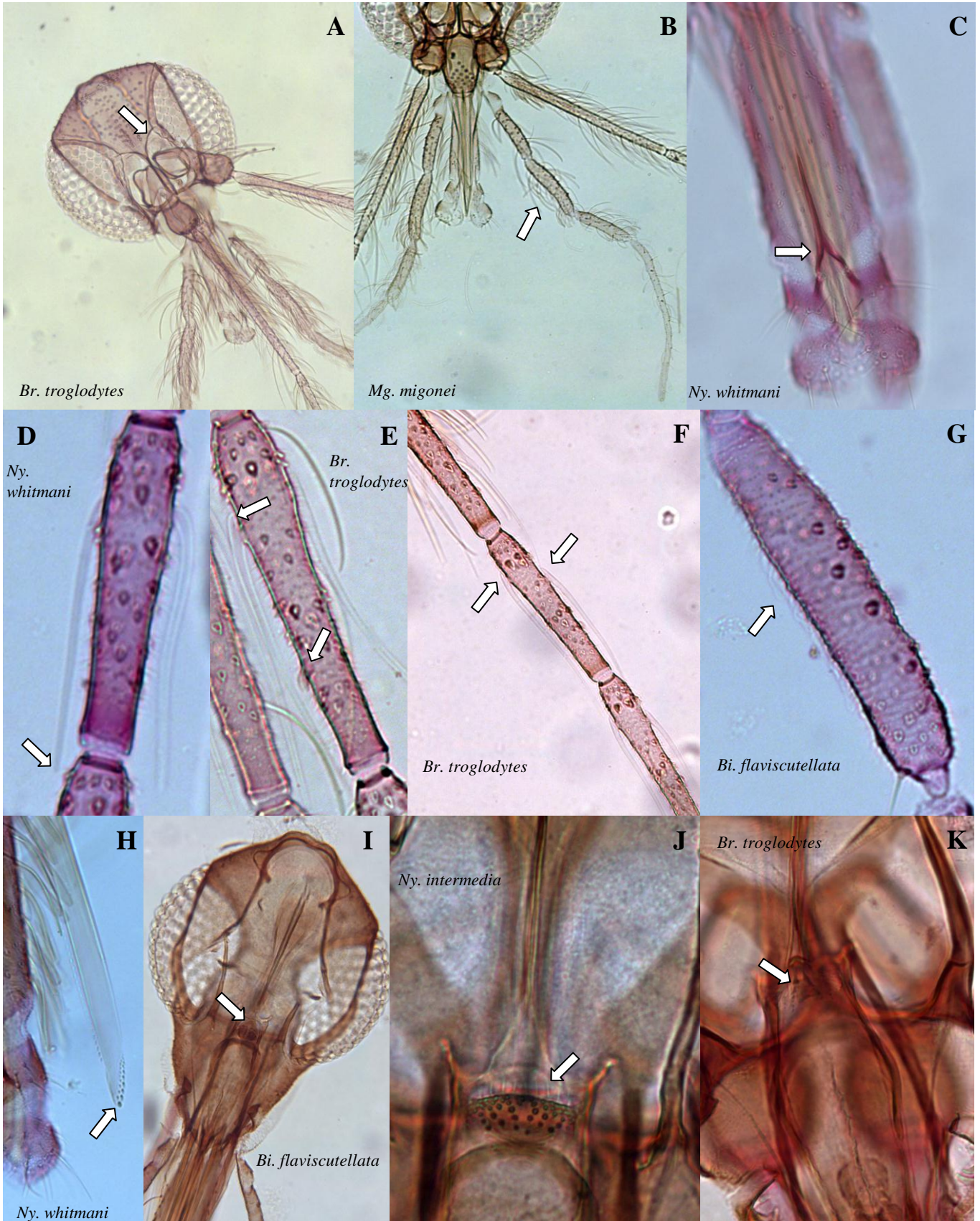


Figura A1 – Caracteres morfológicos da cabeça analisados. A) Sutura Inter-ocular, B) Fórmula Palpal, C) Forquilha labial, D) Parte Terminal dos ascóides, E) Prolongamento anterior dos ascóides (seta superior) e Papila em AV, F) Implantação dos ascóides, G) Implantação Espinhos de Newstead, H) Dentes da Lacinia, I) Área esclerosada na câmara do cibário, J - K) Posição dos dentes horizontais do cibário.

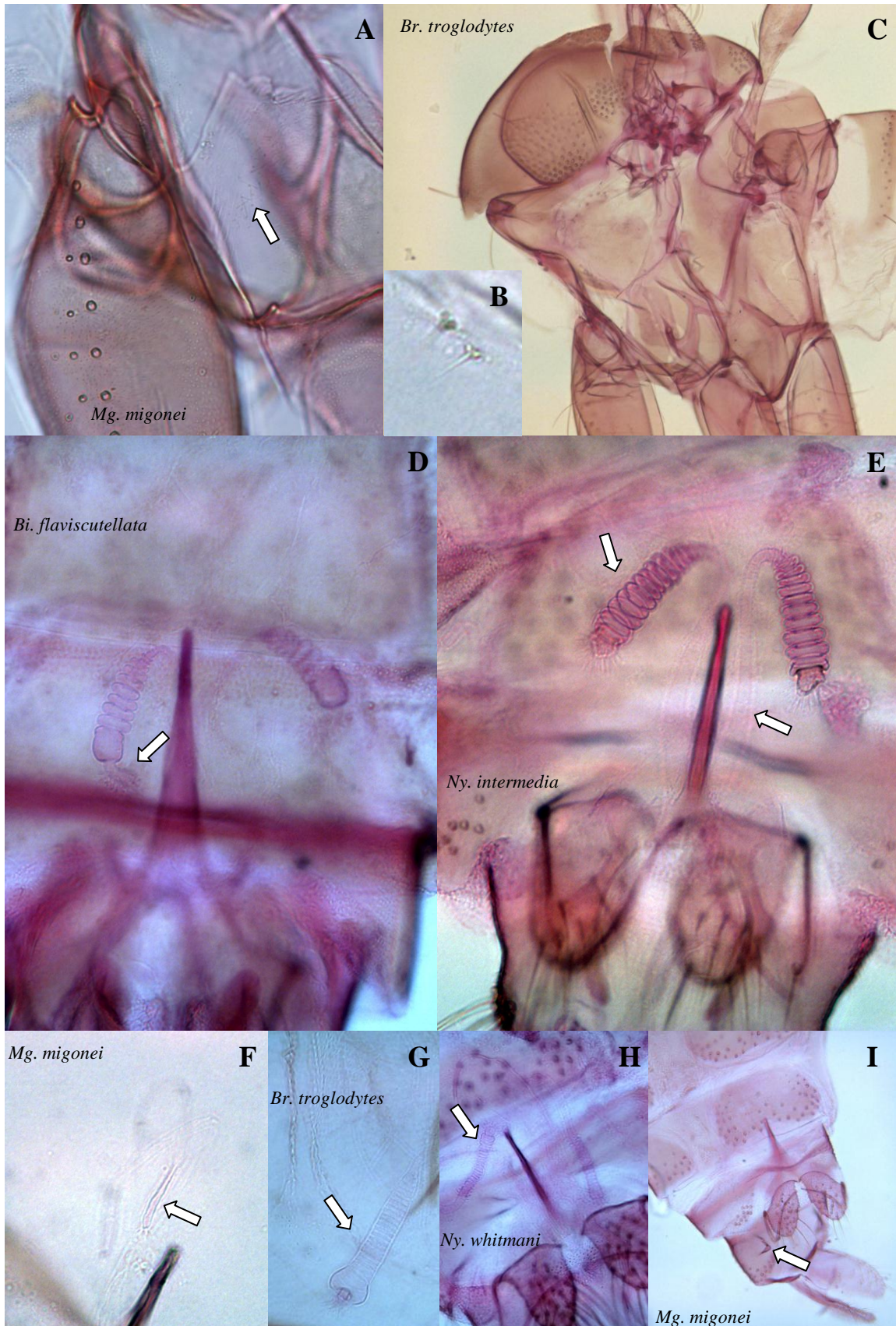


Figura A2 - Caracteres morfológicos do tórax e do abdômen de fêmeas analisados. Tórax: A) Cerdosidade na parte anterior do catepisterno, B) Sensila ventro-cervical, C) Pigmentação do escudo e dos escleritos torácicos. Abdômen de fêmea: D) Ângulo da cabeça em relação ao corpo da espermateca. E) Corpo da espermateca (seta superior) e duto individual (seta inferior), F) Corpo da espermateca de *Mg. migonei*, G) Corpo da espermateca de *Br. troglodytes*, H) Corpo da espermateca de *Ny. whitmani*, I) Protuberância esclerosada no 9º tergito abdominal.

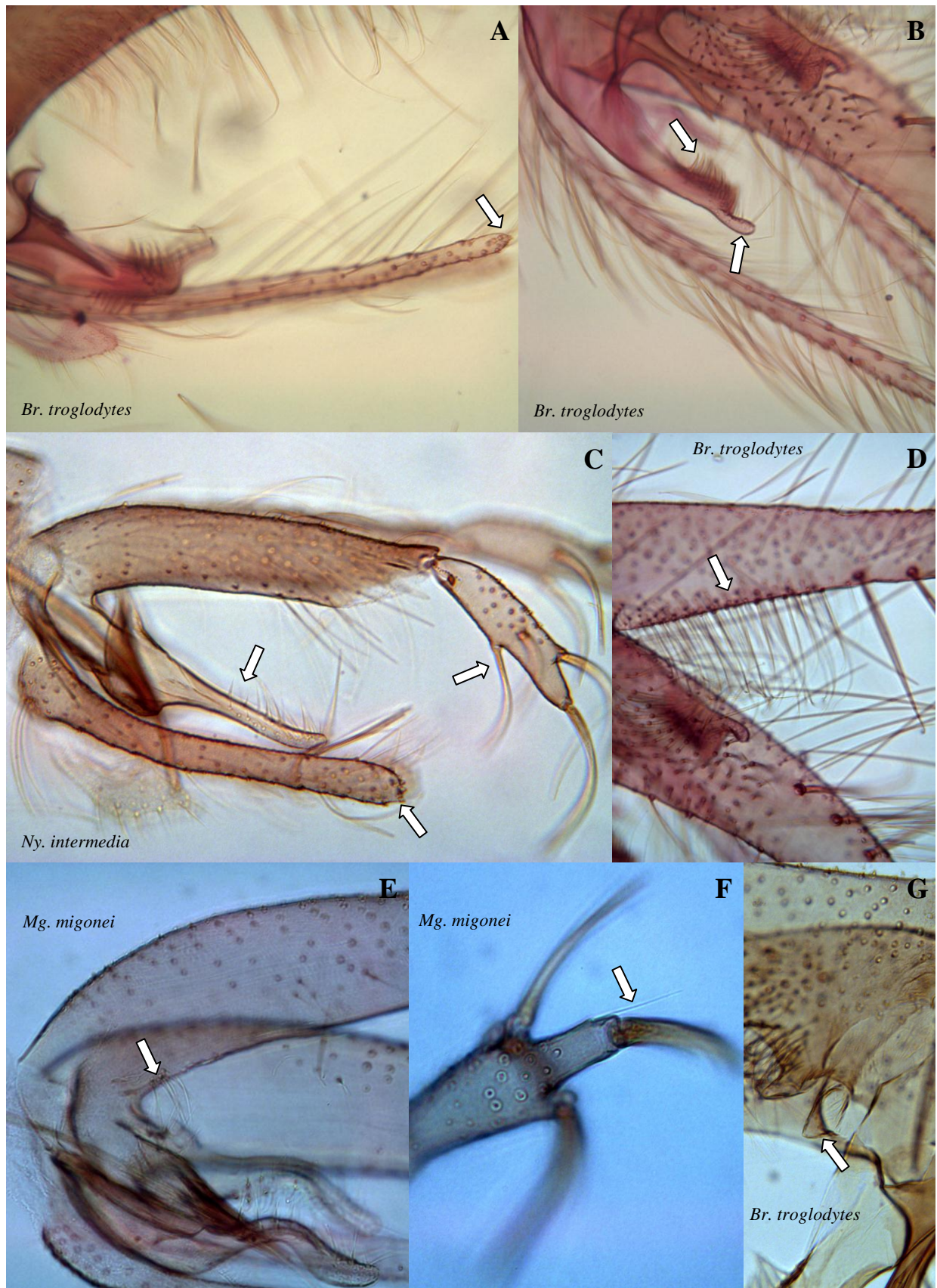


Figura A3 – Caracteres morfológicos do abdômen de machos analisados. A) Ápice do lobo lateral, B) Cerdas diferenciadas (seta superior) e processo (seta inferior) no parâmetro, C) Implantação e número de espinhos no gonóstilo (seta superior), forma do parâmetro (seta mediana) e forma apical do lobo lateral (seta inferior), D - E) Tufo de cerdas na base do gonocoxito, F) Cerdas espiniforme pré-apical, G) Protuberância esclerosada na base do gonocoxito.

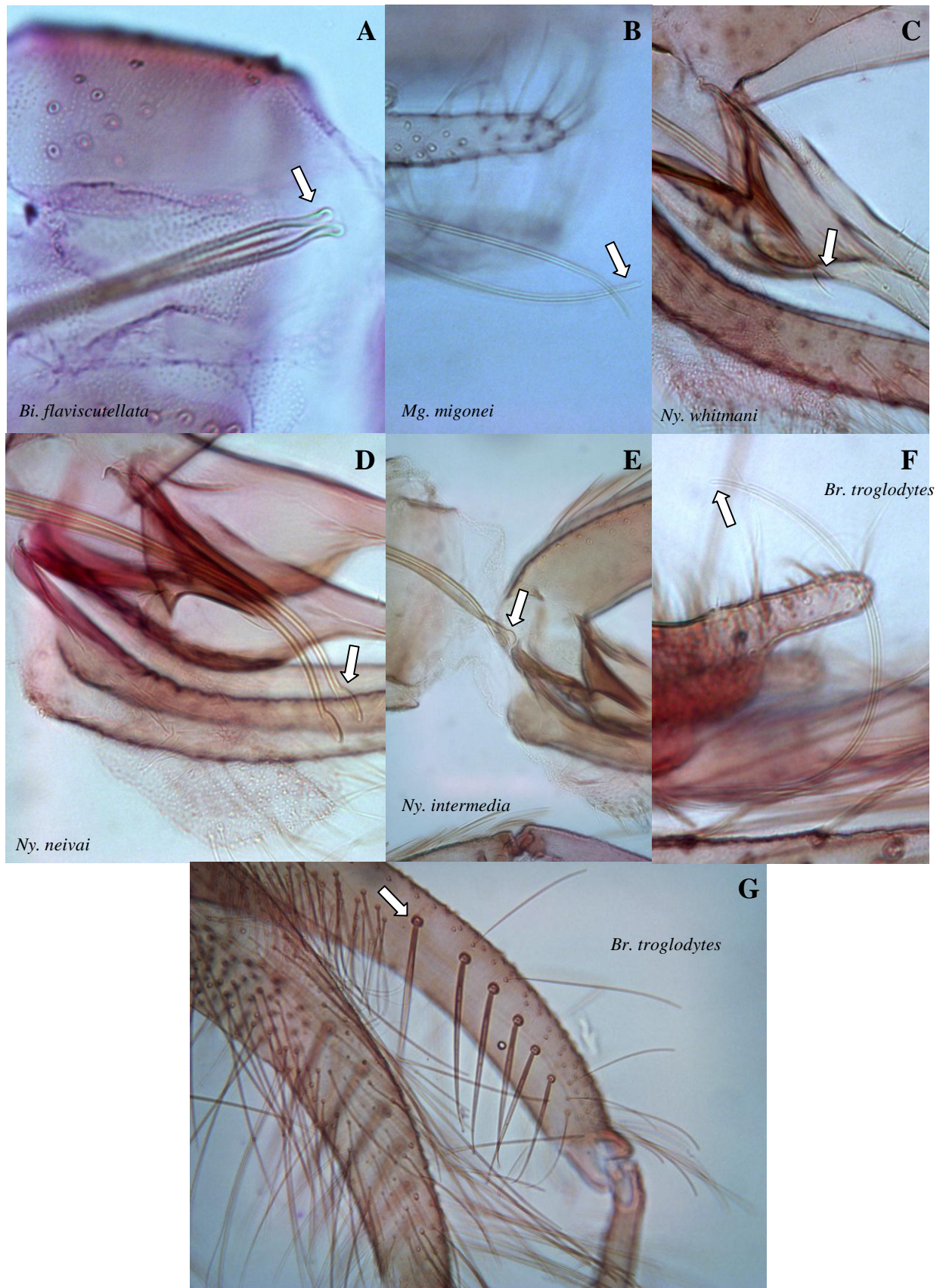


Figura A4 - Caracteres morfológicos do abdômen de machos analisados. Final dos filamentos genitais de: A) *Bi. flaviscutellata*, B) *Mg. migonei*, C) *Ny. whitmani*, D) *Ny. neivai*, E) *Ny. intermedia* e F) *Br. troglodytes*. G) Cerdas longas na parte apical do gonocoxito de *Br. troglodytes*.