

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS /ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE TRÊS ESPÉCIES
CRÍPTICAS E DENDRÓFILAS DE *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barretto, 1962
(DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL

Arley Faria José de Oliveira

Manaus, Amazonas
Julho, 2013

UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS /ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA**

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE TRÊS ESPÉCIES
CRÍPTICAS E DENDRÓFILAS DE *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barretto, 1962
(DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nair Otaviano Aguiar

Co-Orientador: Dr. Felipe Arley Costa Pessoa

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Diversidade Biológica, área de
concentração Taxonomia de
Flebotomíneos.

Manaus, Amazonas

Julho, 2013

O48c

Oliveira, Arley Faria José de.

Caracterização morfológica e morfométrica de três espécies cripticas e dendrófilas de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barretto, 1962 (díptera, psychodidae, phlebotominae da Amazônia central / Arley Faria José de Oliveira. - 2013.

131 f. : il. color.

Dissertação (Mestre em Diversidade Biológica) — Universidade Federal do Amazonas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nair Otaviano Aguiar.

Co-orientador: Prof. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa.

1. *Lutzomyia* – Amazônia 2. Díptero – Amazônia 3. Entomologia I. Aguiar, Nair Otaviano (orientador) II. Pessoa, Felipe Arley Costa (orientador) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (2007): 595.77(811)(043.3)

DEDICO

Dedico este trabalho a minha amada esposa Rosilane, e aos meus filhos Ayra e Gabriel por ser e essência do que eu tenho de melhor.

A.F.J.O.

AGRADECIMENTOS

O Deus, Todo Poderoso, Criador dos Céus e da Terra, e de tudo o que nela há, pela sua infinita misericórdia, que me guardou, deu sabedoria e orientou por esta difícil jornada.

Aos meus pais Wenceslau e Aidacy (*in memoriam*) que me conduziram a um caminho excelente.

A minha esposa Rosilane, pelo seu carinho e amor incondicional, estando sempre ao meu lado, nos momentos alegres e tristes durante esses anos; a minha filha Ayra, por ter me surpreendido escolhendo a profissão de Bióloga, e amando tudo aquilo que Deus fez de melhor; ao meu filho Gabriel, que tem sido um espelho pela sua perseverança em busca do melhor, e pelas constantes premiações como aluno do 2ª Colégio Militar da Polícia Militar – Ceti Marcantônio Vilaça.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Nair Otaviano Aguiar e Dr. Felipe Arley Costa Pessoa por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, orientando, corrigindo, incentivando e cobrando para que tudo fosse feito da melhor maneira; sei quem existem muitas falhas, mas procurei fazer o melhor.

Ao Sr. Rui Alves de Freitas, reconhecidamente o melhor taxônomo de flebotomíneos, Pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, meu grande amigo, orientador e idealizador deste projeto. Muito obrigado “seu” Rui!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica – PPG-DivBio da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pelo conhecimento repassado ao longo do curso, em especial à Disciplina de Biologia da Conservação e ao Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM, pela minha primeira publicação. Isso não tem preço... Obrigado!

A Msc. Claudia María Ríos-Velásquez, pelo ensino, críticas e sugestões que muito me ajudou durante a elaboração do capítulo de Morfometria Geométrica. Os meus sinceros agradecimentos!

Ao técnico Francisco Lima Santos, pelo auxílio prestado em algumas coletas; aos técnicos Ricardo Mota e Diego Leite, por ter sido “meus braços” nas constantes viagens para realização das coletas, independente do tempo, distância ou lugar...valeu!

Aos bolsistas PIBIC do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/ FIOCRUZ, Eric Fabrício Marialva e Jeane Cristini de Oliveira Barbosa, pelo imenso auxílio dado durante o desenvolvimento deste projeto, principalmente no retorno das coletas e na manutenção das colônias.

As técnicas do Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ), Patrícia Melo e Geiza, por manter em ordem o material usado durante todo o experimento.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ) pelo total apoio fornecido, como carro, motoristas, técnicos, laboratório, sem os quais seria impossível o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas pelo ingresso no curso de Pós-Graduação e concessão de auxílio financeiro para participação em eventos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela participação no Programa PAPE.

Àqueles que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste estudo...

MUITO OBRIGADO!!!

*“Porque o Senhor dá a
sabedoria, e da sua boca vem à
inteligência e o entendimento”*

Salomão.

RESUMO

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do gênero *Lutzomyia* França, e subgênero *Psathyromyia* Barretto, possuem importância em saúde pública por serem vetores de vários agentes etiológicos dentre os quais se destacam os arbovírus como o vírus da estomatite vesicular e por serem suspeitas de transmitir diversos protozoários tripanossomatídeos (Kinetoplastidae, Tripanosomatidae). Foi comprovado que *L. (Psathyromyia) dendrophyla* Mangabeira-Filho, é uma espécie suscetível à infecção por *Leishmania amazonensis* Lainson e *L. shannoni* Dyar é incriminada como um vetor do vírus da estomatite vesicular. Para este estudo foram utilizadas de forma integrada ferramentas da Morfometria Geométrica, da Microscopia Eletrônica de Varredura e Óptica, além de observações sobre morfologia e quetotaxia dos imaturos de três espécies crípticas e dendrófilas do subgênero *Psathyromyia*. Para o ciclo de vida das espécies *L. scaffi* Damasceno & Arouck e *L. shannoni*, foi encontrado tempos semelhantes para o desenvolvimento da fase larval, da eclosão do ovo à emergência do adulto. Foi analisado o exocório dos ovos das espécies, mostrando diferenças no arranjo das ornamentações poligonais. Como também para os estudos de morfologia de larvas, as principais diferenças observadas em quetotaxia foram cerdas da cabeça, cerdas do protórax, do oitavo e nono segmentos abdominais, principalmente no tamanho das cerdas caudais como as mais marcantes, antenas e espiráculos. As pupas também apresentaram diferenças nas cerdas do cefalotórax; as análises do átrio genital mostraram diferenças no tamanho da furca e disposição dos espinhos. A ferramenta de morfometria geométrica utilizada em fêmeas de *L. scaffi*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, conseguiu separar estas espécies em grupos bem definidos pela conformação das asas. Este estudo forneceu importantes informações taxonômicas sobre três espécies crípticas do subgênero *Psathyromyia* e que possuem importância médica veterinária.

ABSTRACT

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the genus *Lutzomyia* França, and subgenus *Psathyromyia* Barretto, have importance in public health because they are vectors of several etiological agents, among we highlight the arboviruses as the vesicular stomatitis virus and several trypanosomatid flagellates (Kinetoplastidae, Tripanosomatidae) *L. (Psathyromyia) dendrophyla* Mangabeira-Filho is a susceptible species to infection *Leishmania amazonensis* Lainson and *L. shannoni* Dyar was incriminated as vector of the vesicular stomatitis virus. This study was divided in four chapters, where were used in wing geometric morphometrics, scanning electron microscopy, and also details about life cycle on laboratory conditions three cryptic and species of subgenus *Psathyromyia*. The life cycles of *L. scaffi* Damasceno & Arouck and *L. shannoni*, were found similar from the egg's emergence to the adult's emergency. The egg exochorion was analyzed of the species showed differences on the polygonal ornamentation arrangement. Studies in the larval morphological characters were done. It were observed differences between the larval chaetotaxy among the studied species and antennae and spiracles. Pupae also presented differences on cephalothorax setae; defined by the wings conformation and other phenotypic differentiation the genital atrium ornaments of the furca divided these species in different groups. The wing geometric morphometrics used in *L. scaffi*, *L. dendrophyla* and *L. shannoni* females. This study provided important taxonomic information on three cryptic species of *Psathyromyia* subgenus and have veterinary medical importance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microfotografia do tórax de fêmeas de A – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> , B – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> e C – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> , mostrando a pigmentação característica utilizada para separação	22
Figura 2	A – ovo de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> ; B – Larva <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> mudando de estágio, em detalhe o par de cerdas caudais; C e D – pupa de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> e fêmea emergindo da pupa	36
Figura 3	Microfotografia de estruturas anatômicas utilizadas na identificação de flebotomíneos: A – Genitália masculina de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> , mostrando o parâmetro e parte dos dutos ejaculatórios; B – espermateca da fêmea de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> ; C – ascóides característica do subgênero <i>Psathyromyia</i> , com o ramo posterior é longo e afiado; D – cibário de fêmea de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> , mostrando quatro dentes horizontais	37
Figura 4	Tubos de ovipostura para flebotomíneos, contendo em seu interior tiras umedecidas de papel filtro	40
Figura 5	A – Potes para criação de larvas de flebotomíneos, com divisões de compartimentos por estágio imaturo, para alocação das diversas fases do ciclo de vida, à medida que ocorresse mudança de instar	41
Figura 6	Coleta em base de árvore próxima a liteira com aspirador mecânico	57
Figura 7	Ovo de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> – formato do ovo alongado das três espécies	59
Figura 8	Aspecto geral da larva de quarto estágio de flebotomíneo. Figura mostrando as cerdas internas e externas	59
Figura 9	A – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> ; B – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> C e D – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> – microfotografia de cefalotórax de pupas, mostrando a similaridade na	

	forma das cerdas frontais inferiores (2A), clipeais (1), pré-clipeais externas (02) e pré-clipeais internas (01), sendo simples nas três espécies	61
Figura 10	A e B – característica do exocório de ovo eclodido de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> , com detalhe das formações retangulares destacados em vermelho	62
Figura 11	A – Microfotografia de cabeça de larva de quarto instar de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> – CL – clipeo; VD – Vista Dorsal : L.B.P. – labro basal posterior; 1C – frontoclipeal anterior; 3C – genal anterior; 4C – genal medial; 5C – genal posterior; VV – Vista Ventral : 2C – frontoclipeal posterior; 6C – pós-genal; 7C – subgenal (Arrivillaga <i>et. al.</i> , 1999); B – mandíbula e maxila – disposição das cerdas simples S1 , S2 e S3 , inseridas na mandíbula e processo maxilar (P.Mx.); C – pelos mandibulares (P.M.); D – cerdas simples da maxila: S1 , S2 e S3 ; E – mandíbula com as cerdas S1 , S2 , S5 e S6	64
Figura 12	Antena da larva de quarto instar de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> – t.a. – tubérculo antenal; s.c. – sensilas campaniformes; 1º e 2º segmentos antenais; s.a.a. – sensila apical da antena	65
Figura 13	Representação esquemática de A e B : tórax e abdômen de larva de quarto instar de <i>Lutzomyia (Psathyromyia)</i> (figura modificada de Pessoa <i>et. al.</i> , 2008). C e D – microfotografias de tórax. Cerdas “ 4 ” em amarelo; cerdas 3,7 e 8 (em vermelho) de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> apresentaram diferenças significativas das outras espécies. VD – vista dorsal; VV – vista ventral, PT – protórax, e.a. – espiráculo anterior, MS – mesotórax, MT – metatórax, cerdas de 1 – 15 : AB – segmentos abdominais de 1 a 7 , cerdas de 2 – 15 , AB8 – oitavo segmento abdominal, e.p. – espiráculo posterior, AB9 – nono segmento abdominal – ce – cerda caudal externa, ci – cerda caudal interna	66
Figura 14	A a C – espiráculos anteriores encontrados em <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> formados por oito a 10 papilas	67

Figura 15	A e B – cerdas da região ventral do protórax de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> – A – cerdas esfarpeladas ventral externa (5) e ventral interna (6); B – anterior ventrolateral (4), basal (10), pós-ventrolateral (11), média ventral (13) e ventral intermediária (14), esfarpeladas; pós-ventral (12), simples e ventral submediana (15), espiniforme	68
Figura 16	Espiráculo posterior de larva de quarto ínstar de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> composto por 16 papilas	71
Figura 17	Microfotografias dos oitavo e nono segmentos abdominais – A – oitavo segmento abdominal, com localização das cerdas anterior ventrolateral (4), submediana dorsal (7), média dorsal (8), dorsolateral (9), todas esfarpeladas, sensila campaniforme (s.c.) e espiráculo posterior (e.p.); destaque em vermelho para as manchas circulares dispostas neste segmento, mostrando a formação de depressões (B, C e D)	73
Figura 18	E – Microfotografia do oitavo segmento mostrando as cerdas esfarpeladas anteriores ventrolaterais (4), médias dorsais (8), dorsolaterais (9), pós-ventrolaterais (11), ventrais submedianas (15) e as cerdas simples basais (10) e pós-ventrais (12)	73
Figura 19	Microfotografia do nono segmento abdominal mostrando as cerdas anteriores ventrolaterais (4), dorsais submedianas (7), pós-ventrolaterais (11), pós-ventrais (12) e ventrais submedianas (15), caudal interna (c.i.) e caudal externa (c.e.) que são simples, que estão quebradas na foto e as cerdas médias dorsais (8) e dorsolaterais que são esfarpeladas	74
Figura 20	A a F – Microfotografias da quetotaxia pupal de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> – A – cerda vertical (3), encrespada longa; B – frontal superior (2B), encrespada longa; C – pós-ocular superior (4), encrespada longa; C – pós-ocular média (5), encrespada longa; D – pós-ocular interna (6A), bífida; D – pós-ocular inferior externa (6B), bífida longa; E – pré- alares (10), encrespadas grossas e F – lateral anterior (8), encrespada curta	76

Figura 21	A e B - Microfotografia de Microscopia eletrônica de varredura do exocório do ovo de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> modificada de Ward & Ready (1975). Em vermelho, detalhes das formas dos polígonos do ornamento	77
Figura 22	Microfotografia da cabeça de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> mostrando o longo tubérculo antenal (t.a.), os 1º e 2º segmentos antenais e as cerdas labro basais posteriores (L.B.P.)	78
Figura 23	Microfotografia da antena de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> ; A – longo tubérculo antenal; B – 1º e 2º segmentos antenais, sensilas campaniformes (s.c.) e C em destaque a sensila apical da antena (s.a.a.)	79
Figura 24	Microfotografia mostrando o espiráculo anterior de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> formado por sete lóbulos	79
Figura 25	A e B – Microfotografia do oitavo e nono segmentos abdominais; A – anterior ventrolateral (4), submediana dorsal (7), média dorsal (8), dorsolateral (9), cerdas esfarpeladas e os padrões de manchas circulares em destaque do oitavo segmento abdominal; o nono segmento apresenta as cerdas anteriores ventrolaterais (4), dorsais submedianas (7), pós-ventrolaterais (11), pós-ventrais (12) e ventrais submedianas (15), caudais internas (c.i.) e caudais externas (c.e.) que são simples, e as cerdas médias dorsais (8) e dorsolaterais que são esfarpeladas	80
Figura 26	Microfotografias da quetotaxia pupal de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> – A – cerda vertical (3), encrespada longa; B – frontal superior (2B), C – pós-ocular superior (4), C – pós-ocular média (5), D – pós-ocular interna (6A), D – pós-ocular inferior externa (6B), são todas espiniformes; E – pré- alares (10), encrespadas grossas e F – lateral anterior (8), bífida longa	81
Figura 27	Microfotografia característica do exocório de ovo eclodido de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> (A), com detalhe de formações trapezoidais destacados em vermelho (B)	82

Figura 28	Microfotografia da cabeça de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> mostrando o tubérculo antenal (t.a.), destacando em vermelho os segmentos antenais, onde 1º segmento é aproximadamente duas vezes maior que 2º, as cerdas labro basais posteriores (L.B.P.) e a cerda genal média (4), esfarpelada, a maior cerda das três espécies; Md. – mandíbula e Mx. - maxila cabeça	83
Figura 29	t.a. – Tubérculo antenal de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> , mostrando os dois segmentos antenais e a sensila apical da antena (s.a.a.) ..	84
Figura 30	Cerdas do protórax dorsal – A – dorsal interna (1), dorsal intermediária (2), a maior cerda apresentada para as três espécies, dorsal externa (3) e anterior ventrolateral (4), todas as cerdas esfarpeladas e cerda “ a ”, espiniforme; B – no protórax ventral as cerdas basais (10) e ventrais intermediárias (14), esfarpeladas, apresentaram o maior tamanho nas espécies; também visualizadas as cerdas pós-ventrolaterais (11), esfarpeladas, pós-ventrais (12), espiniformes, médias ventrais (13), esfarpeladas e ventral submediana (15), espiniforme; C – espiráculo anterior formado por oito lóbulos	85
Figura 32	Microfotografias da quetotaxia pupal de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> – A – cerda vertical (3), encrespada longa; B – frontal superior (2B), C – pós-ocular superior (4), C – pós-ocular média (5), D – pós-ocular interna (6A), D – pós-ocular inferior externa (6B), são todas espiniformes; E – pré- alares (10), encrespadas grossas e F – lateral anterior (8), espiniforme	87
Figura 33	Formato da espermateca de fêmeas de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> podendo se observar a haste da furca, parte do duto comum, os dutos individuais, o corpo e a cabeça da espermateca	98
Figura 34	Coleta em base de árvore próxima a liteira com aspirador mecânico	100

Figura 35	Asa direita de fêmea de flebotomíneo, ilustrando a posição dos pontos anatômicos de referência (PARs) – R₁ = conexão da veia Radial com a veia Costa; R₃ = extremidade distal da veia Radial ₃ ; B.P.S.R. (Bifurcação Proximal do Setor Radial) – conexão da veia Radial ₄ com a veia Radial ₂ ; Bifurcação da veia Média ₂ com a veia Média ₁ ; Extremidade distal da veia Média ₄ ; Extremidade distal da veia Média ₂ ; Extremidade distal da veia Radial ₅ ; Extremidade distal da veia Radial ₃	103
Figura 36	Principais deformações das configurações das asas das fêmeas de A – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> , B – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> e C – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i>	104
Figura 37	Variação do tamanho centróide das fêmeas de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> , <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> e <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> durante uma geração	105
Figura 38	Mapa fatorial baseado na análise dos componentes principais da variação da forma das asas de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> , <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> e <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> . Os pontos dentro dos polígonos representam os indivíduos de cada espécie	106
Figura 39	Formato da espermateca de fêmeas de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i>	118
Figura 40	A – Furca de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> . Linhas que indicam quais extremos de estruturas das furcas que foram medidas: CA - comprimento total do átrio, CF – comprimento da furca e LI - largura interna da furca; B – átrio genital de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> composto de 1 a 3 espinhos longos; C – átrio genital de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> formado de 3 a 6 espinhos curtos formando um pente em uma faixa horizontal na membrana; D – <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> – membrana composta de 3 a 6 espinhos curtos no meio da membrana e grandes espinhos nas bordas laterais	122

- Figura 41** Quarto estágio larval de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi*: A – espiráculo anterior formado por nove lóbulos; B – tagma cefálico; C – espiráculo posterior formado por 16 papilas; D – mento; E – mandíbula com pelos mandibulares; F – oitavo segmento abdominal, com disposição das manchas na área esclerotizada; G – cerdas pré-alares (10); H – antena: tubérculo antenal, segmentos antenais e sensilas 131
- Figura 42** Quarto estágio larval de *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla*: A – oitavo segmento abdominal mostrando a área esclerotizada e disposição das manchas; B – tagma cefálico; C – mandíbula; D – cerda pré-alar (10); E – mento; F – antena inserida em um grande tubérculo e sensilas campaniformes e apical; G – espiráculo anterior formado por sete lóbulos .. 132
- Figura 43** Estruturas de larvas de quarto ínstar de *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni*: A – mento; B – oitavo segmento abdominal mostrando a disposição das manchas e presença das cerdas submedianas dorsais (7); C – cerda pré-alares (10); D – espiráculo posterior formado por 14 lóbulos; E – espiráculo anterior com oito lóbulos; F – tagma cefálico; H – mandíbula com pelos mandibulares e parte da cerda S1 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ciclo de vida de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> e <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> obtidos em condições de laboratório: tempo médio de desenvolvimento em dias para cada fase	43
Tabela 2	Tabela correspondente ao número, tipo e tamanho das cerdas de cada segmento larval (N = 4 – tamanho em μm) das larvas de quarto ínstar de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> , <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> e <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i>	68 A 71
Tabela 3	Quetotaxia pupal de flebotomíneos - tabela correspondente à nomenclatura, número e tipo de cerdas encontradas em <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> , <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> e <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i>	75
Tabela 4	Morfometria dos átrios genitais (medida em μm) das fêmeas de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> , <i>Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla</i> e <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> , com variação na amplitude do tamanho do comprimento total do átrio (CA), do comprimento da furca (CF) e da largura interna do átrio (LI), em uma amostragem de nove fêmeas medidas de cada uma das três espécies de flebotomíneo estudada da Amazônia Central, Amazonas, Brasil	123
Tabela 5	Número e arranjos dos espinhos da armadura do átrio genital de fêmeas de três espécies crípticas de flebotomíneos	124
Tabela 6	Análises Estatísticas dos Átrios das fêmeas de flebotomíneos, com aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis (H:8.654, p <0.01) realizado no programa PAST	124

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
3. OBJETIVOS	32
OBJETIVO GERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. CAPÍTULOS	33
CAPÍTULO I - “Aspectos do Ciclo de Vida de duas espécies de <i>Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni</i> (Dyar, 1929) e <i>Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi</i> (Damasceno & Arouck, 1956) Amazônicas, criadas em laboratório”	33
CAPÍTULO II - “Descrição da fase imatura de três espécies de <i>Lutzomyia (Psathyromyia)</i> Barretto, 1962 (Diptera, Psychodidae) da Amazônia Central Brasileira”	52
CAPÍTULO III - “Morfometria geométrica de asas de três espécies crípticas de <i>Lutzomyia (Psathyromyia)</i> (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) da Amazônia Central”	94
CAPÍTULO IV - “O átrio genital de fêmeas de três espécies de <i>Lutzomyia</i> França, 1924 crípticas, de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do subgênero <i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962 da Amazônia Central”	112
5. CONCLUSÃO GERAL	129
APÊNDICE 1	130

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos com grande diversidade de espécies e devido ao hábito hematofágico das fêmeas, várias espécies são incriminadas como vetores de vários agentes etiológicos de importância médico-veterinária entre esses agentes estão o vírus da estomatite vesicular, da bactéria *Bartonella baciliformis* causadora da bartonelose e tripanossomatídeos como, por exemplo, as leishmanias (SVS 2007). Devido a sua importância sanitária, a subfamília Phlebotominae tem sido relativamente bem estudada (Young & Duncan 1994; Galati 2003).

No mundo, 62 espécies de flebótomos são incriminadas ou suspeitas de transmitir 16 espécies de *Leishmania* Ross. Na Europa, África e Ásia, são incriminadas 27 espécies do gênero *Phlebotomus*, e nas Américas, 35 espécies do gênero *Lutzomyia* (Ready 2010, 2013). Na América do Sul, das mais de 400 espécies pertencentes ao gênero *Lutzomyia* França, 1924, importante transmissor de agentes patogênicos em vertebrados, é suspeito de conter várias espécies crípticas (Young e Duncan 1994; Dujardin *et. al.*, 2005; Pinto *et. al.*, 2010). Este gênero é composto por 15 subgêneros e 11 grupos, dentre eles o subgênero *Psathyromyia* Barretto, 1962, é composto por espécies com diferenças morfológicas bastante sutis, o que levou Young e Duncan (1994) a colocarem *L. (P.) pifanoi* Ortiz, 1972 em sinonímia com *L.(P.) shannoni* (Dyar, 1929). Outras duas espécies, *L. (P.) abonnenci* (Floch & Chassignet, 1947) e *L. (P.) pestanai* (Barretto & Coutinho, 1941), são dificilmente, diferenciadas morfológicamente.

Deste grupo oito espécies ocorrem na Amazônia: *L. (P.) abonnenci* (Flock & Chassignet, 1947), *L. (P.) campbelli* (Damasceno, Causey & Arouck, 1945), *L. (P.) cuzquena* (Martins, Llanos & Silva, 1975), *L. (P.) dendrophyla* (Mangabeira-Filho, 1942), *L. (P.) punctigeniculata* (Flock & Abonnenc, 1944), *L. (P.) scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956), *L. (P.) shannoni* (Dyar) e *L.(P.) souzacaastroi* (Damasceno & Causey, 1944). Dessas espécies, diversas são dendrofilicas e relativamente fáceis de serem capturadas em coletas na base de grandes árvores, tais como *L. (P.) dendrophyla*, *L. (P.) shannoni*, e *L.(P.) scaffi*; outras como *L. (P.) abonnenci* e *L. (P.) punctigeniculata* são coletadas muito dificilmente, devido à baixa densidade dessas espécies na região (Guerra *et. al.*, 2006; Silva *et. al.*, 2007).

As fêmeas do subgênero *Psathyromyia*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, possuem importância médico-veterinária por serem suspeitas de transmitir diversos protozoários tripanossomatídeos (Kinetoplastidae, Triponosomatidae) onde *L. dendrophyla*, em laboratório, é uma espécie suscetível a hospedar *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 (Ryan *et. al.*, 1986), e nos Estados Unidos, *L. shannoni* é incriminada como um importante vetor do vírus da estomatite vesicular (VSV) (Comer *et. al.*, 1990, 1991, 1994; Corn *et. al.*, 1990)

O uso da pigmentação torácica para separar fêmeas de *L. (P.) scaffi*, *L.(P.) dendrophyla* e *L. (P.) shannoni*, foi primeiramente usado por Morales *et. al.*, (1982) para diferenciar flebotomos da Colômbia, quando da descrição da fêmea de *L. (P.) scaffi*. Christensen (1972) alega que mesmo usando estas características as fêmeas ainda eram inseparáveis (Figura 1).



Fig.1 – Microfotografia do tórax de fêmeas de **A** – *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi*, **B** – *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla* e **C** – *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni*, mostrando a pigmentação característica utilizada para separação.

As espécies deste subgênero são bem parecidas taxonomicamente com as do Grupo *Aragaoi*, por isso Barretto (1962), as incluem no subgênero *Psathyromyia*.

Morales *et. al.*, (1982), Christensen (1972) e Barretto (1962) relatam que os machos são facilmente diferenciados pela forma da genitália. Porém, as fêmeas são muito parecidas, sendo identificadas com certa dificuldade, através de caracteres cromáticos existentes nas pleuras do tórax e abdome, e somente por especialistas. As espermatecas dessas três espécies

são bastante semelhantes, no que diz respeito principalmente à observação do ducto individual, ducto comum e o corpo, que tem um formato de cápsulas cilíndricas. A falta de caracteres evidentes e diferentes para separação dessas três espécies dificulta os estudos sobre biodiversidade. A solução desta problemática poderá ajudar a direcionar estratégias de controle, uma vez que a resolução taxonômica é crucial para esse tipo de estudo.

A colonização de flebotomíneos é um fator importante. No momento está limitada em pesquisar sobre o potencial vetor, seu ciclo de vida e a transmissão de patógenos. Colônias são indispensáveis em genética evolutiva, fisiologia, estrutura de populações, estudos comportamentais e principalmente para diferenciar membros de complexos de espécies crípticas (Lanzaro *et. al.*, 1993; Luitgards-Moura *et. al.*, 2000; Cárdenas *et. al.*, 2001; Justiniano *et. al.*, 2004; Lantova *et. al.*, 2010; Vigoder *et. al.*, 2010; Nieves *et. al.*, 2011).

Das mais de 927 espécies ou subespécies de flebotomíneos atuais e 22 fósseis que foram descritas (Shimabukuro & Galati 2011), cerca de 150 foram colonizadas com sucesso (Hanson 1968; Endris 1982; Lane & El Sawaf 1986; Rangel & Lainson 2003; Munstermann 2005). O grau de sucesso varia com a espécie, enquanto algumas espécies são criadas facilmente, outras, que desenvolvem rapidamente para adultos a partir de ovos depositados pelas fêmeas capturadas, muitas vezes se alimentam com dificuldades em laboratório, incluindo o seu hospedeiro natural (Hertig & McConnel 1963). Os estágios imaturos de ovo, larva e pupa são descritos inteiramente por observações num ambiente de laboratório. Algumas espécies, incluindo *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) e *L. longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), se adaptaram rapidamente a condições de laboratório, mas os outros não têm, quando criados em condições semelhantes.

A diferenciação de espécies através de caracteres morfológicos tem sido amplamente usada, mas nem sempre são suficientes, especialmente em se tratando de espécies crípticas (Arrivillaga & Feliciangeli 2001). Atualmente existem novas técnicas como a morfometria geométrica, que permitem a diferenciação entre grupos de indivíduos. A morfometria geométrica permite analisar a forma das estruturas (Bookstein 1991).

A morfometria geométrica tem sido bastante utilizada em entomologia como, por exemplo, na diferenciação dos membros do complexo de espécies de *Simulium damnosum* Theobald (Diptera), Krüger & Garms (1999) e para diferenciação de populações silvestres e domésticas de *Panstrongylus geniculatus* (Jaramillo *et. al.*, 2002).

A utilização da armadura no átrio genital de flebotomíneos como importante ferramenta taxonômica foi examinada primeiramente por Madulo-Leblond *et. al.*, (1991) quando notou que o comprimento dos espinhos da armadura no átrio genital de fêmeas de *Phlebotomus papatasi* e *P. dubosqi* Neveu-Lemaire, 1906 era diferente. Pesson *et. al.*, (1994) em seus estudos verificou que estas duas espécies podiam ser separadas por este caráter taxonômico.

O átrio genital de flebotomíneos foi identificado como uma ferramenta taxonômica útil em espécies africanas e asiáticas do gênero *Phlebotomus* Rondani, 1840, tendo sido aplicada com sucesso nos subgêneros *Larroussious* Nitzulescu, 1931 e *Phlebotomus* Rondani & Brete, 1940 (Killick-Kendrick *et. al.*, 1994; Pesson *et. al.*, 1994) como um caráter distintivo. Killick-Kendrick *et. al.*, (1997) sugeriram que a armadura genital seria mais útil na identificação do que a armadura faringiana, sendo posteriormente usada para separar fêmeas de *Paraphlebotomus spp.*, quando da descrição de uma nova espécie – *Phlebotomus (Paraphlebotomus) mireillae*, utilizando a armadura do átrio genital para diferenciar essa espécie da fêmea de *P. saevus* Parrot & Martin, 1939.

Na América do Sul, Valenta *et. al.*, (1999) demonstraram que o átrio genital também funcionou para o gênero *Lutzomyia*, como um bom caráter taxonômico, na diferenciação de espécies crípticas do grupo *Verrucarum* Fairchild, 1955 e também ao examinarem a armadura do átrio genital de outras espécies de flebotomíneos da Venezuela.

Tal como acontece em muitos grupos de insetos, os caracteres morfológicos usados para distinguir espécies de flebotomíneos são os dos adultos, sendo os estágios larvais da maioria das espécies desconhecidos ou não descritos e menos de 70 espécies das mais de 400 existentes no Novo Mundo, foram descritos, nem sempre adequadamente (Young e Duncan 1994). O exocório apresenta camadas distintas geralmente formando esculturas elaboradas na superfície do ovo (Hinton 1969) e tem sido usado para analisar a superfície do ovo de diferentes espécies de flebotomíneos neotropicais (Ward & Ready 1975; Zimmerman *et. al.*, 1977; Endris *et. al.*, 1987; Feliciangeli *et. al.*, 1993; Queiróz 1995; Perez & Ogusuku 1997; Fausto *et. al.*, 2001; Almeida *et. al.*, 2004; Bahia *et. al.*, 2007; Pessoa *et. al.*, 2008; Costa *et. al.*, 2012).

O uso da microscopia eletrônica de varredura melhorou as descrições de estruturas coriônicas dos ovos que podem funcionar para distinguir espécies de dípteros.

Caracteres morfológicos larvais têm sido utilizados para abordagens filogenéticas em estudos de insetos de importância médica, especialmente os da família Culicidae (Judd 1996; Harbach & Kitching 1998), da família Simuliidae (Coscarón 1987; Amaral-Galvão & Maia-Herzog 2003) e flebotomíneos (Pessoa *et. al.*, 2008).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, D.N.; Oliveira, R.S.; Brazil, B.G. & Soares, M.J. 2004. Patterns of exochorion ornaments on eggs of seven South American species of *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 41: 819–825.
- Amaral-Galvão, A.M.R. & Maia-Herzog, M. 2003. Coleção de simulídeos (Diptera - Simuliidae) de Adolpho Lutz, sua história e importância. *História, Ciências, Saúde* 10(1): 259-71.
- Arrivillaga, J.C. & Feliciangeli, M.D. 2001. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: The First New Species Within the *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *Journal of Medical Entomology* 38 (6).
- Bahia, A.C.; Secundino, N.F.; Miranda, J.C.; Prates, D.B.; Souza, A.P.; Fernandes, F.F.; Barral, A. & Pimenta, P.F. 2007. Ultrastructural comparison of external morphology of immature stages of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy. *Journal of Medical Entomology* 44(6): 903–14.
- Barretto, M.P. 1962. Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, subfamília Phlebotominae). *Revista Instituto Medicina Tropical*. São Paulo 4: 91-100.
- Bookstein, F.L. 1989. “Size and Shape”: a comments on semantics. *Systematic Zoology* 38: 173-180.
- Cárdenas, E.; Munstermann, L.E.; Martínez, O.; Corredor, D.; Ferro, C. 2001. Genetic Variability among populations of *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni* (Dyar, 1929) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 96(2): 189-196.
- Christensen, H.A. 1972. Check list of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Panama including two species not previously reported. *Mosquito News* 32: 88-89.

- Comer, J.A.; Kavanaugh, D.M.; Stallknecht, D.E.; Corn, J.L. 1994. Population dynamics of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to the epizootiology of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island Georgia. *Journal Medicine Entomological* 31: 850-854.
- Comer, J.A.; Stallknecht, D.E.; Corn, J.L.; Nettles, V.F. 1991. *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae): a biological vector of the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia. *Parasitologia* 33(1): 151-158.
- Comer, J.A.; Tesh, R.B.; Modi, G.B.; Corn, J.L. & Nettles, V.F. 1990. Vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype: replication in and transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 483-490.
- Corn, J.L.; Comer, J.A.; Erickson, G.A. & Nettle, V.F. 1990. Isolation of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype from phlebotomine sand flies in Georgia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 476-482.
- Coscarón, S. 1987. *El género Simulium Latreille en la región Neotropical: análisis de los grupos supraespecíficos, especies que los integran y distribución geográfica (Simuliidae, Diptera)*. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 112 p.
- Costa, W.A.; Costa, S.M.; Santos-Mallet, J.R.; Serrão, J.E.; Rangel, E.F. 2012. Eggshell as a characteristic to identify *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: hlebotominae), vectors of cutaneous leishmaniasis. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 3(1): 19-24.
- Damasceno, R.G. & Arouck, R. 1956 a. Estudos sobre *Flebotomus* no Vale Amazônico. Parte VIII. Descrição de *F.pinottii*, *F.scaffi* e *F.nevesi* (Diptera, Psychodidae). *SPVEA Sector de Coordenação e Divulgação*, Belem (Para) (Brazil) 15pp.
- Dujardin, J.; Le Pont, F.; Matias, A. & De La Riva, J. 2005. Morphometric evidence of speciation within Bolivan *Lutzomyia aragaoi* (Diptera: Psychodidae). *Infection, Genetics and Evolution* 5:362-365.

- Dyar, H.G. 1929. The present knowledge of the American species of *Phlebotomus* Rondani (Diptera, Psychodidae). *American Journal of Hygiene* 10: 112-124.
- Endris, R.G.; Young, D.G. & Perkins, P.V. 1987. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of live *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 24: 412-415.
- Fausto, A.M.; Feliciangeli, M.D.; Maroli, M.; Mazzini, M. 2001. Ootaxonomic investigation of five *Lutzomyia* species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 197-204.
- Feliciangeli, M.D.; Castejon, O.C. & Limongi, J. 1993. Egg surface ultrastructure of eight New World phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 30: 651-656.
- França, C. 1924. Notes parasitologiques. *Jornal de Sciencias Mathematicas, Physicas & Naturaes*, Lisboa (3): 17. Separata 12p.
- Galati, E.A.B. 2003. Classificação de Phlebotominae. In E.F. Rangel, R. Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-51.
- Guerra, J.A.O.; Ribeiro, J.A.S.; Coelho, L.I.A.R.C.; Barbosa, M.G.V.; Paes, M.G. 2006. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública Rio de Janeiro* 22(11): 2319-2327.
- Hanson, W.J. 1968. *The immature stages of the subfamily Phlebotominae in Panama (Diptera: Psychodidae)*. Doctoral Thesis, Faculty of the Graduate School of the University of Kansas, 104 pp.
- Harbach, R.E. & Kitching, I.J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology* 23: 327-370.
- Hertig, M. & McConnell, E. 1963. Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 14: 92-106.

- Hinton, H.E. 1969. Respiratory systems of insect eggs shell. *Annual Review of Entomology* 14: 343–368.
- Jaramillo, N.O.; Castillo, D.; Wolf, M.E. 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 667-673.
- Judd, D.D. 1996. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology* 21: 129–150.
- Justiniano, S.C.B.; Chagas, A.C.; Pessoa, F.A.C. & Queiroz, R.G. 2004. Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of Central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Brazil Journal Biology* 64(2): 227-235.
- Killick-Kendrick, R.; Tang, Y.; Johnson, R.N.; Ngumbi, P.M. & Robert, L.L. 1997. Phlebotomine sandflies of Kenya (Diptera: Psychodidae). V. *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *mireillae* n.sp. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91: 417-428.
- Killick-Kendrick, R.; Tang, Y.; & Killick-Kendrick, M. 1994. Phlebotominae sandflies of Kenya (Diptera: Psychodidae). IV. The armature in the genital atrium of female *Larrossius* as a means of identification. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88: 433-437.
- Krüger, A. & Garms, R. 1999. Morphometric characterization of members of the *Simulium damnosum* Theobald complex (Diptera: Simuliidae) from East and West Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 93(7): 753-761.
- Lane, R.P. & El Sawaf, B. 1986. The immature stages of *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 23(3): 263-268.
- Lantova, L.; Ghosh, K.; Svobodova, M.; Braig, H.R.; Rowton, E.; Weina, P.; Volf, P.; Votýpka, J. 2010. The life cycle and host specificity of *Psychodiella sergenti* n. sp. and *Ps. tobbi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) in sand flies *Phlebotomus sergenti* and *Ph. tobbi* (Diptera: Psychodidae). *Archives Biological Sciences, Belgrade* 62(1): 153-157.

- Lanzaro, G.C.; Ostovka, K.; Herrero, M.V.; Lawyer, P.G.; Warburg, A. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48: 839-847.
- Luitgard-Moura, J.F.; Castellón Bermudez, E.G.; Rosa-Freitas, M.G. 2000. Aspects related to productivity for four generations of a *Lutzomyia longipalpis* laboratory colony. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95(2): 251-7.
- Madulo-Leblond, G.; Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, M. & Pesson, M. 1991. Comparison entre *Phlebotomus duboscqi* (Neveu-Lemaire, 1906) et *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786): etudes morphologique et isoenzymatique. *Parasitologia* 33: 387-391.
- Mangabeira-Filho, O. 1942 a. 7ª Contribuição ao estudo dos Flebotomus. Descrição dos machos de 24 novas espécies (Diptera, Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 37(2): 111-218.
- Morales, A.; Rodrigues, M.C. & Ibagos, A.L. 1982. Description de la hembra de *Lutzomyia scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956) (Diptera, Psychodidae). *Biomédica*, Bogotá 2: 17-21.
- Munstermann, L.E. 2005. Care, Maintenance, and Experimental Infection of Phlebotomine Sand Flies. *Biology of Disease Vectors*. 2nd edn (ed. By WC Marquardt), pp 757-762.
- Nieves, E.; Oliveros, J.L. & Rondon, M. 2011. Impacto de *Leishmania amazonenses* e Sangue de Ave no potencial Biológico e fertilidade de *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). *EntomoBrasilis* 4(4): 20-25.
- Pérez, E.J. & Ogusuku, E. 1997. Chorion patterns on eggs of *Lutzomyia* sand flies from the Peruvian Andes. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 127-133.
- Pessoa, F.A.C.; Feitosa M.A.C.; Castellon-Bermudez, E. G.; Ríos-Velasquez, C.M. & Ward, R.G. 2008. Immature stages of two species of *Evandromyia* (*Aldamyia*) and the systematic importance of larval mouthparts within Psychodidae (Diptera, Phlebotominae, Psychodinae). *Zootaxa* 1740: 1-14.

- Pesson, B.; Madulo-Leblond, G.; Killick-Kendrick, R.; Tang, Y. & Killick-Kendrick, M. 1994. The armature in the genital atrium as a new taxonomic character distinguishing females of *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88: 539-542.
- Pinto, I.S.; Andrade Filho, J.D.; Santos, C.B.; Falqueto, A. & Leite, Y.R.L. 2010. Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia* subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 47: 16-21.
- Queiróz, R.G. 1995. *Phlebotomine sand flies of a leishmaniasis focus in Baturité, Brazil*. PhD thesis, London University, 224 pp.
- Rangel, E.F. & Lainson, R. 2003. Ecologia das leishmanioses, p.291-309. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 3680.
- Ready, P. 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology* 58: 227-250.
- Ready, P. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance* 15(10): 19505.
- Ryan, L.; Lainson, R. & Shaw, J.J. 1986. The experimental transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson & Shaw, between hamsters by bite of *Lutzomyia furcata* (Mangabeira). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 164-165.
- Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS – Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2ª Ed., Brasília 2007.
- Silva, D.F.; Freitas, R.A.; Franco, A.M.R. 2007. Diversidade e Abundância de Flebotomíneos do Gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em Áreas de Mata do Nordeste de Manacapuru, AM. *Neotropical Entomology* 36(1): 138-144.
- Shimabukuro, P.H.F. & Galati, E.A.B. 2011. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropical* 11(1a).

- Valenta, D.T.; Añez, N.; Tang, Y. & Killick-Kendrick, R. 1999. The genital atrium as a good taxonomic character to distinguish between species of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 93: 389-399.
- Vigoder, F.M.; Souza, N.A.; Peixoto, A.A. 2010. Copulatory courtship song in *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 105(8): 1065-1067.
- Ward, R.D. e Ready, P. 1975. Chorionic sculpturing of some sandfly eggs (Diptera: Psychodidae). *Journal Entomology* 50: 127-134.
- Young, D.G. & Duncan, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54:1-881.
- Zimmerman, J.H.; Newson, H.D.; Hooper, G.R.; Christensen, H.A. 1977. A comparison of the egg surface structure of six antropophilic phlebotomine sand flies (*Lutzomyia*) with the scanning electron microscope (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 13: 574-579.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Diferenciar taxonomicamente as fêmeas de três espécies dendrófilas e crípticas de *Lutzomyia (Psathyromyia)* Barretto, 1962: *Lutzomyia Psathyromyia scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956), *L. (P.) dendrophyla* (Mangabeira-Filho, 1942) e *L. (P.) shannoni* (Dyar, 1929) conhecidas da Amazônia Central.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo de morfometria geométrica das asas de fêmeas criadas em laboratório das três espécies dendrófilas de *Lutzomyia (Psathyromyia)*;
- Identificar caracteres morfológicos das fêmeas de três espécies dendrófilas de *Lutzomyia (Psathyromyia)*, visando à separação dessas espécies crípticas com maior segurança, inclusive o átrio genital;
- Descrever as formas imaturas de três espécies dendrófilas, de *Lutzomyia (Psathyromyia)* utilizando a morfologia tradicional;
- Caracterizar aspectos da biologia, em laboratório, dessas três espécies.

4. CAPÍTULOS

CAPÍTULO I

“Aspectos do Ciclo de Vida de duas espécies Amazônicas criadas em laboratório: *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni* (Dyar, 1929) e *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956)”

RESUMO: A colonização de flebotomíneos em laboratório é importante para o avanço na pesquisa sobre a biologia do inseto, fisiologia, comportamento, competência vetorial, estudos taxonômicos, dentre outras linhas. Os flebotomos do gênero *Lutzomyia* subgênero *Psathyromyia* tem importância médica, porque são vetores de arbovírus e alguns protozoários tripanossomatídeos, tal como *Leishmania*. Algumas fêmeas de *Psathyromyia* são identificadas com dificuldade, porque são morfologicamente semelhantes como, por exemplo, as espécies *L. (P.) shannoni* e *L. (P.) scaffi*. Este estudo teve como objetivo descrever os aspectos básicos do ciclo de vida dessas espécies em laboratório. Os flebotomíneos foram capturados em áreas de floresta de terra firme próximas a Manaus e as fêmeas grávidas ou ingurgitadas foram separadas e colocadas em tubos de oviposição individuais. Os ovos foram colocados em potes individuais, com uma camada fina de gesso e mantidos em estufas de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.) a 26,5 ° C e 90% de umidade, e adição de ração de peixe pós-larvas, extrusada e moída, com 55% de proteína bruta. Cada pote foi inspecionado diariamente para verificar a eclosão dos ovos, número de larvas, e acompanhamento das alterações dos estádios larvais. A identificação das espécies foi feita após a emergência de adultos do sexo masculino, no final do ciclo. O tempo médio (em dias) para todo o ciclo de vida, desde a oviposição à emergência do adulto, de *L. (P.) shannoni* e *L. (P.) scaffi*, respectivamente, foram 41 (N = 24) e 40,2 (N = 72); ovos 10,5 (DP=1,5) (N = 99) e 8,6 (DP=2) (N = 173); 1º ínstar 4,5 (DP=3,5) (N = 41) e 7,6 (DP=2,5) (N = 116), segundo ínstar 6 (DP=3,5) (N = 37) e 4 (DP=4) (N = 98); 3º ínstar 5 (DP=5) (N = 35) e 5 (DP=4) (N = 94); 4º ínstar 8 (DP=3) (N = 33) e 7,6 (DP=4,5) (N = 86); pupa 7 (DP=3) (N = 27) e 7,4 (DP=6) (N = 80). As fêmeas criadas, com dois dias após a emergência, se alimentavam avidamente em hamster. Estas observações preliminares têm mostrado que *L. (P.) shannoni* e *L. (P.) scaffi* da bacia amazônica podem ser criadas em laboratório.

Palavras-chave: colônia; espécies crípticas; Amazônia.

“Life cycle aspects of two lab reared *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni* (Dyar, 1929) and *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956) Amazonian species”

ABSTRACT: Laboratory colonization of sand flies is invaluable for the progress in research on insect biology, physiology, behavior, vector competence, taxonomic studies etc. Sand flies of the genus *Lutzomyia* subgenus *Psathyromyia* have public health importance because they are suspected vectors of arboviruses and some trypanosomatid protozoans such *Leishmania*. Some females of *Psathyromyia* species are identified with difficulty because they are morphologically similar species e.g. *L. (P.) shannoni* and *L. (P.) scaffi*. Due to the necessity to obtain enough material to taxonomic studies and information of basic biology about those species, we reared in laboratory conditions *L. (P.) shannoni* and *L. (P.) scaffi* during the three first generations. This study aimed to describe the basic aspects of the life cycle of these species in the laboratory. Sand flies were caught in the field and the in pregnant or engorged females were separated and placed in individual oviposition tubes. Isofemale broods are placed to individual pots, with a thin layer of plaster and kept Biochemical of Oxygen Demand (B.O.D.) incubator at 26.5°C and 90% of humidity, adding fish post larvae extruded feed and ground, with 55% crude protein. Each pot was inspected daily to check the eggs hatch, larvae number, and monitoring of larval instars changes. The species identification was made after the emergence of adult males at the end of the cycle. The average time span (in days) to all life cycle, since the oviposition to adult emergence, to *L. shannoni* and *L. scaffi*, respectively were 41 (N= 24) and 40,2 (N= 72). Eggs 10,5 (N= 99) (SD=1,5) and 8,6 (N=173) (SD=2) 1st instar 4,5 (N=41) (SD=3,5) and 7,6 (N=116) (SD=2,5), 2nd instar 6 (N=37) (SD=3,5) and 4 (N=98) (SD=4), 3rd 5 (N=35) (SD=5) and 5 (N=94) (SD=4), 4th 8 (N=33) (SD=3) and 7,6 (N=86) (SD=4,5), pupa 7 (N=27) (SD=3) and 7,4 (N=80) (SD=6). The reared females fed avidly on hamster as early as 2 days after emergence. These preliminary observations have shown that *L. shannoni* and *L. scaffi* from Amazon basin can be reared in laboratory.

Keywords: colony; cryptic species; Amazonia.

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos holometábolos, com quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (quatro instares larvais bem definidos), pupa e adulto (Forattini 1973) (Figuras 2A a D).

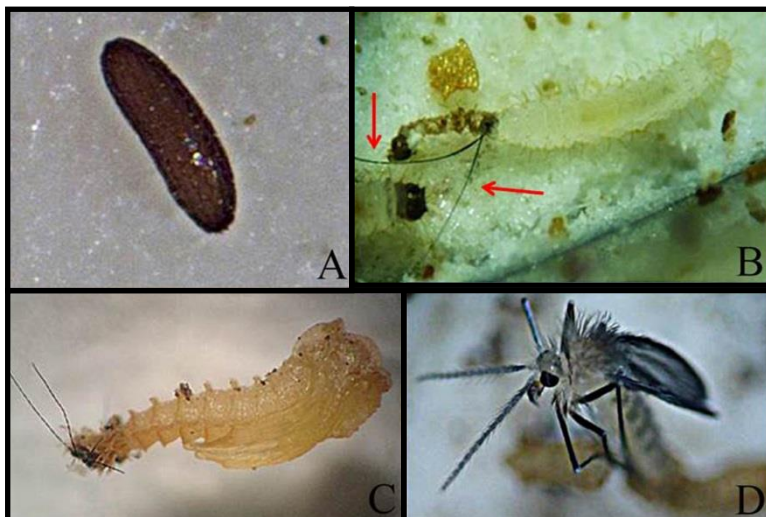


Fig. 2 **A** – ovo de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi*; **B** – Larva *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* mudando de estágio, em detalhe, o par de cerdas caudais; **C** e **D** – pupa de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* e fêmea emergindo da pupa.

As fêmeas após hematofagia e cópula, colocam seus ovos em substrato úmido, rico de matéria orgânica, individualmente ou em pequenos agrupamentos, que ficam aderidos ao substrato por meio de uma substância viscosa liberada no momento da postura pelas glândulas acessórias (Adler & Theodor 1935, 1957; Chaniotis & Anderson 1967, 1968; Passos *et. al.*, 2003). As larvas são pequenas, brancas, de aspecto vermiforme, possuindo um par de cerdas caudais, apenas no 1º instar e dois pares de cerdas nos demais, com exceção do gênero *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 que são dotadas de apenas um par de cerdas em todos os estádios larvais e *Phlebotomus tobbi* Adler, Theodor & Lourie, 1930. Logo após a eclosão, as larvas se alimentam de matéria orgânica disponível, inclusive dos corpos de adultos mortos (Forattini 1973; Ferro *et. al.*, 1997).

Caracteres de ovos e larvas tem desempenhado um papel pequeno em sistemática de flebotomíneos. Em contraste, os adultos apresentam estruturas anatômicas em maior número para a identificação: notadamente a genitália dos machos e nas fêmeas, a morfologia da

espermateca, dos ascóides das antenas, forma e o número de dentes do cibário frequentemente diferenciam espécies (Figuras 3 A a D).

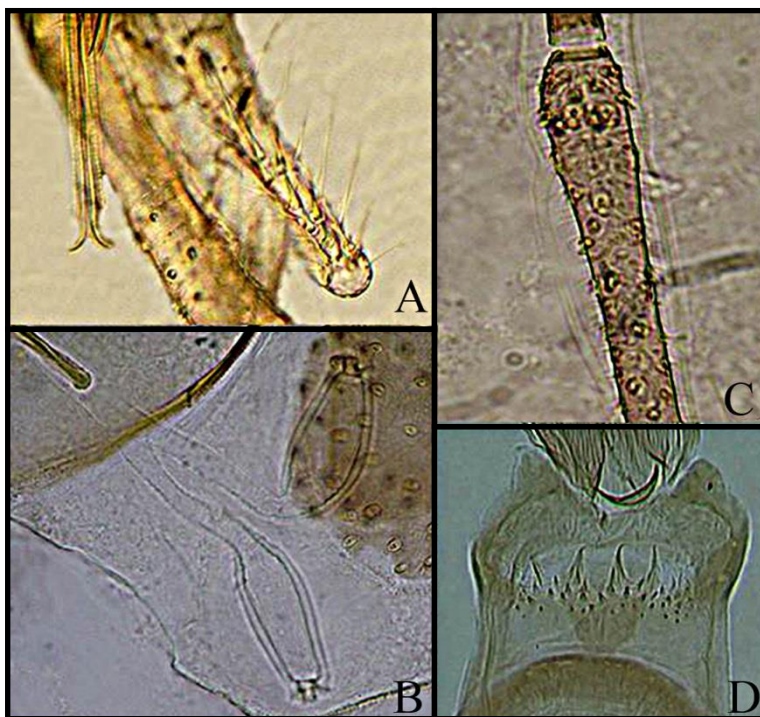


Fig. 3 – Microfotografia de estruturas anatômicas utilizadas na identificação de flebotomíneos: A – genitália masculina de *Lutzomyia shannoni*, mostrando o parâmetro e parte dos dutos ejaculatórios; B – espermateca da fêmea de *Lutzomyia dendrophyla*; C – ascóides característica do subgênero *Psathyromyia*, com o ramo posterior longo e afiado; D – cibário de fêmea de *Lutzomyia shannoni*, mostrando quatro dentes horizontais.

Caracteres morfológicos de imaturos para muitos grupos de insetos de importância médica tem sido de fundamental importância para caracterização, posição taxonômica e evolução (e.g. Harbach & Kitching 1998; Py-Daniel 1990; Pessoa *et. al.*, 2008a; Pessoa *et. al.*, 2008b).

A colonização de flebotomíneos é um fator importante e no momento limitado a pesquisa sobre o potencial vetor, ciclo de vida e transmissão de patógenos. Colônias são indispensáveis em genética evolutiva, fisiologia, estrutura de populações, estudos comportamentais e principalmente para diferenciar membros de complexos de espécies crípticas (Lanzaro *et. al.*, 1993; Luitgards-Moura *et. al.*, 2000; Cárdenas *et. al.*, 2001; Justiniano *et. al.*, 2004; Lantova *et. al.*, 2010; Vigoder *et. al.*, 2010; Nieves *et. al.*, 2011). Vários autores têm enfatizado a dificuldade de estabelecer colônias de flebotomíneos (Killick-

Kendrick 1978; Killick-Kendrick & Killick-Kendrick 1991; Munstermann 2005; Volf & Volfova 2011; Alarcón-Elbal 2011).

No Brasil, Bayma (1923, 1936) foi o pioneiro na criação de flebótomos e descreveu o ciclo completo de *L. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) o que também foi realizado por Castro (1937,1939); Chagas (1940) criou *L. intermedia* até a 3ª geração; Barretto (1940, 1942) estudou o ciclo biológico, descreveu a técnica de criação discutindo a influência de fatores ambientais e o ciclo evolutivo das principais espécies vetores de flebótomos do Estado de São Paulo; Sherlock & Guitton (1969), descreveram as fases imaturas de *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) oriundas de fêmeas coletadas em Jacobina, Bahia; colônias de *L. intermedia* foram estabelecidas por Rangel *et. al.* (1985) para serem utilizadas em infecções experimentais e xenodiagnósticos de infecções naturais por leishmânias dermatrópicas no Rio de Janeiro; no Rio Grande do Norte, Ximenes *et. al.*, (2001) observou o ciclo de vida de *L. evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936); após a incriminação de *L. cruzii* (Mangabeira, 1938) como vetor de leishmaniose visceral em Corumbá (Santos *et. al.*, 2003), estudos de colônia em laboratório foram necessários para conhecer a biologia e corroborar com a incriminação da espécie (Justiniano *et. al.*, 2001; Brazil *et. al.*, 2002; Chagas *et. al.*, 2002).

Quanto à criação e manutenção de colônias de flebotomíneos em laboratório, há necessidade de uma atenção especial. Iniciar colônias é muito mais difícil do que manter as já estabelecidas (Killick-Kendrick 1978; Young *et. al.*, 1981). Das mais de 900 espécies descritas, cerca de 150 foram colonizadas com sucesso (Hanson 1968; Endris 1982; Lane & El Sawaf 1986; Rangel & Lainson 2003; Munstermann 2005).

O grau de sucesso varia com a espécie; algumas espécies são criadas facilmente, outras, se desenvolvem de forma rápida para adultos a partir de ovos depositados pelas fêmeas capturadas no campo, muitas vezes se alimentando com dificuldades em laboratório, incluindo a própria fonte de repasto natural (Hertig & McConnell 1963). Algumas espécies, incluindo *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) e *L. longipalpis* se adaptaram rapidamente as condições de laboratório, mas outras, quando criadas em condições semelhantes não possuem a mesma capacidade.

Os estágios imaturos de ovo a adulto são descritos inteiramente por observações feitas em ambiente de laboratório.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar aspectos da biologia em laboratório, das duas espécies crípticas e dendrófilas de *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni* (Dyar) e *L. (P.)*

scaffi (Damasceno & Arouck), conhecidas da Amazônia Central. Visando obter material suficiente para estudos taxonômicos e informações de biologia básica dessas duas espécies e ainda, descrever os aspectos de seus ciclos de vida, em condições de laboratório, durante as três primeiras gerações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em áreas de floresta de terra firme, em quatro localidades: Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – UFAM – BR 174, Km 38 (2° 38' 59.46" S, 60° 3' 16.47" W), Município de Presidente Figueiredo – BR-174, Ramal do Cigano (2° 3' 4" S, 60° 1' 30" W); Centro de Instrução de Guerra na Selva CIGS- B11 (Base Marechal Rondon), AM-010, Km 65 (2°43'55"S 59°47'48"W) e Estrada Manuel Urbano – AM 070, Km 70 (3° 17' 6" S, 60° 11' 9" W), Manaus, Amazonas.

Fêmeas de flebotomíneos foram coletadas por meio de aspiração mecânica, utilizando-se aspiradores mecânicos oriundos de armadilhas do tipo CDC modificadas, nas quais a tela de proteção e a lâmpada foram retiradas, para aumentar a abertura de sucção, e uma gaiola de filó é atrelada para a contenção dos flebotomíneos. A aspiração foi realizada em base de árvore, na altura que o coletor pode alcançar, em horário diurno, no período do fim da manhã, momento em que maioria dos flebotomíneos dendrofílicos está próxima à liteira.

Após as coletas, os flebotomíneos foram transportados para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ). As fêmeas grávidas ou ingurgitadas de sangue proveniente da área de coleta foram separadas, colocadas individualmente em tubos de ovipostura, que consiste em tubos de vidro incolor, onde a abertura é coberta com filó e fechados com cortes finos de tubos plásticos flexíveis transparentes, sendo adicionado no interior do tubo um pedaço de papel filtro umedecido (Figura 4).



Fig. 4 – Tubos de ovipostura para flebotomíneos, contendo em seu interior tiras umedecidas de papel filtro.

Após a postura, foi feita a transferência dos ovos obtidos das matrizes para potes de criação revestidos de gesso, por postura individual, e posteriormente a eclosão, as larvas foram mantidas de acordo com as técnicas estabelecidas por Killick-Kendrick *et. al.*, (1977).

A técnica consistiu em manter as formas imaturas em potes de acrílico transparente com tampas cobertas com recorte de pano preto para evitar proliferação de ácaro, com o fundo cortado revestido de gesso, para a manutenção da umidade (Figuras 5 A e B).

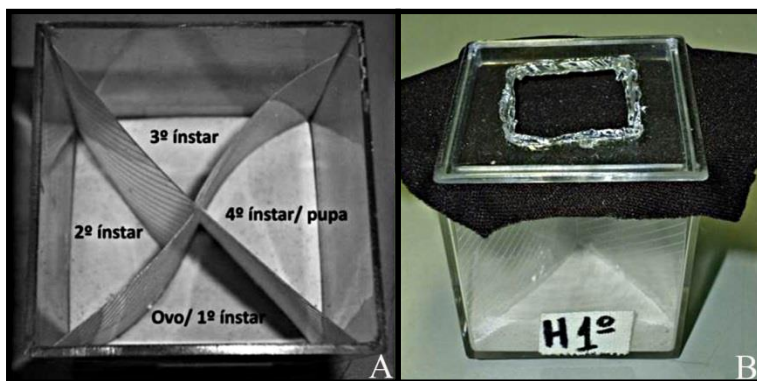


Fig. 5 A e B – Potes para criação de larvas de flebotomíneos, com divisões de compartimentos por estágio imaturo, para alocação das diversas fases do ciclo de vida, à medida que ocorresse mudança de instar.

Foram utilizados no experimento 20 potes de criação onde as condições laboratoriais foram mantidas constantes. Para comparação entre as populações de *L.scaffi* e *L.shannoni*, cada pote dividido em quatro compartimentos de tamanhos iguais. Os ovos das fêmeas identificadas foram contados e colocados nos potes individuais. À medida que os ovos eclodiam, era adicionada uma pequena quantidade de ração no primeiro compartimento do pote. Posteriormente as larvas foram transferidas para outro compartimento logo após a ecdise e estimado o tempo de desenvolvimento de cada estágio. Os potes foram mantidos em estufas de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.), com controle da temperatura (26,5 ° C) e de umidade (90%). As larvas emergidas foram alimentadas com ração de peixe pós-larvas, extrusada e moída, com 55% de proteína bruta, misturada com fezes de animais de biotério. As colônias foram mantidas em laboratório em condições semelhantes aos criadouros dos locais de coleta: manutenção de temperatura, umidade relativa e ausência total de luz. Foi observado o tempo de desenvolvimento desde a eclosão do ovo até a emergência dos adultos. Os potes de criação foram inspecionados diariamente com auxílio de um microscópio estereoscópico.

Os adultos emergidos foram soltos em gaiolas, onde foi adicionado um pedaço de maçã em placa de Petri para a primeira alimentação, sendo as gaiolas colocadas dentro de sacos plásticos com algodão embebido em água para a manutenção da umidade e acondicionadas na B.O.D. Dois dias após a emergência, as fêmeas foram colocadas em gaiolas e oferecido um hamster (*Cricetus cricetus*) anestesiado na tentativa destas fazerem repasto.

Um exemplar de flebotomíneo macho foi retirado, colocado em água com detergente para retirada do excesso de cerdas e posteriormente montado em lâmina com fluido de Berlese.

Para a identificação foi utilizada a chave proposta por Young & Duncan (1994).

3. RESULTADOS

O tempo médio em dias para todo o ciclo de vida, desde a ovipostura até a emergência do adulto de *L.scaffi* foi de 40,2 dias e para *L.shannoni*, a média de duração do ciclo de vida foi de 41 dias (Tabela 1).

Tabela 1 - Ciclo de vida de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* e *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni* obtidos em condições de laboratório: tempo médio de desenvolvimento em dias para cada fase.

ESPÉCIES	<i>L. scaffi</i>				<i>L. shannoni</i>			
	Mínimo	Máximo	Média	DP	Mínimo	Máximo	Média	DP
Ovo	7	11	8,6	2	9	12	10,5	1,5
Larva I	7	12	7,6	2,5	4	11	4,5	3,5
Larva II	3	11	4	4	5	12	6	3,5
Larva III	4	12	5	4	3	13	5	5
Larva IV	7	16	7,6	4,5	8	14	8	3
Pupa	6	18	7,4	6	7	13	7	3
TOTAL			40,2				41	

Quanto à sobrevivência dos imaturos de ovo a adulto, o número de adultos emergidos, de um total de 389 ovos da população de *L.scaffi*, a partir das larvas que emergiram, 218 (56,04%) chegaram à fase adulta; para *L.shannoni*, de um total de 99 ovos, o número dos indivíduos que chegaram a fase adulta foi de 24 (24,2%). Dos totais apresentados acima, o percentual de imaturos por fases da espécie *L. shannoni* foi de 36,3% em L1, 34,3% em L2, 34,3% em L3, 28,2% em L4 e 27,2% para pupas; para *L. scaffi*, os percentuais apresentados foram de 94,6% em L1, 79,9% em L2, 73,7% em L3, 66,8% em L4 e 65,8% para pupa.

A razão sexual dos indivíduos nascidos na colônia de *L. scaffi* foi de um macho para 1,1 fêmeas, ou seja, de um total de 218 indivíduos adultos, 100 (45,7%) eram machos e 118 (54,2%) eram fêmeas; para *L. shannoni*, a razão sexual foi de 0,7 fêmeas para um macho, ou seja, dos 24 indivíduos que chegaram à fase adulta, 14 (58,3%) eram machos e 10 (41,6%) fêmeas, respectivamente.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O ciclo de vida de *L.scaffi* e *L.shannoni* em laboratório é semelhante à observada em outros flebótomos colonizados em condições similares. Em relação à temperatura e umidade, Barretto (1942) estudou sobre a biologia de flebótomos em condições experimentais e destacou o comportamento de *L. intermedia* e *L. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), utilizando temperaturas que variavam entre 20,1 a 26,7° C e verificou que a temperatura ideal para o desenvolvimento dos flebótomos, era de 20°C e uma elevada umidade requerida para sua sobrevivência. Assim como Chagas (1940) que em ambiente de ar condicionado, tentou estabelecer colônia de *L. intermedia*, com temperaturas de 22 a 24°C e umidade superior a 80%, e conseguiu criar essa espécie até a 3ª geração. Colônias de *L. lenti* (Mangabeira, 1938), *L. longipalpis* e *L. intermedia* foram estabelecidas em Minas Gerais com temperaturas que variavam entre 26 e 28°C e umidade relativa entre 80 e 85% (Brazil *et. al.*, 1997).

O desenvolvimento de ovo a inseto adulto de flebotomíneo pode variar de 30 a 40 dias dependendo da temperatura, ocorrendo de 7 a 10 dias o período entre a oviposição e a eclosão; o período larval pode durar pelo menos três semanas até empuparem e de 7 a 14 dias para emersão dos adultos (Brazil & Brasil 2003; WHO 2010). Os dados apresentados corroboram com as médias entre os estágios do ciclo de vida de *L. scaffi* e *L. shannoni* encontrados neste trabalho. O período do ciclo de vida de flebotomíneos pode estar relacionado a vários fatores como temperatura, umidade, nutrição e luminosidade (Barretto 1942; Forattini 1973; Killick-Kendrick 1987; Cabrera & Ferro 2000; Escovar *et. al.*, 2004). Rangel *et. al.*, (1987), verificaram que alterações na temperatura e luminosidade, influenciaram diretamente no ciclo de vida de duas colônias de *L. intermedia* e *L. longipalpis* criadas em laboratório. O tempo médio de desenvolvimento de ovo a adulto das duas populações de *L. scaffi* e *L. shannoni* foram próximos aos registrados para outras espécies neotropicais criados em condições semelhantes, por exemplo, *L. intermedia* (43 dias) (Chagas 1940), (35 dias) (Andrade Filho *et. al.*, 2004), *L. flaviscutellata* (40,5 dias) (Ward 1977), *L. longipalpis* (34 dias) (Killick-Kendrick *et. al.*, 1977), (41,3 dias) (Sherlock & Sherlock 1959), *L. neivai* (45 dias) (Andrade Filho *et. al.*, 2004); comparando duas populações de *L. umbratilis*, da região de Manaus e Manacapuru, utilizando as mesmas condições laboratoriais, Justiniano *et. al.*, (2004) verificaram um tempo maior para estas populações (75,14 e 78,66 dias, respectivamente) do que o registrado para outras espécies neotropicais criadas sob as

mesmas condições; com *L. evandroi*, Ximenes *et. al.*, (2001) obtiveram 51,5 dias para o ciclo completo da espécie e Ferro *et. al.*, (1998) encontraram uma variação de 36 a 74 dias para *L. shannoni*. A porcentagem dos adultos emergidos a partir da contagem do número de ovos das duas populações foi de 45,5% para *L. scaffi* e 24,4% para *L. shannoni*, percentuais próximos foram encontrados para outras espécies neotropicais, como por exemplo, *L. flaviscutellata* (37%) (Ward 1977) e *L. longipalpis* (23%) (Killick-Kendrick *et. al.*, 1977) e um percentual de fecundidade, que é a média do número de ovos postos por fêmeas, entre 23,6% para geração F3 e 39,9% para geração F1 encontrada por Luitgards-Moura *et. al.*, (2000). As fêmeas criadas, com dois dias após a emergência, se alimentavam avidamente em hamster.

L. scaffi e *L. shannoni* apresentaram um tempo médio de desenvolvimento de ovo a adulto bem próximo, em torno de 40 dias; verificou-se que tanto a temperatura quanto a umidade, podem ser aplicadas às espécies criadas, devido às mesmas viverem em simpatria utilizando o mesmo ecótopo. Comparativamente quanto à sobrevivência dos adultos e a razão sexual, *L. scaffi* apresentou um melhor índice para adultos emergidos. Havendo possibilidade de hospedeiros, as espécies se adaptam bem as tentativas de repasto em laboratório, sendo *L. scaffi* bastante antropofílica.

As duas espécies, *L. shannoni* e *L. scaffi*, foram criadas até a segunda e terceira gerações, respectivamente.

Estas observações preliminares têm mostrado que *L. shannoni* e *L. scaffi* da bacia amazônica, podem ser criados em laboratório.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, S. & Theodor, O. 1957. Transmission of diseases agents by Phlebotominae sandflies. *Annual Review Entomology* 2: 203-6.
- Adler, S. & Theodor, O. 1935. Investigations on Mediterranean kala-azar. VIII – Further observations on Mediterranean sandflies. *Proceedings Royal Society Biological Sciences* 116: 505-15.
- Alarcon-Elbal, P.M.; Montoliu, B.G.; Pinal, R.; Delacour-Estrella, S.; Ruiz-Arrondo, I.; Peribáñez, M.A.; De Blas, I.; Molina, R.; Castillo, J.A.; Diéguez-Fernández, L.; Lucientes, J. 2011. How to increase the population of a *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) colony: a new method. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 106(6): 731-734.
- Andrade-Filho, J.D.; Galati, E.A.B.; Falcão, A.L. 2004. Biology of the First Generation of a Laboratory Colony of *Nyssomyia inermidia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 99(6): 597-601.
- Barretto, M.P. 1942. Observações sobre a biologia de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 162pp.
- Barretto, M.P. 1940. Observações sobre a biologia de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae) em condições experimentais. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo* 16: 143-157.
- Bayma, T. 1936. Biologia de *Phlebotomus intermedius*. *Annais Paulistas de Medicina: Cirurgia* 32: 213-216.
- Bayma, T. 1923. Biologia de *Phlebotomus papatasi*. *Annais Paulistas de Medicina: Cirurgia* 14: 67-69.
- Brazil, R.P. & Brazil, B.G. 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Rangel, E.F.; Lainson, R. *Inn: Flebotomíneos do Brasil*, editora Fiocruz, pp. 257-274.

- Brazil, B.G.; Teixeira, P.M.F.; Leal, C.S.; Brazil, R.P. 2002. Biology of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* (Mangabeia, 1938), in a laboratory colony. *Entomologia y Vectores* 9 (1): 64-65.
- Brazil, R.P.; Carneiro, V.L.; Andrade-Filho, J.D.; Alves, J.C.M.; Falcão, A.L. 1997. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). *Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia do Brasil* 26: 191-193.
- Cabrera, O.L. & Ferro, C. 2000. Ciclo de vida de *Lutzomyia spinicrassa*, *L. quasitownsendi* y *L. youngi*, espécies del grupo *verrucarum* (Diptera: Psychodidae). *Actualidades Biológicas* 22: 225-232.
- Cárdenas, E.; Munstermann, L.E.; Martínez, O.; Corredor, D.; Ferro, C. 2001. Genetic Variability among populations of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Dyar, 1929) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 96(2): 189-196.
- Castro, G.O. 1939. Hábitos de alguns flebótomos brasileiros. Comunicado à Academia Brasileira de Ciências, Sessão de 31 de Março de 1939.
- Castro, G.O. 1937. Sobre um processo de cultura de flebótomos. Nota Prévia Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro. Sessão de 8 de Outubro de 1937.
- Chagas, A.C.; Justiniano, S.C.B.; Medeiros, J.F.; Alencar, R.B.; Queiróz, R.G. 2002. Blood-Feeding Behaviour of *Lutzomyia cruzi* under laboratory conditions. Preliminary observations. *Entomologia y Vectores* 9(1): 88-89.
- Chagas, A.W. 1940. Criação de flebótomos e transmissão experimental de leishmaniose visceral americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 35: 327-333.
- Chanotis, B.N. & Anderson, J.R. 1968. Age structure, population dynamics and vector potencial of *Phlebotomus* in Northern California. II – Field population dynamics and natural flagellate infections in Parous Females. *Journal of Medical Entomology* 5: 273-92.

- Chaniotis, B.N. & Anderson, J.R. 1967. Age structure, population dynamics and vector potencial of *Phlebotomus* in Northern California. I – Distinguishing parous from nulliparous flies. *Journal of Medical Entomology* 4: 251-4.
- Damasceno, R.G. & Arouck, R. 1956. Estudos sobre *Flebotomus* no Vale Amazônico Parte VIII – Descrição de *F. pinottii*, *F. scaffi* e *F. nevesi* (Diptera – Psychodidae). *Mimeograph of paper, XIII Congresso Brasileiro de Hygiene* 13 p.
- Dyar, H.G. 1929. The presente knowledge of the American species of *Phlebotomus Rondani* (Diptera, Psychodidae). *American Journal of Hygiene* 10: 112-114.
- Endris, R.G.; Perkins, P.V.; Young, D.G. & Johnson, R.N. 1982. Techniques for laboratory rearing of sand flies (Diptera: Psychodidae). *Mosquito News* 42: 400-407.
- Escovar, J.; Bello, F.J.; Morales, A.; Moncada, L.; Cárdenas, E. 2004. Life Tables and Reproductive Parameters of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) under Laboratory Conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 99(6): 603-607.
- Ferro, C.; Cárdenas, E.; Corredor, D.; Morales, A.; Munstermann, L.E. 1998. Life cycle and fecundity of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 195-199.
- Ferro, C.; Pando, R.; Torres, M.; Morrison, A.C. 1997. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 34: 719-728.
- Forattini, O.P. 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.
- Hanson, W.J. 1968. *The immature stages of the subfamily Phlebotominae in Panama* (Diptera: Psychodidae). Doctoral Thesis, Faculty of the Graduate School of the University of Kansas, 104 pp.
- Harbach, R.E. & Kitching, I.J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology* 23: 327-370.

- Hertig, M. & McConnell, E. 1963. Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 14: 92-106.
- Justiniano, S.C.B.; Chagas, A.C.; Pessoa, F.A.C. & Queiroz, R.G. 2004. Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of Central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Brazil Journal Biology* 64(2): 227-235.
- Justiniano, S.C.B.; Chagas, A.C.; Queiróz, R.G.; Santos, S. 2001. Biology of *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34 (1): 481.
- Killick-Kendrick, M. & Killick-Kendrick, R. 1991. The initial establishment of sand flies colonies. *Parasitologia* 33: 315-320.
- Killick-Kendrick, R. 1987. Methods for the study of phlebotomine sandflies, pp. 473-497. In: W. Peters & R. Killick-Kendrick (eds.), *The Leishmaniases in Biology and Medicine* 1: 550p. Academic Press, London.
- Killick-Kendrick, R. 1978. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. *Acta Tropica* 35: 297-313.
- Killick-Kendrick, R.; Leaney, A. & Ready, P.D. 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 13: 429-440.
- Lane, R.P. & El Sawaf, B. 1986. The immature stages of *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 23(3): 263-268.
- Lantova, L.; Ghosh, K.; Svobodova, M.; Braig, H.R.; Rowton, E.; Weina, P.; Volf, P.; Votýpka, J. 2010. The life cycle and host specificity of *Psychodiella sergenti* n. sp. and *Ps. tobbi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) in sand flies *Phlebotomus sergenti* and *Ph. tobbi* (Diptera: Psychodidae). *Archives Biological Sciences, Belgrade* 62(1): 153-157.
- Lanzaro, G.C.; Ostovka, K.; Herrero, M.V.; Lawyer, P.G.; Warburg, A. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility

- among three populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48: 839-847.
- Luitgard-Moura, J.F.; Castellón Bermudez, E.G.; Rosa-Freitas, M.G. 2000. Aspects related to productivity for four generations of a *Lutzomyia longipalpis* laboratory colony. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95(2): 251-7.
- Lutz, A. & Neiva, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 4: 82-95.
- Munstermann, L.E. 2005. Care, Maintenance, and Experimental Infection of Phlebotomine Sand Flies. *Biology of Disease Vectors*. 2nd edn (ed. By WC Marquardt), pp. 757-762.
- Nieves, E.; Oliveros, J.L. & Rondon, M. 2011. Impacto de *Leishmania amazonenses* e Sangue de Ave no potencial Biológico e fertilidade de *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). *EntomoBrasilis* 4(4): 20-25.
- Passos, F.O.; Lorosa, E.S.; Rebêlo, J.M.M. 2003. Fonte alimentar sanguínea e peridomicialização de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae: Phlebotominae). *Caderno de Saúde Pública* 19: 109-118.
- Pessoa, F.A.C.; Feitosa, M.A.C.; Castellón-Bermudez, E.G.; Ríos-Velásquez, C.M. & Ward, R.D. 2008. Immature stages of two species of *Evandromyia* (*Aldamyia*) and the systematic importance of larval mouthparts within Psychodidae (Diptera, Phlebotominae, Psychodidae). *Zootaxa* 1740: 1-14.
- Pessoa, F.A.C.; Barbosa, U.C.; Medeiros, J.F. 2008. A new species of *Cerqueirellum* Py-Daniel, V. 1983 (Diptera: Simuliidae) and proven new vector of mansonelliasis from the Ituxi River, Amazon basin, Brasil. *Acta Amazonica* 38: 569-582.
- Py-Daniel, V. 1990. *Revisão da Tribo Prosimuliini* seg. Crosskey (Diptera, Culicomorpha, Simuliidae) nas regiões Zoogeográficas Neártica e Neotropical (larvas e pupas). PhD thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 320 pp.

- Rangel, E.F. & Lainson, R. 2003. Ecologia das leishmanioses, p.291-309. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 3680.
- Rangel, E.F.; Souza, N.A.; Wermelinger, E.D.; Barbosa, A.F. 1987. Biologia de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae) em condições experimentais. II. Influência de fatores ambientais no comportamento das formas imaturas e adultas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82(3): 319-323.
- Rangel, E.F.; Souza, N.A.; Wermelinger, E.D. & Barbosa, A.F. 1985. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 80(2): 219-226.
- Santos, S.O.; Arias, J.R.; Hoffmann, M.P.; Furlan, M.G.B.; Ferreira, W.F.; Pereira, C.; Ferreira, L. 2003. 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 633-634.
- Sherlock, I.A. & Guitton, N. 1969. Observações sobre Calazar em Jacobina, Bahia. III – Alguns dados sobre *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 541-8.
- Sherlock, I.A. & Sherlock, V.A. 1959. Criação e biologia em laboratório, do “*Phlebotomus longipalpis*” Lutz & Neiva, 1912. *Revista Brasileira de Biologia* 19: 229-250.
- Vigoder, F.M.; Souza, N.A.; Peixoto, A.A. 2010. Copulatory courtship song in *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 105(8): 1065-1067.
- Volf, P. & Volfova, V. 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 36: 1.

- Ward, R.D. 1977. The colonization of *Lutzomyia flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae), a vector of *Leishmania mexicana amazonenses* in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 14(4): 469-476.
- WHO - World Health Organization. Controle das Leishmanioses. Relatório de uma reunião do Comitê de Peritos sobre o Controle das leishmanioses, Genebra, 22-26 de março 2010.
- Ximenes, M.F.F.M.; Maciel, J.C.; Jerônimo, S.M.B. 2001. Characteristics of the Biological Cycle of *Lutzomyia evandroi* Costa Lima & Antunes, 1936 (Diptera: Psychodidae) under Experimental Conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96(6): 883-886.
- Young, D.G. & Duncan, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54:1-881.
- Young, D.G.; Perkins, P.V. & Endris, R.G. 1981. A larval diet for rearing phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 18: 446.

CAPÍTULO II

“Descrição de algumas fases imaturas de três espécies de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barretto, 1962 (Diptera, Psychodidae) da Amazônia Central Brasileira”

RESUMO: Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) têm importância médica e veterinária, com várias espécies vetoras de diversos agentes etiológicos. Tal como acontece com muitos grupos de insetos, os caracteres morfológicos utilizados para distinguir espécies de flebotomíneos são os dos adultos. As fases imaturas da maioria são desconhecidas e / ou ainda não descritas. O objetivo deste trabalho foi descrever algumas fases imaturas de três espécies de flebotomíneos, pertencentes ao subgênero *Psathyromyia* consideradas crípticas. Os imaturos de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *dendrophyla*, *L. (P.) scaffi* e *L. (P.) shannoni* foram obtidos a partir de colônias de laboratório, e criados a partir de adultos coletados originalmente em florestas próximas de Manaus – Amazonas, Brasil. Larvas do quarto ínstar foram montadas entre lâminas e lamínulas com fluido de Berlese, após clarificação com Hidróxido de Potassa por um período de 24 horas, e posteriormente passagem por ácido acético e álcool. Foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação dos ovos. Estes foram retirados do álcool a 70%, colocados diretamente em “stubs” e levados ao microscópio eletrônico onde se aplicou pressão variável. Os ovos das espécies são elípticos, escuros, apresentando formações poligonais diferentes em seu exocório. Medidas do corpo das larvas e estruturas morfológicas como peças bucais, cerdas, espiráculos foram feitas sob microscopia óptica e fotografados. A aparência geral das larvas é em forma de lagarta, a cabeça marrom, luz do tórax e abdômen com a parte dorsal do VIII segmento abdominal marrons. Cerdas caudais escuras. Cabeça hipognata não retrátil e esclerotizada, com tubérculos antenais longos, segmentos antenais, sendo o primeiro mais delgado que o segundo, o último ligeiramente encurvado ao primeiro segmento. Tegumento coberto com numerosas espículas, com o cume dos tubérculos dorsais intumescidas e arredondados. Tórax e abdômen achatados dorsoventralmente. Tamanho total do corpo com cerca de cinco mm de comprimento. A larva de *L. scaffi* apresentou o maior comprimento – 5,7 mm, *L. dendrophyla* – 4,9 mm e *L. shannoni* com menor – 4,7 mm. As principais diferenças encontradas foram nas esculturas formadas no exocório dos ovos que apresentaram formações poligonais distintas

para cada espécie; nas antenas o tamanho dos tubérculos e segmentos antenais; para a quetotaxia de larva, as diferenças foram nos tamanhos das cerdas labro basais posteriores da cápsula cefálica, dorsais intermediárias, dorsais externas, submedianas dorsais e médias dorsais do protórax e nono segmento abdominal, as cerdas anteriores ventrolaterais e cerdas caudais internas. Nas pupas, as principais diferenças ocorreram nas cerdas do cefalotórax, sendo estas as cerdas frontais superiores, verticais, pós-oculares superiores, pós-oculares médias, pós-oculares internas e pós-oculares inferiores externas e na região abdominal, a cerda abdominal diferente nas três espécies.

Palavras-chave: taxonomia; morfologia; vetores de leishmanioses.

“Description of the larvae of three species of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) (Diptera, Psychodidae) from Brazilian Amazon”

ABSTRACT: Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) have medical and veterinary importance. As with many insect groups, the morphological characters used to distinguish sand fly species are those of the adults, the immature stages of most species being unknown and/or undescribed. The larval stages of less than 70 species of the 400 new world sand flies have been described. The objective of this work was to describe the mature larvae of three species of sand flies, belong to *Psathyromyia* subgenus. The larvae of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *dendrophyla*, *L. (P.) scaffii* e *L. (P.) shannoni* were obtained from laboratory colonies and reared from adults originally collected in Experimental Farm of the Federal University of Amazonas, Amazonas State, Brazil. Four slides of fourth instar of each species were slide-mounted in Berlese's fluid. Mouthparts of other three larvae were dissected and then placed on 10% Potassium Hydroxide (KOH) during two days, then slide-mounted. Measurements of the body bristles and morphological structures as mouthparts, setae, spiracles were done under light microscopy and photographed. Morphology and chaetotaxy of the head and body were observed and measured. General appearance of the larva: the larva is caterpillar-like, with a well sclerotized hypognathous non-retractile head. Conspicuously aboral antennal tubercle long, longer than antenna. Antenna slender, first segment longer than second, the latter directed backward at slight angle from first segment. Integument covered with numerous spicules, arranged into imbricated design posteriorly. Thorax and abdomen dorso-ventrally flattened, rather short and broad. Integument covered with spicules, which on summits of dorsal swellings grade into rounded tubercles. Coloration: Head brown, thorax and abdomen light than, with dorsal brown path on abdominal segment VIII. Caudal setae dark. General size body around 5 mm of length The *L. (P.) scaffii* larva was the largest length with 5,7 mm and *L. (P.) shannoni* the smallest with 4,7 mm. The main chaetotaxy differences between the species, with significant different sizes were the dorsolateral setae, anterior ventrolateral and internal caudal setae.

Keywords: taxonomy; morphology; vectors of leishmaniasis

1. INTRODUÇÃO

Existe um alto índice de diversidade nos flebotómos do gênero *Lutzomyia* França, onde várias espécies são suspeitas de serem, na verdade, espécies crípticas (Young e Duncan 1994; Dujardin *et. al.*, 2005; Pinto *et. al.*, 2010). No subgênero *Psathyromyia* Barretto, ocorrem algumas espécies em que as fêmeas possuem diferenças morfológicas bastante sutis. As fêmeas de *L. scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956), *L. dendrophyla* (Mangabeira, 1942) e *L. shannoni* (Dyar, 1929) são espécies de *Psathyromyia* muito semelhantes em suas estruturas da morfologia externa, bem como os caracteres relacionados com as espermatecas.

Tal como acontece em muitos grupos de insetos, os caracteres morfológicos usados para distinguir espécies de flebotomíneos são os dos adultos, sendo os estágios larvais da maioria das espécies desconhecidos ou não descritos e menos de 70 espécies das mais de 400 existentes no Novo Mundo, foram descritos, nem sempre adequadamente (Young e Duncan 1994). O exocório apresenta camadas distintas geralmente formando esculturas elaboradas na superfície do ovo (Hinton 1969) e tem sido usado para analisar a superfície do ovo de diferentes espécies de flebotomíneos neotropicais (Ward & Ready 1975; Zimmerman *et. al.*, 1977; Endris *et. al.*, 1987; Feliciangeli *et. al.*, 1993; Queiróz 1995; Perez & Ogusuku 1997; Fausto *et. al.*, 2001; Almeida *et. al.*, 2004; Bahia *et. al.*, 2007; Pessoa *et. al.*, 2008; Costa *et. al.*, 2012).

Os flebotomíneos são grupos de insetos de porte pequeno, holometábolos, com quatro estágios de desenvolvimento sendo ovo, larva, pupa e adulto. As larvas têm quatro instares larvais bem definidos e com sensível diferença no tamanho (Foratini 1973; Brazil & Brazil 2003).

Caracteres morfológicos larvais têm sido utilizados para abordagens filogenéticas em estudos de insetos de importância médica, especialmente os Culicidae (Judd 1996; Harbach & Kitching 1998) e Simuliidae (Coscarón 1987; Amaral-Galvão & Maia-Herzog 2003) e flebotomíneos (Pessoa *et. al.*, 2008).

O objetivo desse estudo é descrever os ovos, larvas maduras e pupas de *L. (P.) scaffi*, *L. (P.) dendrophyla* e *L. (P.) shannoni* que ainda não foram descritas, fornecendo importantes informações taxonômicas sobre essas espécies crípticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de Coleta

As coletas das fêmeas matrizes de flebotomíneos foram realizadas em áreas de floresta de terra firme na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – UFAM – BR 174, Km 38 (2° 38' 59.46" S, 60° 3' 16.47" W) em Manaus, Amazonas, Brasil.

2.2. Coleta de Flebotomíneos

Os flebotomíneos foram coletados por meio de aspiração mecânica, utilizando-se aspiradores mecânicos oriundos de armadilhas do tipo CDC modificadas, nas quais a tela de proteção e a lâmpada são retiradas para aumentar a abertura de sucção, onde uma gaiola de filó é atrelada para a contenção dos flebotomíneos. A aspiração foi realizada em base de árvore, em horário diurno, no período do fim da manhã, momento em que maioria dos flebotomíneos dendrofilicos está próxima à liteira (Figura 6).



Fig. 6 – Coleta em base de árvore próxima a liteira com aspirador mecânico.

2.3. Obtenção de F1 em laboratório

Os ovos obtidos das matrizes coletadas no campo foram transferidos para potes individuais de criação, revestidos de gesso. Após a eclosão dos ovos, as larvas de *Lutzomyia dendrophyla*, *L. scaffi* e *L. shannoni* foram mantidas de acordo com as técnicas estabelecidas por Killick-Kendrick & Killick-Kendrick (1991) para criação de imaturos. Para detalhes da técnica de criação ver o **capítulo IV – Ciclo de Vida**.

2.4. Montagem e fotografia dos imaturos

A superfície externa dos ovos de duas espécies foi comparada usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Não houve necessidade de preparação prévia dos ovos que foram retirados do meio líquido de álcool a 70% e colocados sobre “stubs” para análise no modo ambiental, sendo utilizada a pressão variável para observação das amostras. Foi usado o microscópio da marca Quanta 250, do Laboratório de Geociências da Universidade Federal do Amazonas. Larvas do quarto ínstar larval de *L. scaffi*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni* foram montadas entre lâminas e lamínulas em fluido de Berlese. Diferentes estruturas corporais de imaturos foram estudadas através da microscopia óptica, sendo descritas suas diferenças morfológicas. Os aparelhos bucais de larvas das três espécies foram dissecados e em seguida colocados em Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% por dois dias, sendo montado em fluido de Berlese. Medidas do corpo e estruturas morfológicas como peças bucais, cerdas, espiráculos foram feitas sob microscopia de luz e fotografados. A superfície externa dos ovos de duas espécies foi comparada. As imagens obtidas utilizando máquina fotográfica digital da marca JVC 3 CCD, acoplada a um microscópio óptico trinocular da Leica DM 1000 e um computador, sendo utilizado o programa Auto Montage 4.0 (Syncroscopy). Após a captura das imagens e digitalização dos desenhos, as ilustrações foram editadas usando o programa de imagens Adobe Photoshop CS6. A morfologia e quetotaxia da cabeça foram observadas seguindo Arrivillaga *et. al.*, (1999). A morfologia e quetotaxia do corpo foram descritas segundo nomenclatura de Ward (1976a). Análises estatísticas foram realizadas usando o programa PAST (Paleontological Statistics) versão 1.57 (Hammer & Harper 2007) onde foi aplicado o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis para verificar se haveria diferença significativa no tamanho das estruturas analisadas entre as populações estudadas. A quetotaxia pupal utilizada foi de acordo com Forattini (1973).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, os ovos das três espécies são alongados (Figura 7). O exocório é formado por uma fina superfície revestido de esculturas com reticulação poligonal, formando células paralelas, com características distintas.



Fig. 7 – Ovo de *Lutzomyia shannoni* – formato do ovo alongado das três espécies.

As larvas são pequenas, brancas, de aspecto vermiforme. A cabeça não retrátil, hipognata e bem esclerotizado, a boca está situada na parte apical, possui coloração marrom e é recoberta por cerdas de várias estruturas, dentre as quais se destacam as cerdas esfarpeladas, que são as mais predominantes (Figura 8).

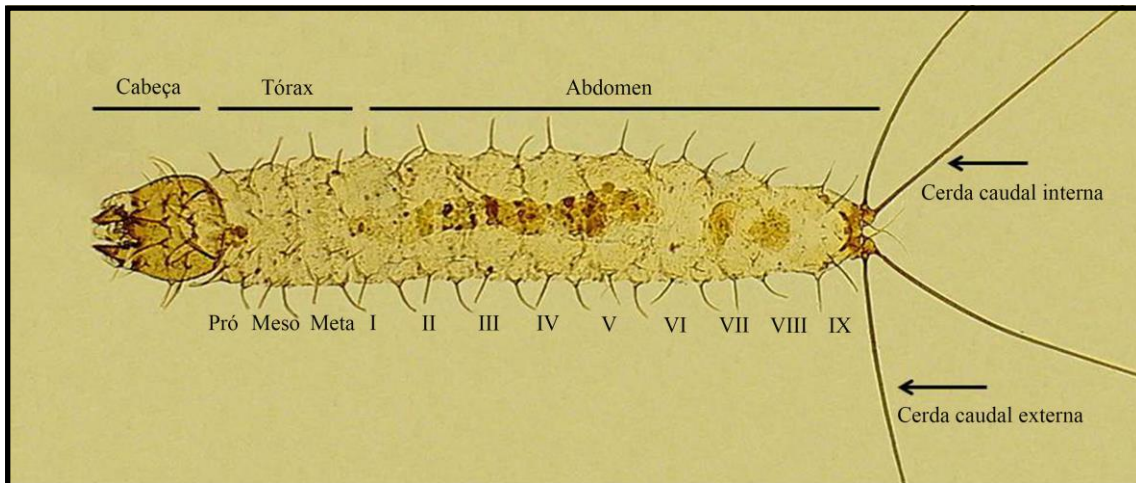


Fig. 8 – Aspecto geral da larva de quarto estágio de flebotomíneo mostrando as cerdas internas e externas.

O corpo da larva é achatado dorso-ventralmente, segmentado, dividido em três segmentos torácicos, onde os espiráculos anteriores ficam localizados lateralmente em curto tubérculo no protórax, e nove segmentos abdominais. Os sete primeiros segmentos abdominais possuem pseudopatas. O oitavo segmento apresenta área bastante esclerotizada com dois curtos tubérculos, onde se situam os espiráculos posteriores. As larvas possuem dois pares de longas cerdas caudais escuras.

As pupas inicialmente apresentam coloração esbranquiçada ou amarelada, escurecendo, à medida que se aproxima a eclosão dos adultos. Têm aspecto claviforme, sendo o abdômen a região mais estreita curvada; a cabeça e o tórax são curvados para trás. Os últimos segmentos são recobertos pela exúvia larval. As pupas das três espécies apresentam praticamente todas as cerdas descritas para outras espécies de flebotomíneos, diferindo no tamanho e forma de algumas cerdas (Tabela 2).

Foram identificadas apenas as cerdas que diferem taxonomicamente as espécies desse estudo e listadas nas descrições por espécie. No cefalotórax foram encontradas similaridades no formato das cerdas frontais inferiores (2A), clipeais (1), pré-clipeais externas (02) e pré-clipeais internas (01), sendo simples nas três espécies (Figura 9A a D). Não foram observadas diferenças nas cerdas pré-alares das espécies.

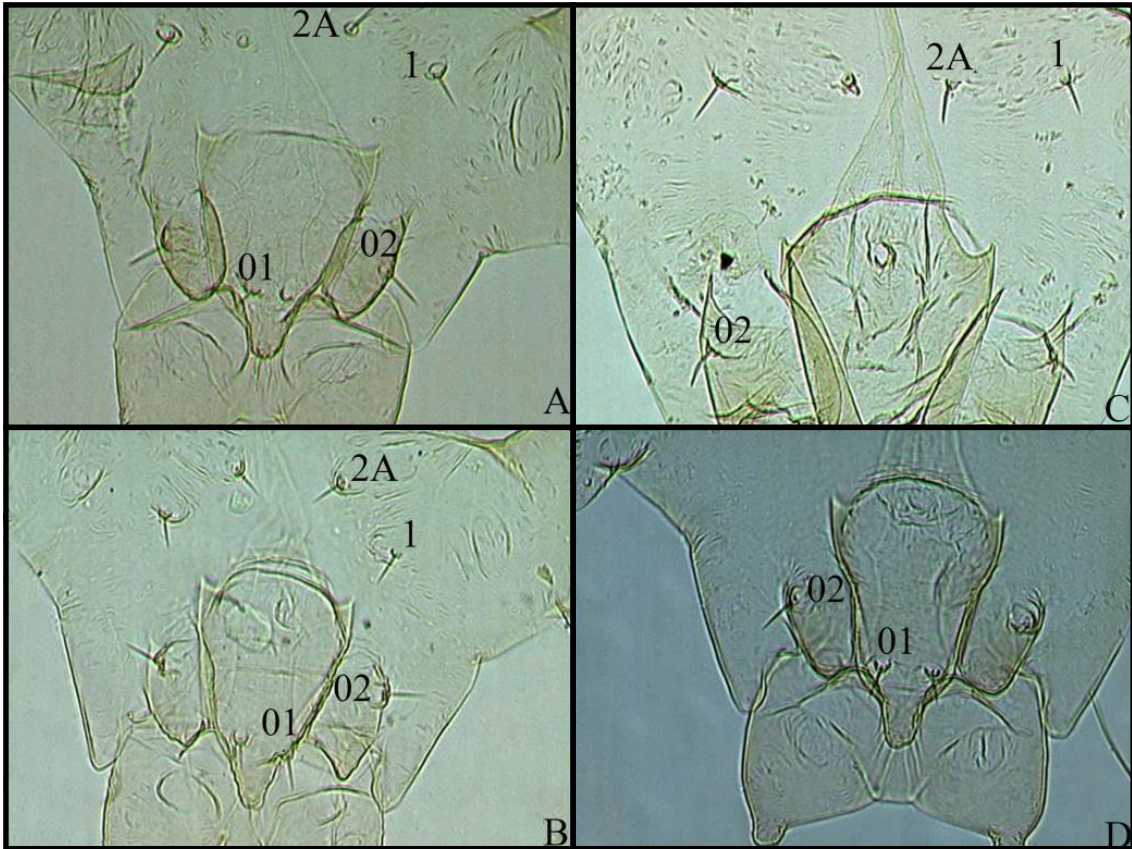


Fig. 9 – **A** – *Lutzomyia scaffi*; **B** – *Lutzomyia shannoni* **C** e **D** – *Lutzomyia dendrophyla* – microfotografia de cefalotórax de pupas, mostrando a similaridade na forma das cerdas frontais inferiores (**2A**), clipeais (**1**), pré-clipeais externas (**02**) e pré-clipeais internas (**01**), sendo simples nas três espécies.

3.1. *Lutzomyia scaffi*

3.1.1. Ovo

Os ovos de *L. scaffi*, possui a superfície do exocório composta por polígonos com formatos retangulares (Figura 10 A e B).

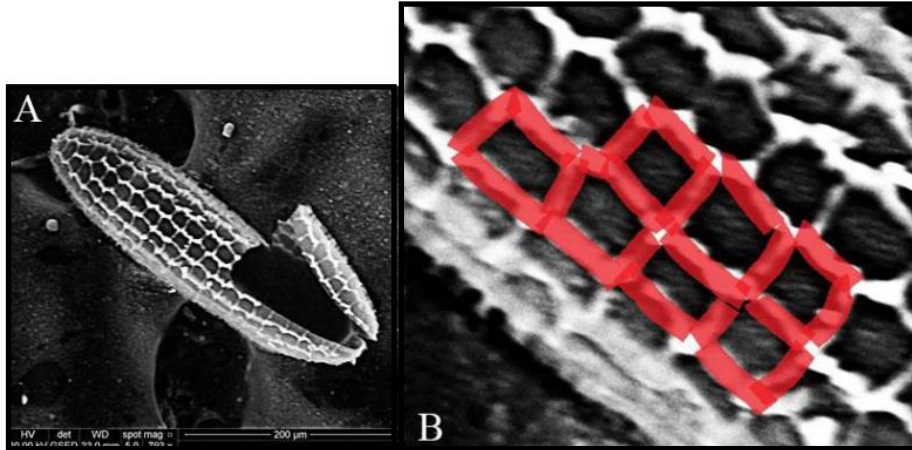


Fig. 10 A e B – característica do exocório de ovo eclodido de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi*, com detalhe das formações retangulares destacados em vermelho.

3.1.2. Larva

Das espécies já descritas, a larva de *L. scaffi* apresenta o maior comprimento, 5,7 mm. Sherlock & Carneiro (1963), quando da descrição de *Phlebotomus bahiensis* encontraram um tamanho médio de 2,25 mm; para *L. longipalpis*, Guiton & Sherlock (1969) e Leite & Williams (1996) encontraram tamanhos de 3,5 mm e 3,29 mm respectivamente e Gemetchu (1976) encontrou um tamanho médio de 4,5 mm para *Phlebotomus longipes*.

Cabeça

Com formato ovóide; comprimento de 320 μm (300-350) e a largura de 248,75 μm (270-225). No tagma cefálico dorsal foi encontrado as seguintes cerdas: labro basais posteriores (LBP), simples e espiniformes; frontoclipeal anterior (1), cerda esfarpelada em forma de escova, cerda frontoclipeal posterior (2), cerda esfarpelada em forma de escova e genal anterior (3), simples e espiniforme. Cerdas genais mediais (4) e posteriores (5), cerdas esfarpeladas em forma de escova. Para o tagma cefálico ventral foi encontrado as cerdas pós-genais ventrais (6) e subgenais (7), simples (Figura 11 A). Para as mandíbulas encontramos duas cerdas longas, simples no meio do dorso (S1 e S2), e uma cerda simples (S6) na margem superior. Do lado ventral aparecem três cerdas, uma na parte superior (S5) e duas na parte central do meio da mandíbula (S3 e S4). Na parte inferior da mandíbula, temos três dentes apicais fortes, bem como um lóbulo protuberante, onde estão inseridos os pelos mandibulares. Presença de dois processos látero-mandibulares, observáveis somente com a mandíbula bem clarificada. Cada maxila apresenta três cerdas simples, S1 na parte dorsal apical e duas (S2 e S3) na parte proximal. Processo maxilar no meio da estrutura. Margem da parte dorsal com pequenas cerdas esparsas em forma de pente (Figura 11 B a E). As estruturas descritas são comuns às três espécies deste estudo. Todas as cerdas do tagma cefálico são inseridas em pequenos tubérculos. Nas três espécies estudadas do subgênero *Psathyromyia*, *L. scaffii*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni* não se observou nenhuma variação morfológica nestas estruturas.

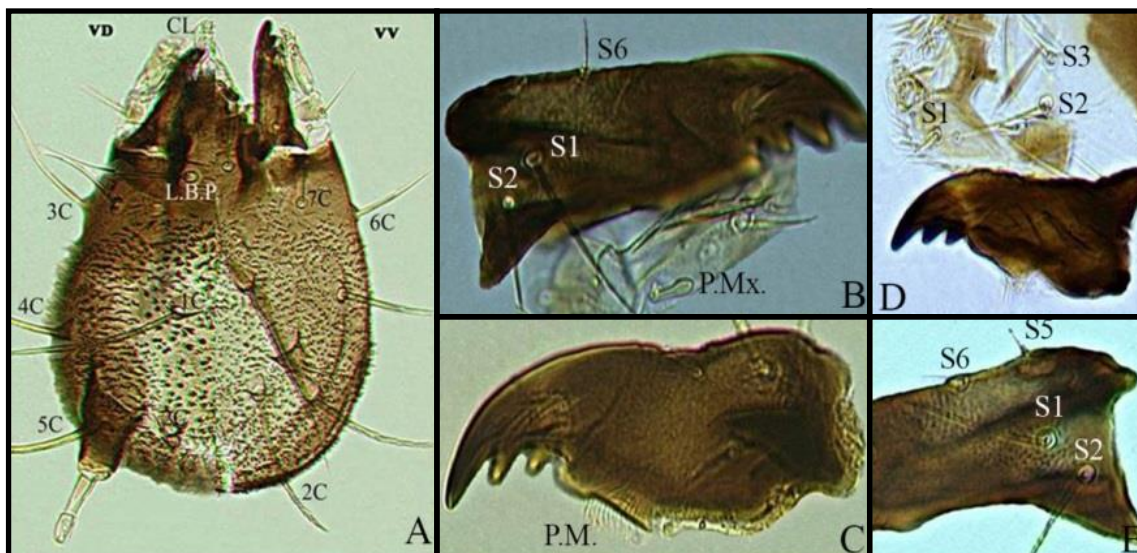


Fig. 11 – **A** – Microfotografia de cabeça de larva de quarto instar de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffii* – CL – clipeo; VD– **Vista Dorsal**: L.B.P. – labro basal posterior; **1C** – frontoclipeal anterior; **3C** – genal anterior; **4C** – genal medial; **5C** – genal posterior; **VV** – **Vista Ventral**: **2C** – frontoclipeal posterior; **6C** – pós-genal; **7C** – subgenal (Arrivillaga *et. al.*, 1999); **B** – mandíbula e maxila – disposição das cerdas simples **S1**, **S2** e **S3**, inseridas na mandíbula e processo maxilar (**P.Mx.**); **C** – pelos mandibulares (**P.M.**); **D** – cerdas simples da maxila: **S1**, **S2** e **S3**; **E** – mandíbula com as cerdas **S1**, **S2**, **S5** e **S6**.

Antena

As larvas apresentam segmentos antenais subiguais, implantados em um tubérculo antenal, com o segundo segmento apresentando sensilas campaniformes em sua base e na extremidade a sensila apical da antena (Figura 12). Medidas das antenas com tamanho médio com o tubérculo foi de 85µm (75-100) e sem o tubérculo foi de 48,75µm (40-55). Os segmentos antenais são aproximadamente a metade do tubérculo.

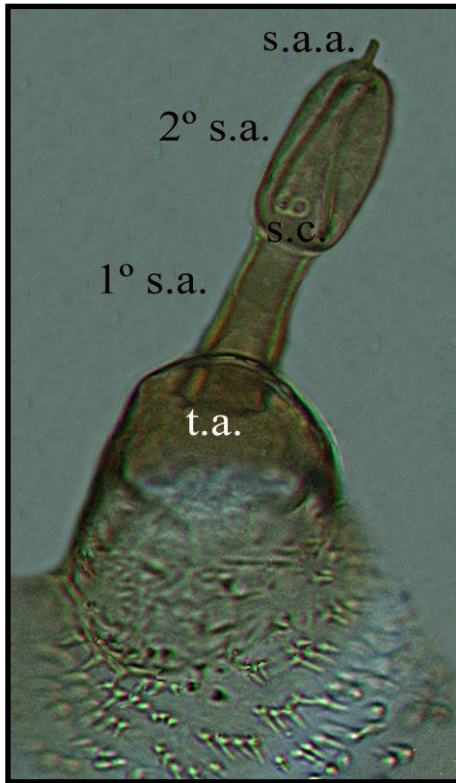


Fig. 12 – Antena da larva de quarto ínstar de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffii* – **t.a.** – tubérculo antenal; **s.c.** – sensilas campaniformes; **1º** e **2º** segmentos antenais; **s.a.a.** – sensila apical da antena.

Tórax

O tórax é dividido em três segmentos: protórax, mesotórax e metatórax. Meso e metatórax possuem cerdas homólogas à segunda fileira do protórax, tanto na região dorsal quanto na região ventral. (Fig. 13 A, B, C e D).

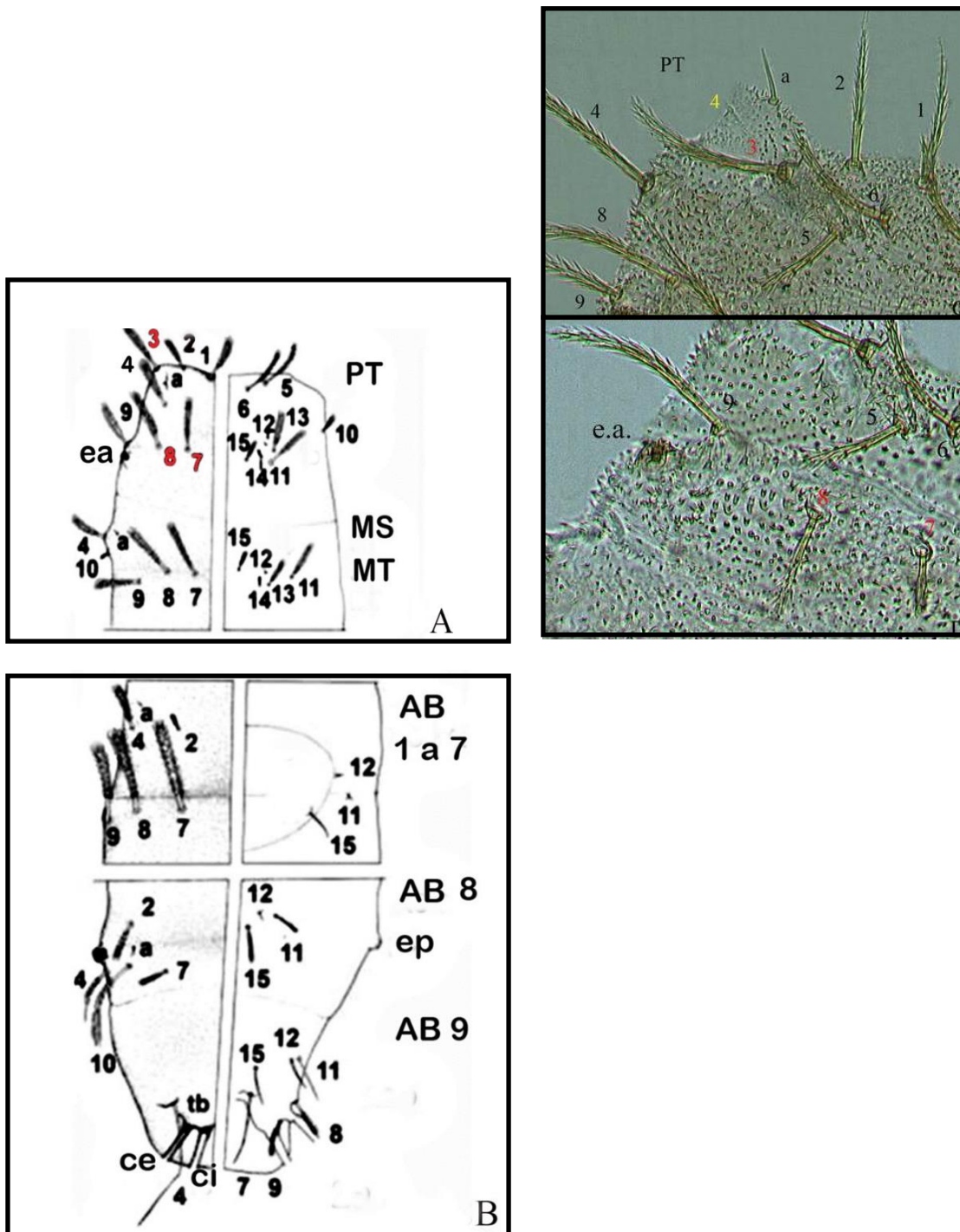


Fig. 13 – Representação esquemática de **A** e **B**: tórax e abdômen de larva de quarto ínstar de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) (figura modificada de Pessoa *et. al.*, 2008). **C** e **D** – microfotografias de tórax. Cerda “4” em amarelo; cerdas 3,7 e 8 (em vermelho) de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *scaffi* apresentaram diferenças significativas das outras espécies. **VD** – vista dorsal; **VV** – vista ventral, **PT** – protórax, **ea** – espiráculo anterior, **MS** – mesotórax, **MT** – metatórax, cerdas de 1 – 15: **AB** – segmentos abdominais de 1 a 7, cerdas de 2 – 15, **AB8** – oitavo segmento abdominal, **ep** – espiráculo posterior, **AB9** – nono segmento abdominal – **ce** – cerda caudal externa, **ci** – cerda caudal interna.

Na parte anterior do protórax há presença de uma pequena cerda (4) de 5 a 8µm aproximadamente, mencionada por Abonnenc (1956a) e Forattini (1973) como cerda “a”, localizada próximo ao encontro do tórax com a cabeça (Fig. 13 C em amarelo). Quetotaxia do protórax lado dorsal: tergito com duas fileiras de cerdas, a primeira fileira de cerdas com quatro pares (interna dorsal, intermediária dorsal, externa dorsal e ventrolateral anterior) e cerda “a” e a segunda fileira com três pares (submediana dorsal, dorsal média e dorsolateral) (Figuras 13 A a D); espiráculos anteriores formados de oito a 10 papilas (Figuras 14 A a C).

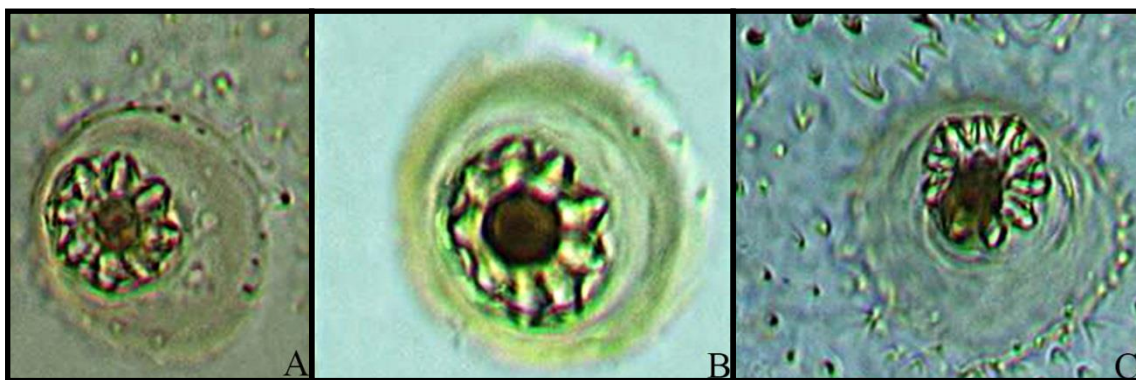


Fig. 14 – A a C – espiráculos anteriores encontrados em *Lutzomyia (Psathuromyia) scaffi* formados por oito a 10 papilas.

Para a região ventral: esternito com dois pares de cerdas na primeira fileira (externa ventral e interna ventral) e a segunda fileira com seis pares (basal, pós-ventrolateral, pós-ventral, média ventral, intermediária ventral e submediana ventral) (Figuras 15 A e B). As cerdas são semelhantes do tipo esfarpeladas em forma de escova, onde algumas apresentam diferenças em seus tamanhos (Tabela 2).

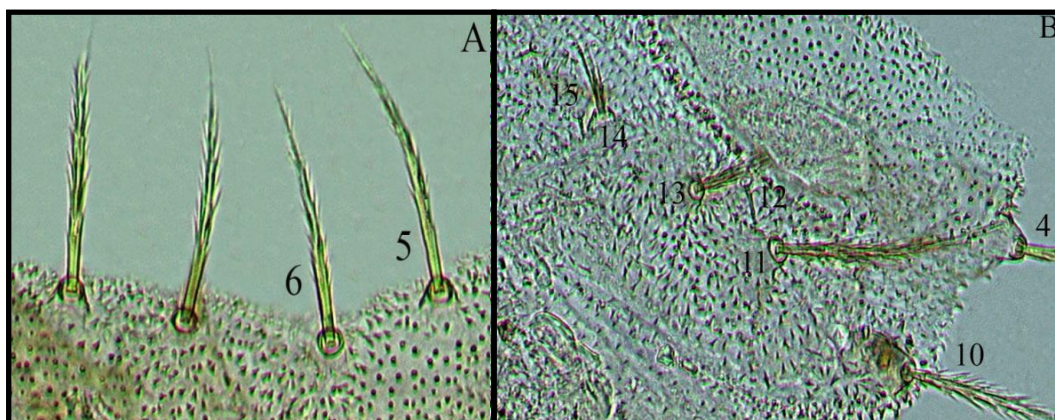


Fig. 15 – A e B – cerdas da região ventral do protórax de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* – A – cerdas esfarpeladas ventral externa (5) e ventral interna (6); B – anterior ventrolateral (4), basal (10), pós-ventrolateral (11), média ventral (13) e ventral intermediária (14), esfarpeladas; pós-ventral (12), simples e ventral submediana (15), espiniforme.

Tabela 2 – Tabela correspondente ao número, tipo e tamanho das cerdas de cada segmento larval (N = 4 – tamanho em μm) das larvas de quarto ínstar de *Lutzomyia scaffi*, *Lutzomyia dendrophyla* e *Lutzomyia shannoni*.

Parte do corpo da larva	Nº da cerda	Tipo de cerda	<i>L. scaffi</i>	<i>L. dendrophyla</i>	<i>L. shannoni</i>
Cabeça					
Labro basal posterior		Espiniforme	86,2 (75-100)	131,2 (125-145)	106,2 (100-125)
Frontoclipeal anterior	1	Esfarpelada	177,5 (160-190)	211,2 (195-225)	205,0 (200-210)
Frontoclipeal posterior	2	Esfarpelada	138,7 (130-150)	196,2 (185-200)	201,2 (200-205)
Genal anterior	3	Esfarpelada	76,2 (55-80)	76,2 (75-80)	81,2 (75-85)
Genal médial	4	Esfarpelada	157,5 (150-165)	172,5 (150-185)	186,2 (185-190)
Genal posterior	5	Esfarpelada	117,5 (100-125)	208,7 (185-225)	200,0 (195-205)
Pós-genal	6	Simples	90,0 (65-115)	136,2 (125-150)	136,2 (135-140)
Subgenal	7	Simples	86,2 (75-100)	45,3 (34,7-66,7)	64,67 (53,3-72)
Protórax					
Dorsal interna	1	Esfarpelada	82,5 (75-95)	80,0 (75-90)	67,5 (60-75)
Dorsal intermediária	2	Esfarpelada	85 (65-110)	61,2 (60-65)	106,2 (60-135)
Dorsal externa	3	Esfarpelada	115 (100-140)	108,7 (95-145)	81,2 (65-100)
Ombro acessório	a	Espiniforme	31,8 (26-37,3)	32,0 (24-40)	32,6 (29,3-37,3)

Parte do corpo da larva	Nº da cerda	Tipo de cerda	<i>L. scaffi</i>	<i>L. dendrophyla</i>	<i>L. shannoni</i>
Anterior ventrolateral	4	Esfarpelada	125,0 (110-135)	148,7 (140-155)	127,5 (120-135)
Ventral externa	5	Esfarpelada	87,5 (80-100)	96,2 (75-120)	96,2 (90-105)
Ventral interna	6	Esfarpelada	77,5 (65-95)	95,0 (80-120)	75,0 (70-80)
Submediana dorsal	7	Esfarpelada	43,7 (40-45)	36,2 (30-45)	35,0 (30-40)
Média dorsal	8	Esfarpelada	65,0 (60-75)	56,2 (45-60)	47,5 (35-55)
Dorsolateral	9	Esfarpelada	107,5 (100-110)	113,7 (105-120)	77,5 (55-100)
Basal	10	Esfarpelada	51,2 (50-55)	57,5 (55-65)	98,7 (70-125)
Pós-ventrolateral	11	Esfarpelada	91,2 (85-100)	110,0 (105-115)	97,5 (90-100)
Pós-ventral	12	Espiniforme	18,6 (16-24)	24,6 (21,3-26,6)	22,9 (18,6-26,6)
Média ventral	13	Esfarpelada	51,2 (50-55)	56,2 (35-70)	51,2 (50-55)
Ventral intermediária	14	Esfarpelada	18,6 (13,3-26,6)	19,0 (15-26,6)	25,3 (10,6-32)
Ventral submediana	15	Simplex	38,6 (26,6-53,3)	44,0 (40-50,6)	37,2 (26,6-45)
Meso e Metatórax					
Ombro acessório	a	Espiniforme	25,8 (24-26,6)	25,0 (18,6-26,6)	24,1 (18,7-26,7)
Anterior ventrolateral	4	Esfarpelada	141,2 (125-155)	175,0 (160-195)	157,5 (135-175)
Dorsal submediana	7	Esfarpelada	57,5 (55-60)	39,3 (30-45)	36,2 (30-45)
Média dorsal	8	Esfarpelada	75,0 (75-75)	64,3 (45-95)	53,7 (50-60)
Dorsolateral	9	Esfarpelada	130,0 (125-135)	130,0 (115-145)	126,8 (120-130)
Basal	10	Esfarpelada	61,2 (60-65)	72,5 (100-125)	77,5 (70-85)
Pós-ventrolateral	11	Esfarpelada	98,7 (50-145)	111,8 (100-125)	110,6 (100-115)
Pós-ventral	12	Espiniforme	22,0 (21,3-24)	25,6 (21,3-29,3)	23,6 (21,3-26,7)
Média ventral	13	Esfarpelada	68,7 (55-105)	65,6 (45-95)	54,3 (50-60)
Ventral intermediária	14	Esfarpelada	25,9 (24-26,6)	22,0 (13,3-34,6)	22,1 (13,3-29,3)
Ventral submediana	15	Simplex	36,0 (32-40)	38,6 (32-50,6)	33,7 (32-37,7)
Segmentos abdominais 1-7					
Dorsal intermediária	2	Trífida	14,2 (13,3-16)	17,0 (14-18,6)	15,25 (14-16,6)
Anterior ventrolateral	4	Esfarpelada	156,7 (147,5-165)	157,4 (150-163,7)	148,1 (137,5-152,5)

Parte do corpo da larva	Nº da cerda	Tipo de cerda	<i>L. scaffii</i>	<i>L. dendrophyla</i>	<i>L. shannoni</i>
Dorsal submediana	7	Esfarpelada	34,8 (22,5-51,2)	30,2 (18,7-41,2)	26,5 (23,7-38,7)
Média dorsal	8	Esfarpelada	58,1 (41,2-80)	43,1 (27,5-57,5)	40,0 (31,2-52,5)
Dorsolateral	9	Esfarpelada	157,1 (147,5-161,2)	181,8 (178,7-186,2)	159,0 (153,7-170)
Basal	10	Esfarpelada	99,4 (95-110)	111,8 (100-126,2)	102,4 (93,7-117,5)
Pós-ventrolateral	11	Simple	43,5 (39,3-48,1)	46,4 (42,6-50)	40,1 (34-45,2)
Pós-ventral	12	Espiniforme	20,8 (20-22,6)	22,7 (20,6-25,3)	24,1 (20-34)
Ventral submediana	15	Simple	117,0 (97,5-130)	112,9 (93-137,5)	121,2 (105-130)
Segmento abdominal 8					
Anterior ventrolateral	4	Esfarpelada	102,5 (100-105)	118,7 (100-140)	113,7 (100-130)
Submediana dorsal	7	Esfarpelada	31,2 (30-35)	36,2 (30-45)	32,5 (30-35)
Média dorsal	8	Esfarpelada	143,7 (140-145)	193,7 (170-210)	166,2 (155-170)
Dorsolateral	9	Esfarpelada	151,2 (145-155)	166,2 (150-180)	182,5 (170-200)
Basal	10	Simple	22,0 (18,6-24)	24,3 (20-26,6)	23,0 (20-26,6)
Pós-ventrolateral	11	Esfarpelada	52,0 (48-53,3)	51,3 (48-56)	51,3 (48-56)
Pós-ventral	12	Simple	17,3 (13,3-18,6)	24,0 (16-29,3)	21,3 (16-29,3)
Ventral submediana	15	Esfarpelada	92,5 (65-110)	56,0 (53,3-61,3)	56,0 (53,3-58,7)
Segmento abdominal 9					
Anterior ventrolateral	4	Simple	557,5 (480-660)	711,2 (545-860)	565 (550-590)
Dorsal submediana	7	Simple	262,5 (225-300)	293,7 (280-310)	235 (215-245)
Média dorsal	8	Esfarpelada	40,0 (35-45)	43,7 (40-45)	46,2 (40-50)
Dorsolateral	9	Esfarpelada	47,5 (40-50)	61,2 (60-65)	48,7 (40-55)
Pós-ventrolateral	11	Simple	320 (275-375)	281,2 (260-320)	246,2 (220-265)
Pós-ventral	12	Simple	54,0 (48-58,6)	71,0 (60-85,3)	52,6 (48-58,6)
Ventral submediana	15	Simple	37,3 (29,3-42,6)	43,2 (32-53,3)	34,5 (29,3-45)

Parte do corpo da larva	Nº da cerda	Tipo de cerda	<i>L. scaffi</i>	<i>L. dendrophyla</i>	<i>L. shannoni</i>
Caudal interna	CI	Simples	2,52 (2,47-2,63mm)	2,3 (2,1-2,6mm)	2,3 (2,1-2,5)
Caudal externa	CE	Simples	2,37 (2,26-2,44mm)	2,1 (2,1-2,2mm)	2,1 (2,0-2,2)

Mesotórax e Metatórax: cerdas de quatro a 15 e cerda “a”, similares ao protórax. São cerdas esfarpeladas em forma de escova, à exceção as cerdas pós-ventrais e submedianas ventrais que são simples e espiniformes.

Abdômen: cerdas abdominais com a mesma distribuição proposta por Ward (1976a). Segmentos de 1-7 são semelhantes em tamanho e forma. Na região dorsal encontramos as cerdas intermediárias dorsais (2), em escova; ventrolateral anterior (4), submediana dorsal (7) média dorsal (8), dorsolateral (9), esfarpeladas em forma de escova; pós-ventrolateral (11), pós-ventral (12) e submediana ventral (15), simples espiniformes, presença da cerda basal (10), esfarpelada. As cerdas submediana dorsal e média dorsal decrescem de tamanho ao longo dos segmentos abdominais.

O oitavo segmento apresenta área bastante esclerotizada com dois curtos tubérculos, onde se situam os espiráculos posteriores formados por 16 papilas; presença de um par de sensilas campaniformes e um padrão de manchas circulares mais claras, dispostas umas ao lado das outras, formando pequenas depressões em algumas partes desta região (Figuras 16 e 17 A a D).



Fig. 16 – espiráculo posterior de larva de quarto ínstar de *Lutzomyia scaffi* composto por 16 papilas.

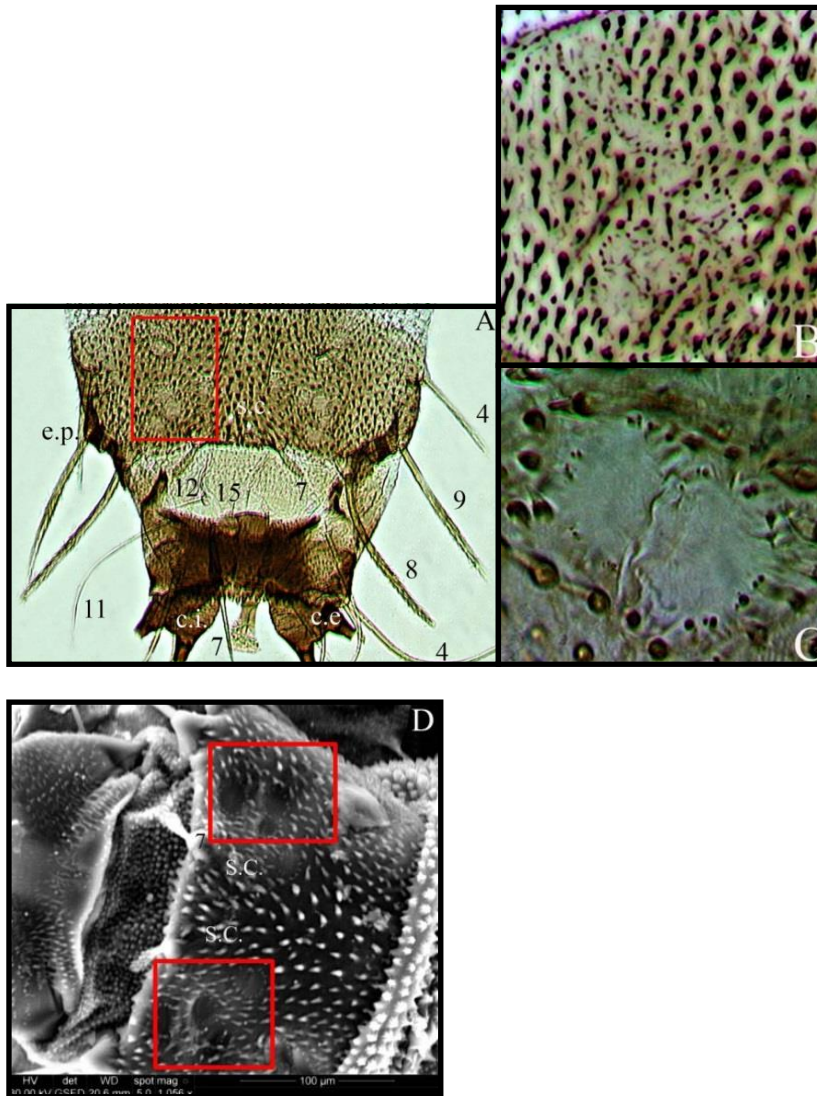


Fig. 17 – Microfotografias dos oitavo e nono segmentos abdominais – A – oitavo segmento abdominal, com localização das cerdas anterior ventrolateral (4), submediana dorsal (7), média dorsal (8), dorsolateral (9), todas esfarpeladas, sensila campaniforme (s.c.) e espiráculo posterior (e.p.); destaque em vermelho para as manchas circulares dispostas neste segmento, mostrando a formação de depressões (B, C e D).

As cerdas anteriores ventrolaterais (4), dorsal submediana (7), média dorsal (8), dorsolateral (9), pós-ventrolateral (11) e ventral submediana (15) são do tipo esfarpeladas; a basal (10) e a pós-ventral (12) são simples (Fig. 18 E).

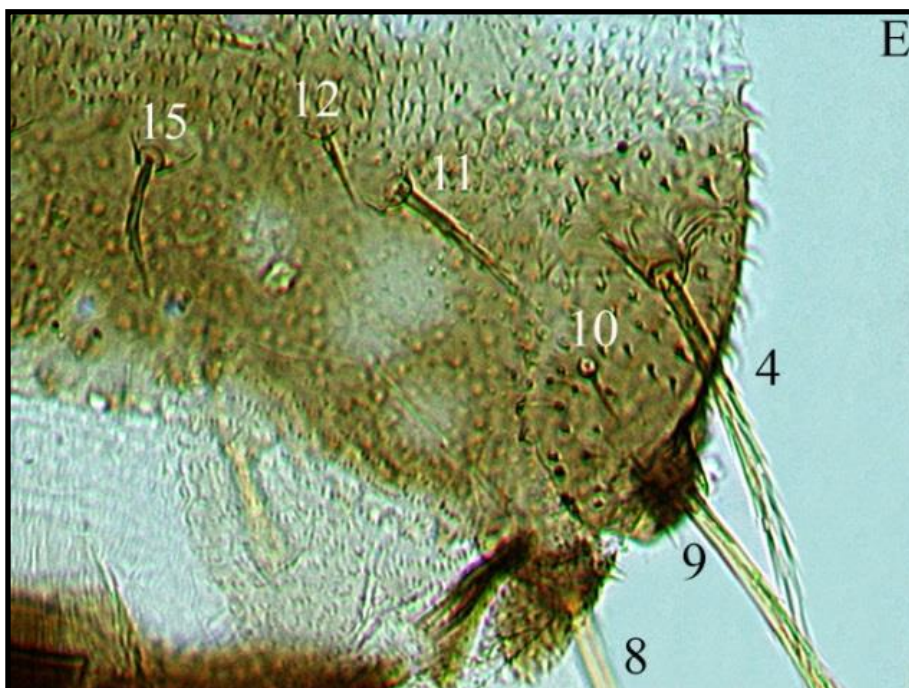


Fig. 18 E – Microfotografia do oitavo segmento mostrando as cerdas esfarpeladas anteriores ventrolaterais (4), médias dorsais (8), dorsolaterais (9), pós-ventrolaterais (11), ventrais submedianas (15) e as cerdas simples basais (10) e pós-ventrais (12).

No nono segmento, com exceção das cerdas médias dorsais (8) e dorsolaterais (9) que são esfarpeladas, todas as outras são simples: anteriores ventrolaterais (4), dorsais submedianas (7), pós-ventrolaterais (11), pós-ventrais (12), ventrais submedianas (15) e cerdas internas (CI) e externas (CE), que foram as maiores cerdas dentre as três espécies estudadas (Tabela 6) (Figura 19).

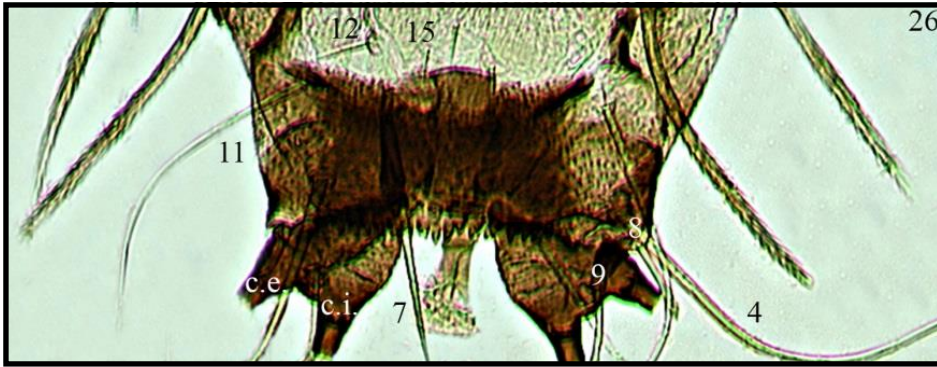


Fig. 19 – Microfotografia do nono segmento abdominal mostrando as cerdas anteriores ventrolaterais (4), dorsais submedianas (7), pós-ventrolaterais (11), pós-ventrais (12) e ventrais submedianas (15), caudal interna (c.i.) e caudal externa (c.e.) que são simples, que estão quebradas na foto e as cerdas médias dorsais (8) e dorsolaterais que são esfarpeladas.

3.1.3. Pupa

Em *L. scaffii*, no cefalotórax a cerda vertical (3) é encrespada longa, mantendo este padrão para as cerdas frontais superiores (2B) e pós-oculares superiores (4) e cerdas pós-oculares médias (5). As cerdas pós-oculares internas (6A) e pós-oculares inferiores externas (6B), são bífidas e longas. Não foi observada diferença na cerda pré-alar (10) dessa espécie, que é encrespada grossa, em relação às outras. Na região abdominal a diferença observada ocorreu na cerda lateral anterior (8) que é muito curta e bífida (Figuras 20 A a F) (Tabela 3).

Tabela 3 – Quetotaxia pupal de flebotomíneos - tabela correspondente à nomenclatura, número e tipo de cerdas encontradas em *Lutzomyia scaffi*, *Lutzomyia dendrophyla* e *Lutzomyia shannoni*.

Pupa		Espécies		
Cefalotórax	Nº da cerda	<i>L. scaffi</i>	<i>L. dendrophyla</i>	<i>L. shannoni</i>
Pré-clipeal	01	espiniforme	espiniforme	espiniforme
Pré-clipeal externa	02	espiniforme	espiniforme	espiniforme
Clipeal	1	espiniforme	espiniforme	espiniforme
Frontal inferior	2A	espiniforme	espiniforme	espiniforme
Frontal superior	2B	encrespada longa	espiniforme	espiniforme
Vertical	3	encrespada longa	espiniforme	espiniforme
Pós-ocular superior	4	encrespada longa	espiniforme	espiniforme
Pós-ocular média	5	encrespada longa	espiniforme	espiniforme
Pós-ocular interna	6A	bífida longa	espiniforme	espiniforme
Pós-ocular inferior externa	6B	bífida longa	espiniforme	espiniforme
Pré-alares	10	encrespada grossa	encrespada grossa	encrespada grossa
Abdômen				
Lateral anterior	8	encrespada curta	bífida longa	espiniforme

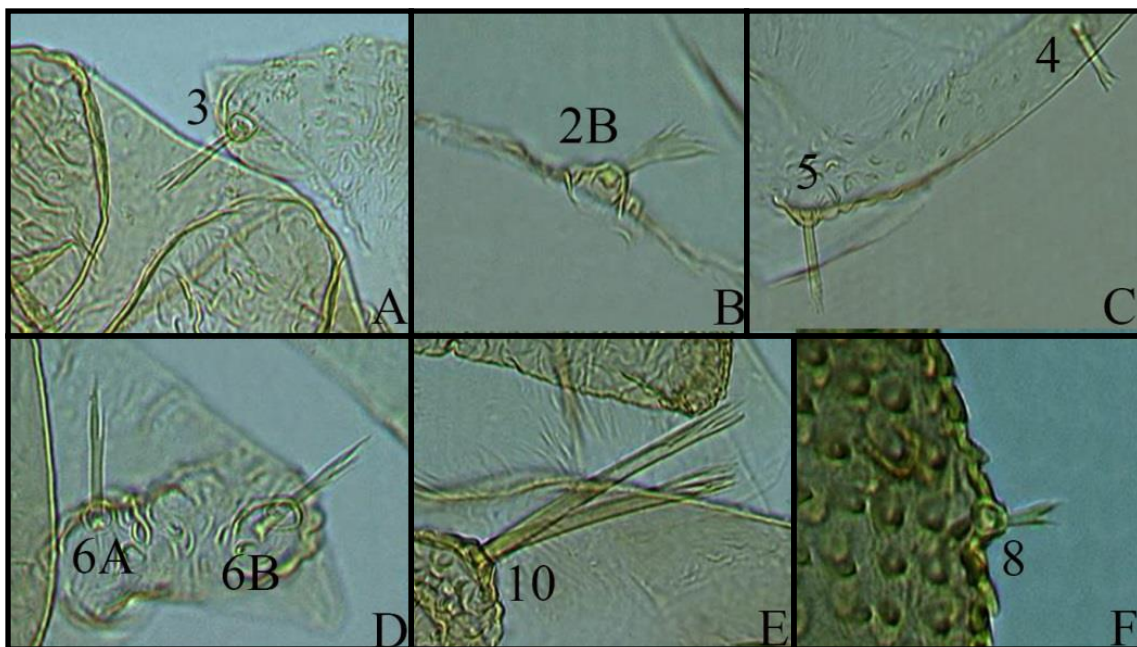


Fig. 20 – A a F – Microfotografias da quetotaxia pupal de *Lutzomyia scaffi* – A – cerda vertical (3), encrespada longa; B – frontal superior (2B), encrespada longa; C – pós-ocular superior (4), encrespada longa; C – pós-ocular média (5), encrespada longa; D – pós-ocular interna (6A), bífida; D – pós-ocular inferior externa (6B), bífida longa; E – pré-alares (10), encrespadas grossas e F – lateral anterior (8), encrespada curta.

3.2. *Lutzomyia dendrophyla*

3.2.1. Ovo

A superfície do exocório dos ovos de *L. dendrophyla*, é composta por polígonos com formatos pentagonais ou hexagonais (Figura). Não foram obtidas boas imagens na microscopia de varredura, sendo então utilizada a microfotografia de Ward & Ready (1975) (Figura 21 A e B) para representação dessa descrição.

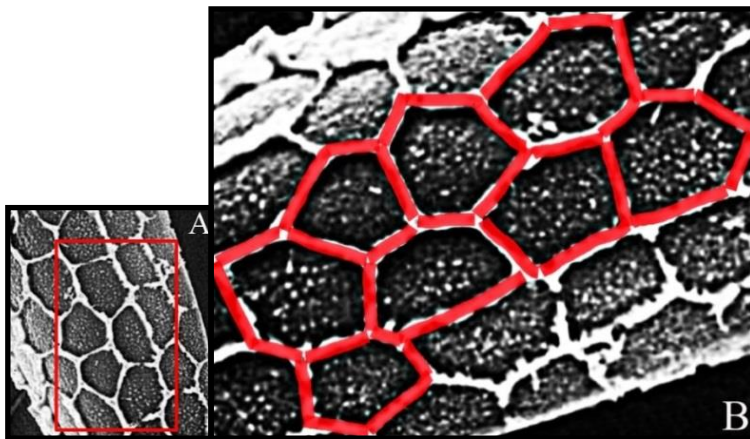


Fig. 21 – A e B - Microfotografia de Microscopia eletrônica de varredura do exocório do ovo de *Lutzomyia dendrophyla* modificada de Ward & Ready (1975). Em vermelho, detalhes das formas dos polígonos do ornamento.

3.2.2. Larva

A larva apresentou 4,9 mm de comprimento. Se comparada a algumas espécies descritas, *L. dendrophyla* é relativamente maior; Ximenes *et. al.*, (2001) em trabalho realizado sobre características do ciclo biológico de *L. evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936) em condições experimentais, citaram o tamanho médio de 2,8 mm para larvas de quarto instar; e Ferro *et. al.* (1998), descrevendo ciclo de vida de *L. shannoni*, registraram um tamanho médio de 4,7 mm para as larvas maduras.

Cabeça

Com formato de ovóide; comprimento 343,7 μm (315-360) e a largura de 271,2 μm (265-275). No tagma cefálico dorsal, destacamos a cerda labro basal posterior, simples e espiniforme que na espécie apresentou o maior comprimento em relação aos demais (Tabela 6). O tubérculo antenal é duas vezes maior que os segmentos antenais (Figura 22). As outras cerdas dispostas no tagma cefálico são semelhantes à *L. scaffi*, inseridas em pequenos tubérculos.

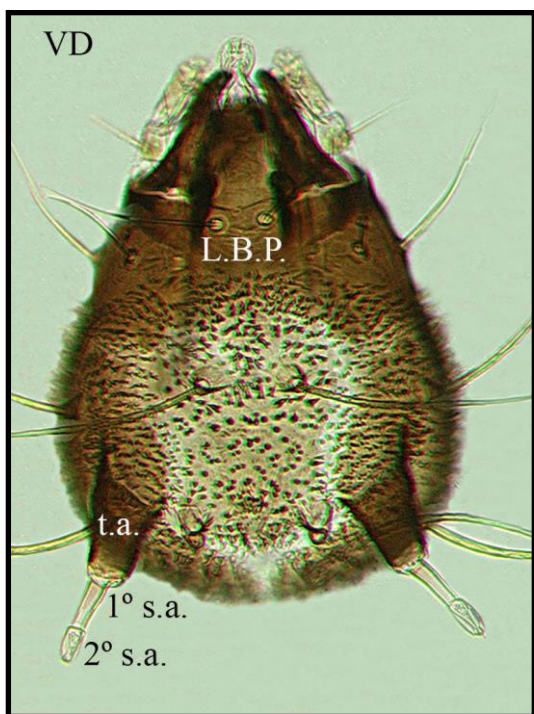


Fig. 22 – Microfotografia da cabeça de *Lutzomyia dendrophyla* mostrando o longo tubérculo antenal (**t.a.**), os 1º e 2º segmentos antenais e as cerdas labro basais posteriores (**L.B.P.**).

Antena

Os segmentos antenais das larvas de *L. dendrophyla* estão inseridos em um grande tubérculo, onde o primeiro segmento antenal é mais que a metade do segundo segmento, este apresentando sensilas campaniformes em sua base e em sua extremidade a sensila apical da antena (Figura 23 A a C). Nas medidas antenais, o tamanho médio foi de 170 μm (150-180) com o tubérculo e de 73,7 μm (70-75) sem o tubérculo.

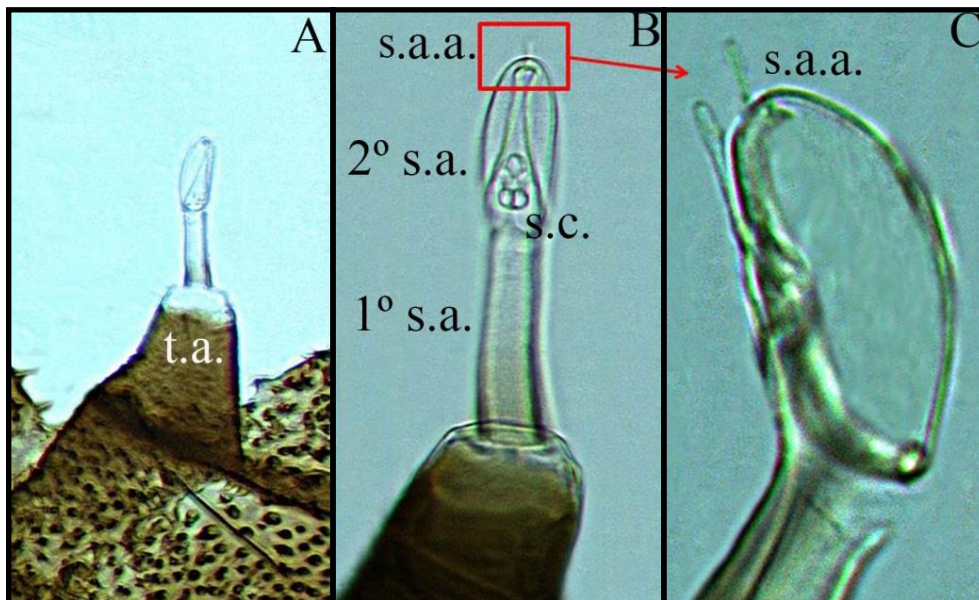


Fig. 23 – Microfotografia da antena de *Lutzomyia dendrophyla*; **A** – longo tubérculo antenal; **B** – 1º e 2º segmentos antenais, sensilas campaniformes (**s.c.**) e **C** em destaque a sensila apical da antena (**s.a.a.**).

Tórax

Para a quetotaxia do protórax, meso e metatórax e os segmentos abdominais de um a sete, as cerdas são semelhantes com pequena variação entre as espécies (Tabela 6); os espiráculos anteriores são constituídos por sete lóbulos (Figura 24).

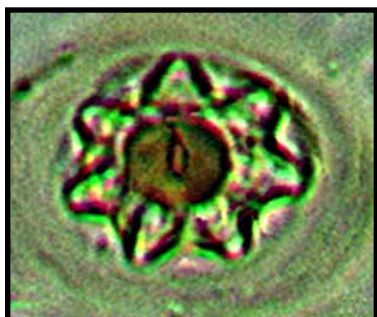


Fig. 24 – Microfotografia mostrando o espiráculo anterior de *Lutzomyia dendrophyla* formado por sete lóbulos.

O oitavo segmento abdominal, também apresenta área bastante esclerotizada com dois curtos tubérculos, onde se situam os espiráculos posteriores não foram visualizados; presença de sensila campaniforme e o padrão de manchas mencionadas anteriormente (Figura 25 B). A cerda média dorsal (8) apresentou um maior tamanho em relação às outras duas espécies (Tabela 1) (Figura 25 A). As cerdas caudais também são longas, aproximadamente do tamanho do corpo da larva (Tabela 6) (Figura 25 A).

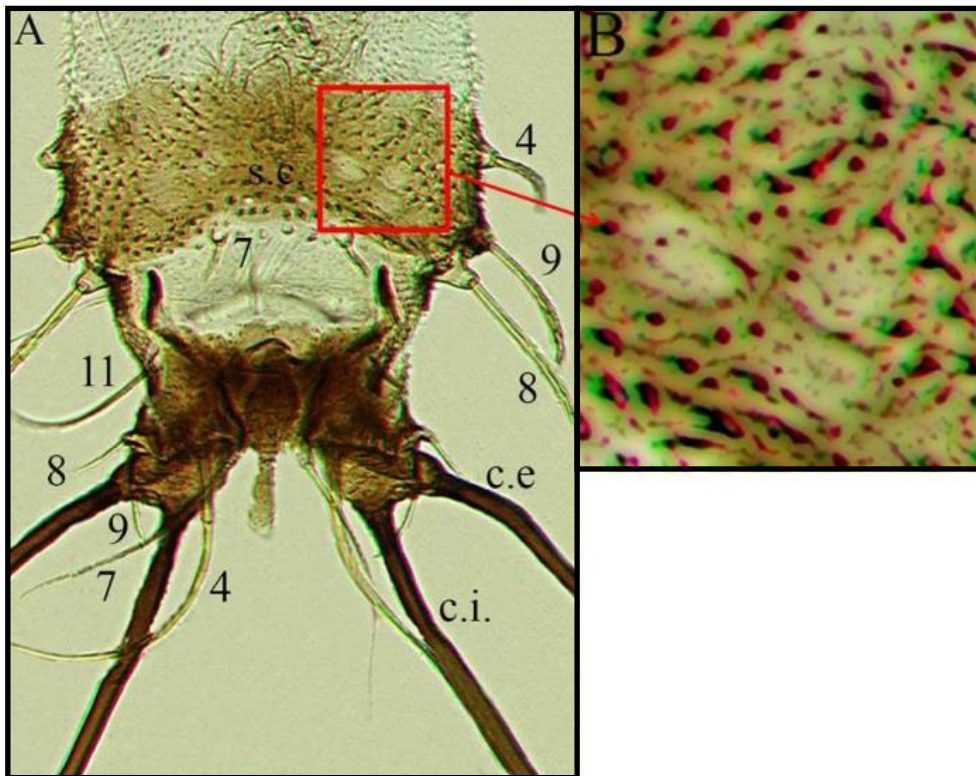


Fig. 25 A e B – Microfotografia do oitavo e nono segmentos abdominais; A – anterior ventrolateral (4), submediana dorsal (7), média dorsal (8), dorsolateral (9), cerdas esfarpeladas e os padrões de manchas circulares em destaque do oitavo segmento abdominal; o nono segmento apresenta as cerdas anteriores ventrolaterais (4), dorsais submedianas (7), pós-ventrolaterais (11), pós-ventrais (12) e ventrais submedianas (15), caudais internas (c.i.) e caudais externas (c.e.) que são simples, e as cerdas médias dorsais (8) e dorsolaterais que são esfarpeladas.

No nono segmento, as cerdas anteriores ventrolateral (4), uma cerda simples, dorsal submediana (7), simples, dorsolateral (9), farpada e pós-ventral (11), simples, foram as maiores cerdas encontradas entre as espécies. Presença do par de cerdas caudais internas e externas (Figura 25 A).

3.2.3. Pupa

No cefalotórax as cerdas verticais (3), as frontais superiores (2B), as pós-oculares superiores (4), pós-oculares médias (5), pós-oculares internas (6A), pós-oculares inferiores externas (6B), são todas espiniformes; as cerdas pré-alares (10) são encrespadas e grossas, e na região abdominal a cerda lateral anterior (8) é bífida longa (Figura 26 A a F).

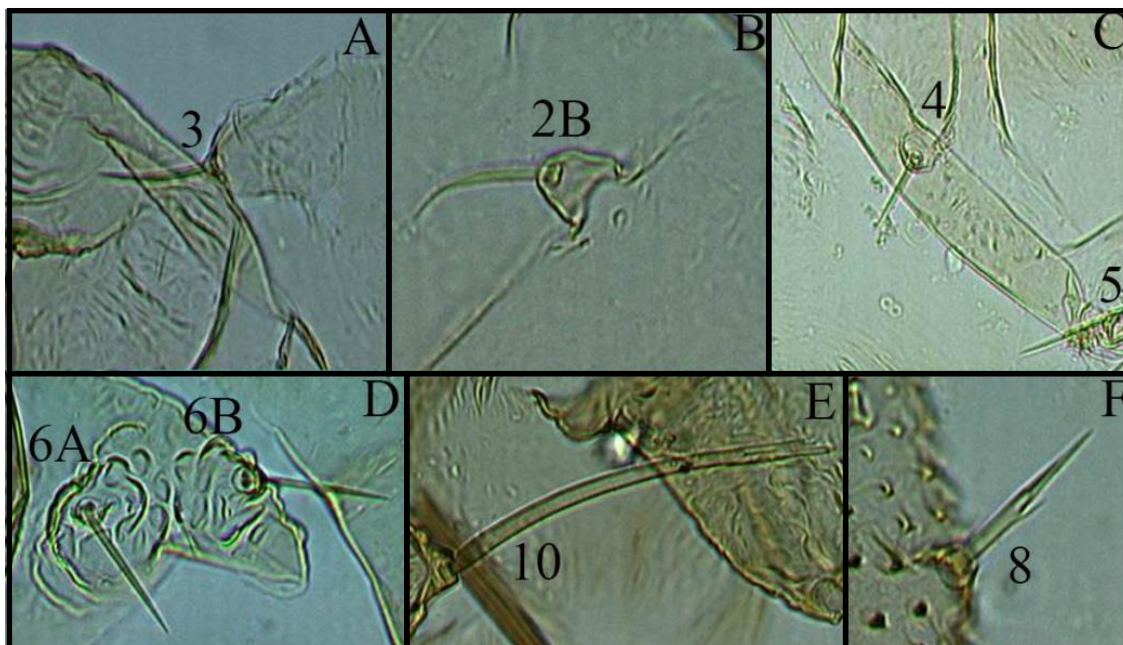


Fig. 26 - Microfotografias da quetotaxia pupal de *Lutzomyia dendrophyla* – **A** – cerda vertical (3), encrespada longa; **B** – frontal superior (2B), **C** – pós-ocular superior (4), **C** – pós-ocular média (5), **D** – pós-ocular interna (6A), **D** – pós-ocular inferior externa (6B), são todas espiniformes; **E** – pré- alares (10), encrespadas grossas e **F** – lateral anterior (8), bífida longa.

3.3. *Lutzomyia shannoni*

3.3.1. Ovo

A superfície do exocório dos ovos de *L. shannoni*, é composta por polígonos em forma de trapézio (Figura 27 A e B).

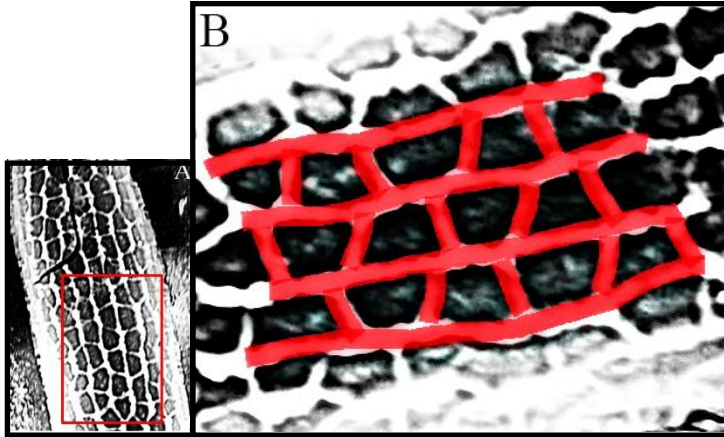


Fig. 27 – Microfotografia característica do exocório de ovo eclodido de *Lutzomyia shannoni* (A), com detalhe de formações trapezoidais destacados em vermelho (B).

3.3.2. Larva

A larva de *L. shannoni* apresentou 4,7 mm de comprimento sendo das três espécies a menor larva, porém se comparada a outras espécies descritas é maior. Descrevendo as larvas de quarto instar de *L. carmelinoi* (Ryan, Frahia, Lainson & Shaw, 1986) e *L. lenti* (Mangabeira, 1938), Pessoa *et. al.*, (2008), encontraram um tamanho médio de 3,55 mm para ambas as larvas e Ferro *et. al.*, (1998) encontraram o mesmo tamanho médio para as larvas de *L. shannoni*, 4,7 mm.

Cabeça

Com formato ovóide; comprimento 327,5 μm (315-350) e a largura de 276,2 μm (265-300). No tagma cefálico dorsal de *L. shannoni* a cerda genal média (4), apresenta tamanho diferenciado das outras duas espécies, as outras cerdas são semelhantes em tamanho e da mesma forma inseridas em pequenos tubérculos (Figura 28).

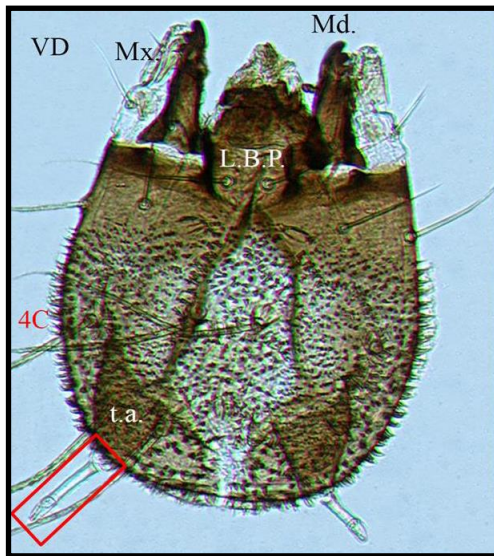


Fig. 28 – Microfotografia da cabeça de *Lutzomyia shannoni* mostrando o tubérculo antenal (**t.a.**), destacando em vermelho os segmentos antenais, onde 1º segmento é aproximadamente duas vezes maior que 2º, as cerdas labro basais posteriores (**L.B.P.**) e a cerda genal média (**4**), esfarpelada, a maior cerda das três espécies; **Md.** – mandíbula e **Mx.** - maxila cabeça.

Antena

O primeiro segmento antenal é quase duas vezes maior que o segundo segmento, onde se encontram as sensilas papiliformes e a sensila apical da antena. O tamanho médio com o tubérculo foi de 120 μm (105-130) e sem o tubérculo antenal foi de 63,75 μm (60-65) (Figura 29).

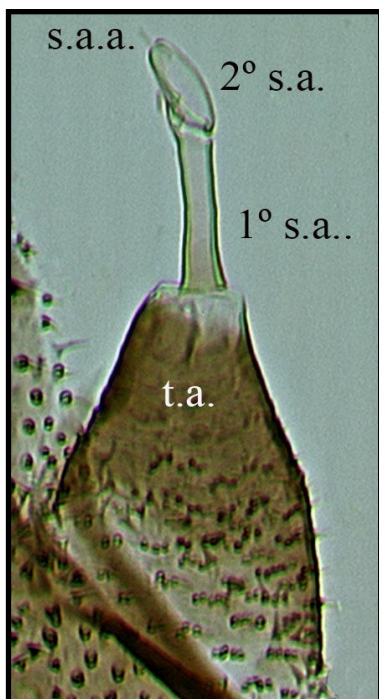


Fig. 29 – **t.a.** – tubérculo antenal de *Lutzomyia shannoni*, mostrando os dois segmentos antenais e a sensila apical da antena (**s.a.a.**).

Tórax

No protórax, encontramos a pequena cerda “4” na junção da cabeça com o tórax são destacadas as cerdas dorsais intermediárias (2), basais (10) e ventrais intermediárias (14), que na espécie apresentou o maior tamanho (Tabela 6). Os espiráculos anteriores são formados por oito lóbulos (Figura 30 A a C).

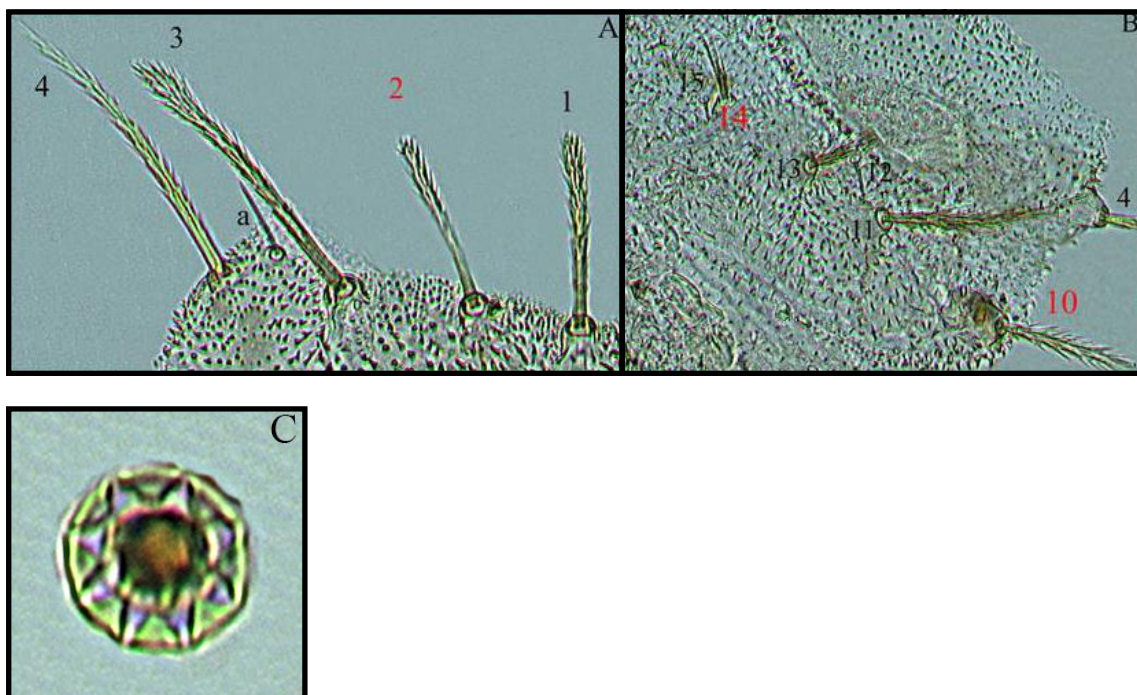


Fig. 30 – cerdas do protórax dorsal – **A** – dorsal interna (1), dorsal intermediária (2), a maior cerda apresentada para as três espécies, dorsal externa (3) e anterior ventrolateral (4), todas as cerdas esfarpeladas e cerda “a”, espiniforme; **B** – no protórax ventral as cerdas basais (10) e ventrais intermediárias (14), esfarpeladas, apresentaram o maior tamanho nas espécies; também visualizadas as cerdas pós-ventrolaterais (11), esfarpeladas, pós-ventrais (12), espiniformes, médias ventrais (13), esfarpeladas e ventral submediana (15), espiniforme; **C** – espiráculo anterior formado por oito lóbulos.

O oitavo segmento abdominal também apresenta área esclerotizada com dois curtos tubérculos, onde se situam os espiráculos posteriores formados por 14 lóbulos; presença de sensila campaniforme e o mesmo padrão de manchas apresentadas nas outras duas espécies (Figura 31 A a C).

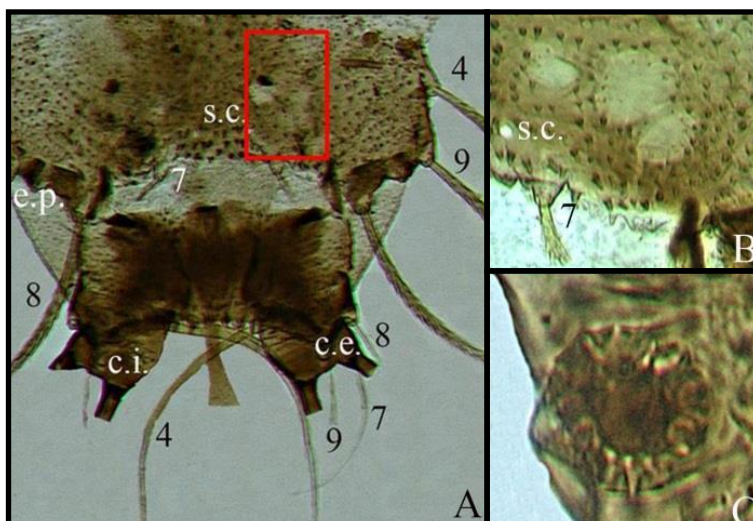


Fig. 31 – **A** – Microfotografia do oitavo e nono segmentos abdominais – cerdas anteriores ventrolaterais (**4**), submedianas dorsais (**7**), médias dorsais (**8**) e dorsolaterais (**9**), que são cerdas esfarpeladas, localização do espiráculo posterior formado por 14 lóbulos (**A** e **C**) e sensila campaniforme (**s.c.**); **B** – as manchas circulares em destaque no oitavo segmento abdominal são comuns às outras duas espécies; no nono segmento abdominal (**A**) faltam algumas cerdas, as representadas são as cerdas anteriores ventrolaterais (**4**), dorsais submedianas (**7**), caudais internas (**c.i.**) e caudais externas (**c.e.**) que são simples, e as cerdas médias dorsais (**8**) e dorsolaterais que são esfarpeladas. As cerdas caudais internas e externas aparece somente a inserção das mesmas.

No nono segmento abdominal, a cerda média dorsal (**8**) foi ligeiramente maior que nas outras duas espécies (Figura 31 **A**); as cerdas caudais internas e externas apresentaram tamanhos semelhantes aos de *L. dendrophyla*.

3.3.3. Pupa

A cerda vertical (3) no cefalotórax é simples e longa; as cerdas frontais superiores (2B), pós-oculares superiores (4) e pós-ocular média (5) são simples. As cerdas pós-oculares internas e pós-oculares inferiores externas são simples. Na região abdominal as cerdas laterais anteriores (8) são simples (Figuras 32 A a E).

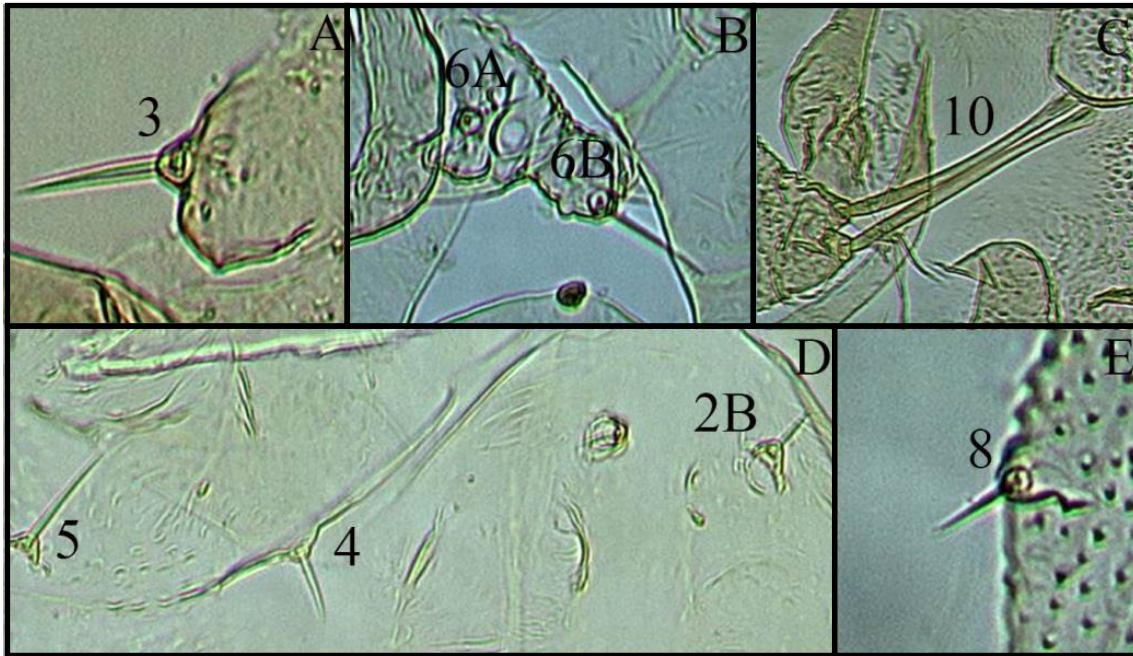


Fig. 32 – Microfotografias da quietotaxia pupal de *Lutzomyia shannoni* – **A** – cerda vertical (3), encrespada longa; **B** – frontal superior (2B), **C** – pós-ocular superior (4), **C** – pós-ocular média (5), **D** – pós-ocular interna (6A), **D** – pós-ocular inferior externa (6B), são todas espiniformes; **E** – pré- alares (10), encrespadas grossas e **F** – lateral anterior (8), espiniforme.

4. DISCUSSÃO

A ornamentação do exocório das espécies *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi*, *L. (P.) dendrophyla* e *L. (P.) shannoni*, apresentaram variação no padrão morfológico, que apesar de serem semelhantes, pode significar adaptações relacionadas ao ambiente de desenvolvimento dos ovos.

Para a quetotaxia cefálica, apesar de haver consenso que as cerdas labrais têm pouca ou nenhuma importância taxonômica (Ward 1976a; Arrivillaga *et. al.*, 1999), não foi o esperado para o nosso estudo, que mostrou a cerda labro basal posterior como um importante diferencial taxonômico para as espécies estudadas. Foram encontradas diferenças significativas entre o comprimento das cerdas labro basais em *L. dendrophyla* e *L. scaffi* ($p=0,030$), mas nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o tamanho das cerdas de *L. dendrophyla* e *L. shannoni* ($p=0,060$). Para as análises estatísticas das cerdas labro basais das larvas deflebotomíneos destas espécies, foi aplicado o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis ($H= 8,654$, $p < 0,01$). Também foi aplicado o teste Kruskal-Wallis para o tamanho das antenas, onde se encontrou diferenças significativas no tamanho das antenas das três espécies, sendo visivelmente a maior antena e o maior tubérculo encontrado em *L. dendrophyla* ($H= 9,846$, $p < 0,030$).

Para o tórax, foi encontrada diferença entre as cerdas intermediárias dorsais (2), externa dorsal (3), submediana dorsal (7) e média dorsal (8). Em relação à cerda intermediária dorsal, o maior tamanho foi encontrado em *L. shannoni*; para as cerdas externa dorsal, submediana dorsal e média dorsal os maiores comprimentos foram registrados em *L. scaffi*. Nos segmentos abdominais de um a sete, registramos a presença da cerda basal (10), cerda não encontrada nos estudos de quetotaxia feito por Ward (1976a) e Pessoa *et. al.*, (2008) (Tabela 1).

O sistema espiracular de larvas de flebotomíneos é mais desenvolvido no abdômen do que no tórax, com um pequeno par de espiráculos anteriores e outro ligeiramente maior nos posteriores (Fausto *et. al.*, 1999). Espiráculos larvais têm sido considerados como uma possível ferramenta para identificação de imaturos, podendo ser aplicado em estudos filogenéticos (Fausto *et. al.*, 1998, 1999; Pessoa *et. al.*, 2000).

Nos estudos de morfologia dos espiráculos de larvas de quarto instar das três espécies, as larvas *L. scaffi* apresentaram de sete a 10 lóbulos nos espiráculos anteriores e 16 nos

espiráculos posteriores; as larvas de *L. dendrophyla* apresentaram 7 lóbulos em seus espiráculos anteriores, não sendo visualizados os posteriores e as larvas de *L. shannoni* com oito lóbulos nos espiráculos anteriores e 14 lóbulos nos espiráculos posteriores. Fausto *et. al.* (1998), em estudo realizado sobre o sistema espiracular larval de oito espécies de larvas de flebotomíneos, mostrou uma variação no número de lóbulos nos espiráculos de *L. Young* e *L. trinidadenses* de no mínimo seis e no máximo nove papilas; no mesmo estudo para *L. longipalpis* este número variou de no mínimo 11 papilas e um máximo de 19. Números semelhantes a estes, foram encontrados por Pessoa *et. al.* (2000), em larvas flebotomíneos do Estado do Ceará, que variavam de oito a 16 papilas. Nas espécies aqui estudadas, este número foi de no mínimo sete e no máximo de 16 papilas. No oitavo segmento das larvas aqui estudadas, há a presença de uma faixa esclerotizada na larva de quarto instar, onde encontramos as sensilas campaniformes; foi observado também um padrão de manchas mais claras dispostas de forma organizada nesta região, das três espécies, provavelmente se tratando de estruturas sensoriais.

Na quetotaxia pupal, foram encontradas diferenças significativas nas formas das cerdas localizadas no cefalotórax e abdômen, e outras semelhantes na região inferior do cefalotórax onde algumas cerdas, tiveram um padrão comum para as três espécies.

5. CONCLUSÃO

As estruturas anatômicas encontradas na cápsula cefálica, tórax e segmentos abdominais das larvas, que foram utilizados para diferenciação das espécies, se mostraram bastante eficazes, assim como a utilização da quetotaxia pupal. Conclui-se, com esse estudo, que os caracteres taxonômicos utilizados foram importantes para adicionar caráter na diferenciação das larvas de flebotomíneos de espécies crípticas do subgênero *Psathyromyia* da Amazônia Central Brasileira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abonnenc, E. 1956. L'oeuf et les forms pré-imaginales de deux Phlébotomes africains: *P. antennatus* var. *occidentalis* Theodor, 1933 et *P. dubius* Parrot, Mornet et Cadenat, 1945. *Archives de l'institut Pasteur d'Algérie* 34: 518-539.
- Almeida, D.N.; Oliveira, R.S.; Brazil, B.G. & Soares, M.J. 2004. Patterns of exochorion ornaments on eggs of seven South American species of *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 41: 819–825.
- Amaral-Galvão, A.M.R. & Maia-Herzog, M. 2003. Coleção de simuliídeos (Diptera - Simuliidae) de Adolpho Lutz, sua história e importância. *História, Ciências, Saúde* 10(1): 259-71.
- Arrivillaga, J.; Navarro, J.C.; Feliciangeli, M.D. 1999. Morfología y quetotaxia del tagma cefálico larval de *Lutzomyia* França 1924 (Díptera: Psychodidae): Proposición de un sistema de nomenclatura. *Boletín de Entomología Venezolana* 14: 1-13.
- Bahia, A.C.; Secundino, N.F.; Miranda, J.C.; Prates, D.B.; Souza, A.P.; Fernandes, F.F.; Barral, A. & Pimenta, P.F. 2007. Ultrastructural comparison of external morphology of immature stages of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy. *Journal of Medical Entomology* 44(6): 903–14.
- Barretto, M.P. 1962. Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, subfamília Phlebotominae). *Revista Instituto Medicina Tropical*. São Paulo 4: 91-100.
- Brazil, R.P. & Brazil, B.G. 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Rangel, E.F., Lainson, R. *Inn*: Flebotomíneos do Brasil, editora Fiocruz, pp. 257-274.
- Coscarón, S. 1987. *El género Simulium Latreille en la región Neotropical: análisis de los grupos supraespecíficos, especies que los integran y distribución geográfica (Simuliidae, Diptera)*. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 112 p.

- Costa, W.A.; Costa, S.M.; Santos-Mallet, J.R.; Serrão, J.E.; Rangel, E.F. 2012. Eggshell as a characteristic to identify *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: hlebotominae), vectors of cutaneous leishmaniasis. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 3(1): 19-24.
- Dujardin, J.; Le Pont, F.; Matias, A. & De La Riva, J. 2005. Morphometric evidence of speciation within Bolivian *Lutzomyia aragaoi* (Diptera: Psychodidae). *Infection Genetics and Evolution* 5:362-365.
- Endris, R.G.; Young, D.G. & Perkins, P.V. 1987. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of live *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 24: 412-415.
- Fausto, A.M.; Feliciangeli, M.D.; Maroli, M.; Mazzini, M. 2001. Ootaxonomic investigation of five *Lutzomyia* species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 197-204.
- Fausto, A.M.; Taddei, A.R.; Mazzini, M. & Maroli, M. 1999. Morphology and ultrastructure of spiracles in phlebotomine sandfly larvae. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 101–9.
- Fausto, A.M.; Feliciangeli, M.D.; Maroli, M.; Mazzini, M. 1998. Morphological Study of Larval Spiracular System in Eight *Lutzomyia* Species (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 71-79.
- Feliciangeli, M.D., Castejon, O.C. & Limongi, J. 1993. Egg surface ultrastructure of eight New World phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 30: 651–656.
- Ferro, C.; Cárdenas, E.; Corredor, D.; Morales, A.; Munstermann, L.E. 1998. Life cycle and fecundity of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 195-199.
- Forattini, O.P. 1973. Entomologia Médica. IV. Psychodidae. Leishmanioses. Bartonelose. Edgard Blucher, São Paulo. 658p.

- Gemetchu, T. 1976. The biology of a laboratory colony of *Phlebotomus longipes* Parrot & Martin (Diptera: Phlebotomidae). *Journal of Medical Entomology* 12(6): 661-671.
- Guillon, N. & Sherlock, I.A. 1969. Descrição das fases imaturas do “*Phlebotomus longipalpis*” Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia* 29(3): 383-389.
- Hammer, O. & Harper, D.A.T. 2007. PAST – Paleontological Statistics. Versão 1.57
- Harbach, R.E. & Kitching, I.J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology* 23: 327–370.
- Hinton, H.E. 1969. Respiratory systems of insect eggs shell. *Annual Review of Entomology* 14: 343–368.
- Judd, D.D. 1996. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology* 21: 129–150.
- Killick-Kendrick, M. & Killick-Kendrick, R. 1991. The initial establishment of sandfly colonies. *Parasitologia* 33: 315–320.
- Leite, A.C. & Williams, P. 1996. Description of the fourth instar larva of *Lutzomyia longipalpis* under scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 9: 571–578.
- Pérez, E.J. & Ogusuku, E. 1997. Chorion patterns on eggs of *Lutzomyia* sand flies from the Peruvian Andes. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 127–133.
- Pessoa, F.A.C.; Feitosa M.A.C.; Castellon-Bermudez, E. G.; Ríos-Velasquez, C.M. & Ward, R.G. 2008. Immature stages of two species of *Evandromyia* (*Aldamyia*) and the systematic importance of larval mouthparts within Psychodidae (Diptera, Phlebotominae, Psychodinae). *Zootaxa* 1740: 1–14.
- Pessoa, F.A.C.; Queiroz, R.G. & Ward, R.D. 2000. Posterior spiracles of fourth instar larvae of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) under scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 689–691.

- Pinto, I.S.; Andrade Filho, J.D.; Santos, C.B.; Falqueto, A. & Leite, Y.R.L. 2010. Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia* subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 47: 16-21.
- Queiróz, R.G. 1995. *Phlebotomine sand flies of a leishmaniasis focus in Baturité, Brazil*. PhD thesis, London University, 224 pp.
- Sherlock, I.A. & Carneiro, M. 1963. Descrição das fases imaturas do *Phlebotomus bahiensis* Mangabeira & Sherlock, 1961 (Diptera, Psychodidae). *Separata de Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Tomo 61 – Fascículo 3*.
- Ward, R.D. 1976a. A revised numerical chaetotaxy for neotropical Phlebotomine sandfly larvae (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology* 1: 89–94.
- Ward, R.D. e Ready, P. 1975. Chorionic sculpturing of some sandfly eggs (Diptera: Psychodidae). *Journal Entomology* 50: 127-134.
- Young, D.G. & Duncan, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54:1-881.
- Ximenes, M.F.F.M.; Maciel, J.C.; Jerônimo, S.M.B. 2001. Characteristics of the Biological Cycle of *Lutzomyia evandroi* Costa Lima & Antunes, 1936 (Diptera: Psychodidae) under Experimental Conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96(6): 883-886.
- Zimmerman, J.H.; Newson, H.D.; Hooper, G.R.; Christensen, H.A. 1977. A comparison of the egg surface structure of six antropophilic phlebotomine sand flies (*Lutzomyia*) with the scanning electron microscope (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 13: 574-579.

CAPÍTULO III

“Morfometria geométrica de asas de três espécies crípticas de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barretto, 1962, (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) da Amazônia Central”

RESUMO: As fêmeas de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *scaffi*, *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *dendrophyla* e *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* são difíceis de identificar por causa de suas semelhanças morfológicas. Essas espécies ocorrem em simpatria e são consideradas como vetoras ou vetoras suspeitas de parasitos como *Leishmania*. A correta identificação de espécies de flebotomíneos é importante para estratégias de controle e vigilância. O objetivo deste trabalho é diferenciar *L. (P.) dendrophyla*, *L. (P.) scaffi* e *L. (P.) shannoni* utilizando como ferramenta a morfometria geométrica. Foram utilizadas 23 fêmeas de *L. (P.) dendrophyla*, 23 de *L. (P.) scaffi* e 20 de *L. (P.) shannoni* coletadas em campo e criadas no laboratório até F1. A asa direita das fêmeas foi montada em lâminas e fotografadas. Foram identificados oito Pontos Anatômicos de Referência (PARs) e transformados em matriz de coordenadas, utilizando o programa COOWin. O tamanho centróide foi usado para analisar a variação de tamanho da asa. A Análise Generalizada de Procrustes (GPA), o algoritmo de sobreposição, foi utilizada para analisar variáveis de forma usando o programa MOG. Dados do GPA foram usados para comparar variáveis de forma entre os grupos. Testes estatísticos foram computados pelo programa PAST 1.57. Observou-se uma diferença significativa no tamanho da asa entre as três espécies estudadas, onde *L. (P.) shannoni* mostrou o maior tamanho da asa, *L. (P.) scaffi*, o menor tamanho (H: 8,306, p <0,01) tendo *L. (P.) dendrophyla* apresentado um tamanho intermediário entre as duas espécies anteriores. As diferenças foram significativas para *L. (P.) scaffi* e *L. (P.) shannoni*, mas não para *L. (P.) dendrophyla* (p > 0,29). O mapa fatorial mostrou diferença entre as configurações das três espécies, no entanto, alguns cruzamentos foram observados entre *L. (P.) scaffi* e *L. (P.) dendrophyla*. A morfometria geométrica permitiu diferenciar as três espécies de flebotomíneos. *L. (P.) dendrophyla* não foi significativamente diferente (p > 0,29) das outras duas espécies, mas o mapa fatorial mostra claramente a diferenciação dos três grupos.

Palavras-chave: Vetor; Leishmaniose; taxonomia.

“Wing geometric morphometrics of three cryptic species of *Lutzomyia (Psathyromyia)* Barretto, 1962, (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Brazilian Amazon”

ABSTRACT: The females of *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi*, *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla* and *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni* are difficult to identify because of their morphological similarity. These species have sympatric distribution and are considered as vectors or suspected vectors of parasites such as *Leishmania*. The correct identification of sand fly species is important component for control and surveillance strategies. The aim of this work is to differentiate *L. dendrophyla*, *L. scaffi* and *L. shannoni* by geometric morphometrics methods. F1 generations females of *L. dendrophyla*, *L. scaffi* and *L. shannoni*, were collected obtained from Amazonian forest near Manaus progenitors. Right wings of the F1 females obtained were slide mounted and photographed. Eight landmarks were identified and transformed in coordinate matrix using COOWin program. Were used centroid sizes, to analyze wing size variation. Generalized Procrustes Analysis (GPA), superimposition algorithm, was used to analyze shape variables by MOG program. Data from GPA were used to compare shape variables across groups. Statistics tests were computed by PAST program 1.57. It was observed a significant difference in the wing size between three studied species where *L. (P.) shannoni* showed the higherst wing size, while *L. (P.) scaffi* was smalles. The difference was significant between those 2 species (H: 8.306, $p < 0.01$), but not in *L. (P.) dendrophyla*. Factor map showed real difference between the configurations of the three species, however some intersection was observed between *L. (P.) scaffi* and *L. (P.) dendrophyla*. Geometric morphometrics allowed differentiating the three sandfly species. *L. (P.) dendrophyla* was not significantly different ($p > 0, 29$) of the other two species, but the factorial map clearly shows the differentiation of the three groups.

Keywords: Vector; Leishmaniasis; taxonomy.

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos de metamorfose completa, isto é, com quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (quatro instares larvais), pupa e adulto (Forattini 1973). As fêmeas são hematófagas, podendo transmitir vários agentes patogênicos ao homem e outros animais (SVS 2007).

A subfamília, devido à importância sanitária, tem sido relativamente bem estudada, sendo geradas várias propostas taxonômicas (Young & Duncan 1994; Galati 2003).

O subgênero *Psathyromyia*, é composto por espécies com diferenças morfológicas bastante sutis, o que levou Young e Duncan (1994) a colocar *L. (P.) pifanoi* Ortiz, 1972 em sinonímia com *L. (P.) shannoni* (Dyar, 1929). Outras duas espécies, *L. (P.) abonnenci* (Floch & Chassignet, 1947) e *L. (P.) pestanai* (Barretto & Coutinho, 1941), são dificilmente diferenciadas morfológicamente.

O uso da pigmentação torácica para separar fêmeas de *L. (P.) scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956), *L. (P.) dendrophyla* (Manabeira Filho, 1942) e *L. (P.) shannoni*, foi primeiramente usado por Morales *et. al.*, (1982) para diferenciar flebótomos da Colômbia, quando da descrição da fêmea de *L. (P.) scaffi*.

As fêmeas são muito parecidas sendo identificadas com certa dificuldade e suas espermatecas são bastante semelhantes no que diz respeito principalmente à observação do ducto individual, ducto comum e o corpo, que apresenta um formato de cápsulas cilíndricas (Figura 33). A falta de caracteres evidentes e diferentes para separação dessas três espécies dificulta os estudos sobre biodiversidade, que poderiam ajudar a direcionar estratégias de controle, uma vez que a resolução taxonômica é crucial para esse tipo de estudo.



Fig. 33 – Formato da espermateca de fêmeas de *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla*.

A diferenciação de espécies através de caracteres morfológicos tem sido amplamente usada, mas nem sempre é suficiente, especialmente em se tratando de espécies crípticas. Atualmente existem novas técnicas, como a morfometria geométrica, que permitem a diferenciação entre espécies de vários grupos taxonômicos distintos. A morfometria geométrica permite analisar a forma das estruturas. Os pontos anatômicos de referência (PARs) são transformados em coordenadas cartesianas e superpostos usando a Análise Generalizada de Procrustes – AGP, a partir do método dos mínimos quadrados (Rohlf & Marcus 1993; Slice 2007) e um estimador de tamanho, o Tamanho Centróide é extraído, as variáveis de conformação são obtidas e as coordenadas iniciadas são transformadas em coordenadas residuais que serão submetidas posteriormente a análises multivariadas.

A morfometria geométrica tem sido bastante utilizada em entomologia como, por exemplo, na diferenciação dos membros do complexo de espécies de *Simulium damnosum* Theobald (Diptera), Krüger & Garms (1999) e para diferenciação de populações silvestres e domésticas de *Panstrongylus geniculatus* (Jaramillo *et. al.*, 2002). Esta ferramenta também tem sido usada na identificação de *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*, moscas que causam miíases e ocasionam perdas potenciais aos criadores de gado, realizado por Lyra *et. al.*, (2010), para programa de controle.

Em estudo com Phlebotominae, também foi usado à variação de forma e tamanho das asas, em complexo de espécies, tais como: *Lutzomyia longipalpis* (De-LA-Riva *et.al.*, 2001);

Phlebotomus papatasi, transmissor de *Leishmania major* no Marrocos (Prudhomme *et. al.*, 2012); várias espécies isomórficas do subgênero *Lutzomyia* ou grupo *Verrucarum* (Añez *et. al.*, 1997); no complexo de espécies do grupo *Aragaoi* (Dujardin *et. al.*, 2005); em grupo do subgênero *Micropygomyia* e grupo do subgênero *Psathyromyia* (Christensen 1972; Morales *et. al.*, 1982); em duas populações de *L. ovallesi* da Venezuela (Nieves *et. al.*, 2012) mostrando que a morfometria geométrica serviu para separar essas espécies.

Este método foi útil em Hymenoptera, Apidae, na separação de espécies, subespécies e populações de abelhas com ferrão e usado por vários autores (Francoy *et. al.* 2006, 2008; Francisco *et. al.* 2008; Tofilski 2008), e de abelhas sem ferrão por Francoy *et. al.*, (2009).

A técnica de morfometria geométrica foi aplicada neste estudo, para diferenciar as três espécies crípticas e dendrófilas de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*), conhecidas na Amazônia Central, *L. dendrophyla*, *L. scaffi* e *L. shanoni*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Áreas de coleta

As coletas foram realizadas em área de floresta de terra firme, na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – UFAM – BR 174, Km 38 (2° 38' 59.46" S, 60° 3' 16.47" W), Manaus, Amazonas.

2.2. Coleta de flebotomíneos

Os flebotomíneos foram coletados com aspiradores mecânicos, oriundos de armadilhas do tipo CDC modificadas, nas quais a tela de proteção e a lâmpada são retiradas para aumentar a abertura de sucção, onde uma gaiola de filó é atrelada para a contenção dos flebotomíneos. A aspiração foi realizada em base de árvore, em horário diurno, no período do fim da manhã, momento em que maioria dos flebotomíneos dendrofílicos está próxima à liteira (Figura 34).



Fig. 34 – Coleta em base de árvore próxima à liteira com aspirador mecânico.

2.3. Obtenção de F1 em laboratório

Os flebotomíneos coletados foram transportados em gaiolas para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ). As fêmeas que estavam ingurgitadas ou grávidas foram separadas em potes apropriados para ovipostura individual e mantidas em estufas de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.). Após a eclosão, os ovos foram transferidos para potes de criação com camada de gesso no

fundo, as larvas foram mantidas de acordo com o método de Killick-Kendrick *et. al.*, (1973). A técnica consiste em manter as formas imaturas em potes de plástico com tampa coberta por filó, com o fundo cortado e revestido de gesso, para a manutenção da umidade. Os potes foram mantidas em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.), com controle de temperatura, sendo os imaturos alimentados com ração para larvas de peixe, extrusada e moídas, com 55% de proteína bruta, misturada com fezes. Um exemplar macho foi retirado, colocado em água com detergente para retirada do excesso de cerdas e posteriormente montado em lâmina com fluido de Berlese.

Para a identificação dos exemplares foi utilizada a chave proposta por Young & Duncan (1994).

As fêmeas adultas emergidas foram separadas por espécie, utilizando os caracteres descritos por Young & Duncan (1994). As asas das fêmeas foram montadas em lâmina para análise morfométrica.

2.4. Montagem e fotografia de asas

Para estudos de morfometria geométrica foram utilizadas as asas direitas das fêmeas, para evitar o efeito de alometria. As asas foram retiradas por meio de dissecação na base alar, colocadas em microtubos com detergente e misturadas no Vórtex por um minuto para retirada do excesso de pelos. Após este procedimento foram lavadas em água e montadas entre lâmina e lamínula com fluido de Berlese. Foram utilizadas: 23 asas de *L. dendrophyla*, 23 asas de *L. scaffi* e 20 asas de *L. shannoni*.

As imagens das asas foram obtidas utilizando máquina fotográfica digital da marca JVC – 3 CCD, acoplada a um microscópio óptico trinocular Leica DM 1000, com objetiva de 4x, e um computador, sendo utilizado o programa Auto Montage 4.0 (Syncroscopy).

Em cada asa utilizou-se **oito pontos anatômicos de referência** (PARs) do tipo I, que são de fácil identificação, localizados na junção de dois ou mais tecidos, como intersecção das veias alares. A junção dos PARs, que forma um polígono (Bookstein 1991). Os pontos foram selecionados na intersecção das veias, na parte hialina e na sua borda. Os seguintes PARs foram utilizados: (1) conexão R_1 com Costa; (2) Extremidade distal de R_3 ; (3) Bifurcação Proximal do Setor Radial [conexão de R_4 com R_2]; (4) Bifurcação de M_2 com M_1 ; (5) Extremidade distal de M_4 – margem; (6) Extremidade distal de M_2 – margem; (7) Extremidade distal de R_5 – margem; (8) Extremidade distal de R_3 – margem (Figura 35).

Para obtenção das coordenadas dos PARs foi utilizado o programa TPSDIG2, versão 2.12 (Rohlf 2008), para análise de variações de forma e a forma consenso dentro de uma amostra foi utilizado o programa TPSRelw (Relative Warps) versão 1.42 (Rohlf 2005) para se observar a dispersão dos indivíduos no espaço. No programa MOGWin (**M**Orfometria **G**eometrica) (Dujardin 2002) foram feitas as **Análises Generalizadas de Procrustes** (AGP) (Adams *et. al.*, 2004), onde os marcos anatômicos dos diferentes espécimes foram sobrepostos, ajustando a forma da asa a um tamanho único sobre um estimador de tamanho chamado de **tamanho do centróide**, no programa BACWin (Rohlf 2005), foram realizadas as **Análises dos Componentes Principais** (ACP), para a obtenção do mapa fatorial. Com o programa PAST (Paleontological Statistics) versão 1.57 (Hammer & Harper 2007) foram feitas análises multivariadas como Análise de Componentes Principais e aplicado o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis para verificar se haveria uma diferença significativa da forma das asas entre as populações estudadas.

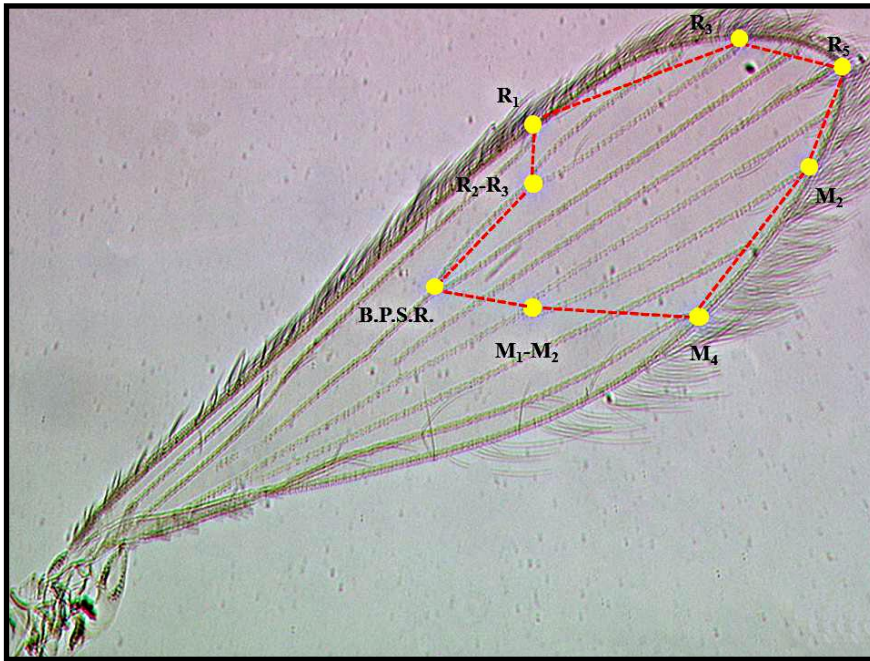


Figura 35. Asa direita de fêmea de flebotomíneo, ilustrando a posição dos pontos anatômicos de referência (PARs) – R_1 = conexão da veia Radial com a veia Costa; R_3 = extremidade distal da veia Radial 3; B.P.S.R. (Bifurcação Proximal do Setor Radial) – conexão da veia Radial 4 com a veia Radial 2; Bifurcação da veia Média 2 com a veia Média 1; Extremidade distal da veia Média 4; Extremidade distal da veia Média 2; Extremidade distal da veia Radial 5; Extremidade distal da veia Radial 3.

3. RESULTADOS

Para o estudo foram utilizadas 23 asas de *L. scaffi*, 23 de *L. dendrophyla* e 20 de *L. shannoni*, e oito PARs. As análises mostraram as deformações das configurações das asas (Figura 36) e diferença significativa no tamanho da asa entre as espécies, sendo que *L.shannoni* foi significativamente maior que *L.scaffi* ($p < 0,01$). Por outro lado, *L. dendrophyla* não foi diferente das outras espécies ($p > 0,29$) (Figura 37).

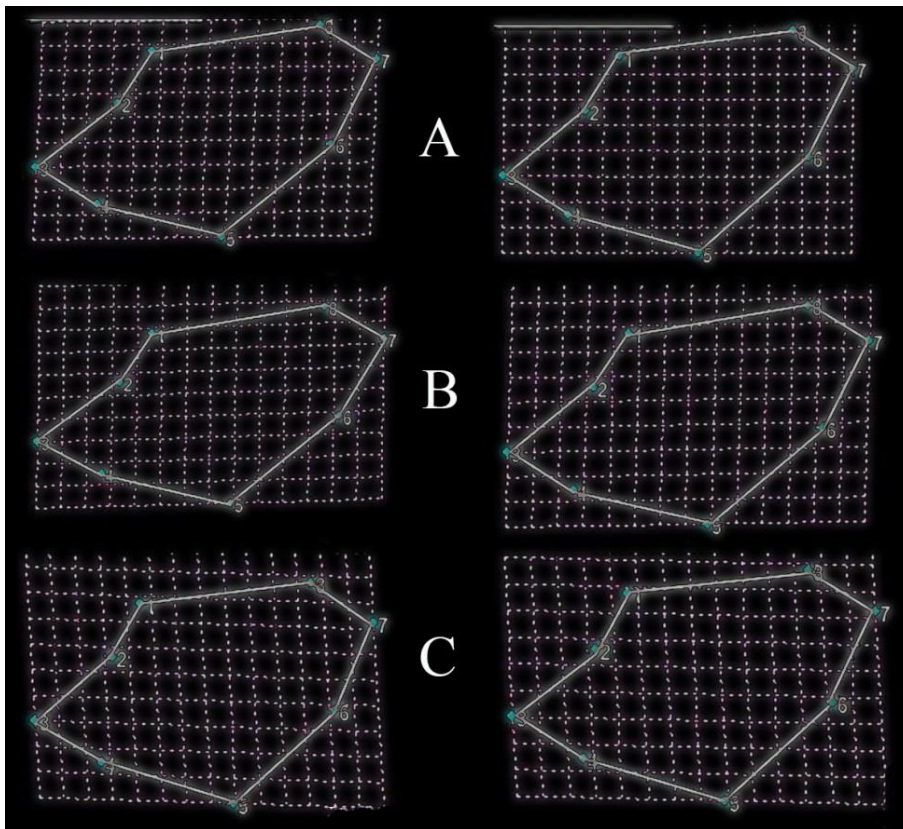


Fig. 36 – Principais deformações das configurações das asas das fêmeas de *Lutzomyia scaffi*, *Lutzomyia dendrophyla* e *Lutzomyia shannoni*.

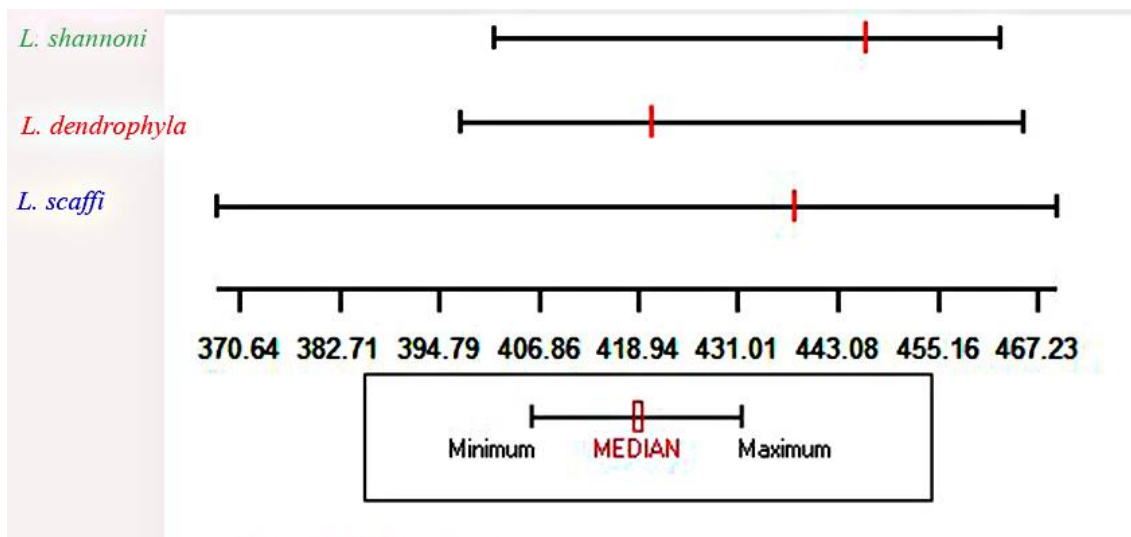


Fig. 37 – Variação do tamanho centróide das fêmeas de *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni*, *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla* e *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* durante uma geração.

O teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis (*apud* Hammer & Harper), mostrou haver diferença significativa entre *L. shannoni* e *L. scaffi* (H: 8,306, $p < 0,01$), mas não entre *L. shannoni* e *L. dendrophyla*.

O mapa fatorial (Figura 38) mostrou que houve três grupos formados de acordo com as variações das configurações das asas dos flebotomíneos estudados, no entanto, algumas sobreposições parciais foram observadas entre *L. scaffi* e *L. dendrophyla*. A morfometria geométrica permitiu a formação de três grupos, correspondentes às três espécies estudadas. *L. dendrophyla* não foi significativamente diferente de *L. scaffi* (H: 1,135, $p > 0,2$) e de *L. shannoni* (H: 1,665, $p > 0,2$), entretanto o mapa fatorial mostra claramente uma diferenciação entre os três grupos.

A análise dos componentes principais mostrou a contribuição dos dois primeiros componentes na variação da forma da asa (PC1= 50,89% e PC2= 16,46%), respectivamente.

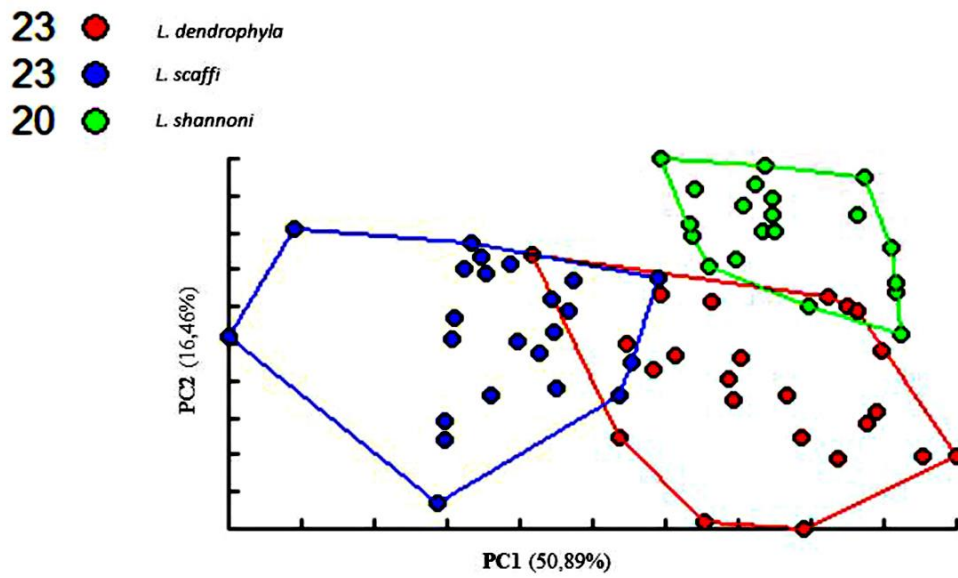


Fig. 38 – Mapa fatorial baseado na análise dos componentes principais da variação da forma das asas de *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi*, *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla* e *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni*. Os pontos dentro dos polígonos representam os indivíduos de cada espécie.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo morfométrico comparativo das três populações de fêmeas de *L. scaffi*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni*.

A correta identificação das espécies é essencial para o reconhecimento dos vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose, bem como para auxiliar no direcionamento de estratégias de controle dessa doença.

Nas análises do tamanho centróide foram encontradas diferenças significativas nos tamanhos das asas das três espécies, sendo a asa de *L. shannoni* a maior e *L. scaffi* a menor.

Através da análise do mapa fatorial encontramos diferenças na forma das asas das três espécies, mostrando a formação de três grupos bem definidos, porém o teste estatístico mostra haver diferença somente entre *L. shannoni* e *L. scaffi*. As três espécies habitam o mesmo ecótopo. Em relação ao tamanho, são maiores que outros flebotomíneos, a duração do ciclo de vida de *L. scaffi* e *L. shannoni* se assemelha, girando em torno de 40 dias, e é provável que seja o mesmo período para *L. dendrophyla*. As fêmeas adultas possuem as pleuras do tórax com pigmentação semelhante, diferente de *L. scaffi* que possui o tórax bem pigmentado, microscopicamente as spermatecas são parecidas possuindo um formato cilíndrico; na análise do átrio genital nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o tamanho das estruturas dos átrios de *L. dendrophyla* e *L. shannoni*.

Os resultados deste estudo reforçam que esta metodologia é útil, afirmação feita por vários autores que estudaram flebotomíneos e também utilizaram a morfometria geométrica das asas para determinação de complexos de espécies deste grupo de Diptera, Psychodidae, em diversas regiões, tais como:

De La Riva *et. al.*, (2001), conseguiram separar populações do complexo *Lutzomyia longipalpis*, vetoras e não vetoras de *Leishmania chagasi* na Bolívia. Em estudos realizados na Turquia com quatro espécies do gênero *Phlebotomus*, *Phlebotomus sergenti*, *P. papatasi*, *P. tobbi* e *P. similis*, Aytakin *et. al.*, (2007), utilizando a morfometria geométrica, examinaram flebotomos de ambos os sexos e verificaram que apesar de existir três faixas montanhosas que serviriam de barreira geográfica, estas não foram suficientes para impedir o fluxo gênico entre as populações locais de flebotomíneos, razão pela qual não foram encontradas diferenças significativas no tamanho das asas nas espécies analisadas; Dvorak *et. al.*, (2006), trabalharam com duas colônias originárias da Turquia e de Israel, acasalando machos de flebotomíneos

turcos com fêmeas israelenses e machos israelenses com fêmeas turcas, conseguiram híbridos viáveis formando um clado intermediário entre os parentais e mostraram não haver nenhuma barreira reprodutiva geográfica, por outro lado a análise da morfometria geométrica revelou diferenças significativas na forma das asas entre as colônias.

Prudhomme *et. al.*, (2012) registraram avariação de forma e tamanho das asas de *Phlebotomus papatasi* em regiões de transmissão de *Leishmania major* no Marrocos; Nieves *et. al.* (2012), mostraram resultados significativos entre duas populações de *L. ovallesi* da Venezuela, onde as asas das fêmeas criadas em laboratório se mostraram menores dos que as silvestres.

Cazorla (2009) que separou duas espécies crípticas de flebotomíneos *Lutzomyia* do subgênero *Helcocyrtomyia*, mostrando diferenças bastante significativas entre *L. ceferinoi* e *L. erwindonaldi*.

Usando os dados morfométricos obtidos, conseguimos separar as fêmeas dessas espécies crípticas pelo tamanho centróide, onde *L. shannoni* apresentou a maior mediana; em relação às médias de *L. dendrophyla*, estas se assemelham com as médias apresentadas por *L. shannoni*, porém a sua mediana foi a menor das três espécies; *L. scaffi* apresentou as menores e maiores médias no tamanho das asas.

O teste estatístico nos mostrou diferenças significativas apenas entre duas das espécies: *L. shannoni* e *L. scaffi*; entretanto o mapa fatorial apresentou três grupos bem definidos, mesmo com interseções entre *L. scaffi* e *L. dendrophyla* e *L. dendrophyla* e *L. shannoni*. Para corroborar com esses resultados, foi realizada a análise do átrio genital dessas fêmeas, e seguramente, pelo tamanho do átrio, o tamanho da furca e a largura do átrio, além da disposição dos espinhos, tratam-se de três espécies distintas que habitam o mesmo ecótopo.

Conclui-se com esse estudo, que o uso da morfometria geométrica é útil na separação de algumas espécies crípticas de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*), e que esta ferramenta pode ser de grande auxílio para diferenciar espécies taxonômicas difíceis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D.C.; Rohlf, F.J. & Slice, D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Añez, N.; Valenta, D.; Cazorla, D.; Quicke, D.; Feliciangeli, M. 1997. Multivariate analysis to discriminate species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae): *Lutzomyia townsendi*, *L. spinicrassa* and *L. young*. *Journal of Medical Entomology* 34(3): 312-316.
- Aytekin, A.M.; Alten, B.; Caglar, S.S.; Ozbel, Y.; Kaynas, S.; Simsek, F.M.; Kasap, O.E.; Belen, A. 2007. Phenotypic variation among local populations of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southern Turkey. *Journal Vector Ecology* 32(2): 226-34.
- Barretto, M.P. 1962. Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, subfamília Phlebotominae). *Revista Instituto Medicina Tropical*. São Paulo 4: 91-100.
- Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data. Geometry and Biology*. Cambridge University Press: New York.
- Cazorla, D. 2009. Multivariate morphometric differentiation between females of two cryptic species of *Lutzomyia* subgenus *Helcocyrtomyia* (Diptera: Psychodidae). *Revista Colombiana de Entomologia* 35(2): 197-201.
- Cazorla, D. & Acosta, M. 2003. Multivariate morphometric discrimination among three species of *Lutzomyia* subgenus *Micropygomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 40(6): 750-754.
- Christensen, H.A. 1972. Check list of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Panama including two species not previously reported. *Mosquito News* 32: 88-89.
- De La Riva, J.; Le Pont, F.; Ali, V.; Matias, A.; Mollinedo, S.; Dujardin, J.P. 2001. Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 1089-1094.

- Dujardin, J.; Le Pont, F.; Matias, A. & De La Riva, J. 2005. Morphometric evidence of speciation within Bolivian *Lutzomyia aragaoi* (Diptera: Psychodidae). *Infection, Genetics and Evolution* 5:362-365.
- Dujardin, J.P. 2002a. MOGwin. Institut de Recherches pour le Developpement (IRD, France).
- Dvorak, V.; Aytakin, A.M.; Alten, B.; Skarupova, S.; Votypka, J.; Volf, P. 2006. A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). *Journal of Vector Ecology* 31: 229-238.
- Dyar, H.G. 1929. The present knowledge of the American species of *Phlebotomus* Rondani (Diptera, Psychodidae). *American Journal of Hygiene* 10: 112-114.
- Forattini, O.P. 1973. Entomologia Médica. IV. Psychodidae. Leishmanioses. Bartonelose. Edgard Blucher, São Paulo. 658p.
- Francisco, F.O.; Nunes-Silva, P.; Francoy, T.M.; Wittmann, D.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Arias, M.C.; Morgan, E.D. 2008. Morphometric, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity: an example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux* 55: 231–237.
- Francoy, T.M.; Silva, R.A.O.; Nunes-Silva, P.; Menezes, C.; Imperatriz-Fonseca, V.L. 2009. Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphometry. *Genetics and Molecular Research* 8: 207–214.
- Francoy, T.M.; Wittmann, D.; Drauschke, M.; Müller, S.; Steinhage, V.; Bezerra-Laure, M.A.F.; De Jong, D.; Gonçalves, S.L. 2008. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie* 39: 488–494.
- Francoy, T.M.; Prado, P.R.R.; Gonçalves, L.S.; Costa, L.D.; De Jong, D. 2006. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie* 37: 91-97.
- Galati, E.A.B. 2003. Classificação de Phlebotominae. In E.F. Rangel, R. Lainson, *Phlebotomineos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-51.

- Hammer, O & Harper, D.A.T. 2007. PAST – Paleontological Statistics. Versão 1.57
- Jaramillo, N.O.; Castillo, D.; Wolf, M.E. 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 667-673.
- Killick-Kendrick, R.; Leaney, A.J. & Ready, P.D. 1973. A laboratory culture of *Lutzomyia longipalpis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 63: 434.
- Krüger, A. & Garms, R. 1999. Morphometric characterization of members of the *Simulium damnosum* Theobald complex (Diptera: Simuliidae) from East and West Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 93(7): 753-761.
- Lyra, M.L.; Hatadani, L.M.; de Azeredo-Espin, A.M.L. & Klaczko, L.B. 2010. Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. *Bulletin of Entomological Research* 100: 19-26.
- Morales, A.; Rodrigues, M.C. & Ibagos, A.L. 1982. Description de la hembra de *Lutzomyia scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956) (Diptera, Psychodidae). *Biomédica Bogotá* 2: 17-21.
- Nieves, E.; Sánchez, Y.; Sánchez, H.; Rondón, M.; González, N. & Carrero, J. 2012. Sandfly saliva of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) as a possible marker for the transmission of *Leishmania* in Venezuela Andes region. *Journal Vector Borne Diseases* 49: 8-14.
- Prudhomme, J.; Gunay, F.; Rahola, N.; Ouanaimi, F.; Guernaoui, S.; Boumezzough, A.; Bañuls, A.L.; Sereno, D.; Alten, B. 2012. Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. *Journal of Vector Ecology* 37 (1).
- Rohlf, F.J. 2008. tpsDIG, digitize landmarks and outlines. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J. 2005b. TPSRelw for Windows v. 1.42. Stony Book, NY, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.

- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 129-132.
- Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS – Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007 – 2ª Ed., Brasília.
- Slice D.E. 2007. A survey of the Statistical Theory of Shape. *Review of Anthropology* 261p.
- Tofilski, A. 2008. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie* 39: 558–563.
- Young, D.G. & Duncan, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54:1-881.

CAPÍTULO IV

“O átrio genital de fêmeas de três espécies de *Lutzomyia* (França, 1924) crípticas, de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do subgênero *Psathyromyia* (Barretto, 1962) da Amazônia Central”

RESUMO: Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos com grande diversidade de espécies e devido ao hábito hematofágico das fêmeas, várias espécies são incriminadas como vetores de diversos agentes etiológicos de importância médico-veterinária. A subfamília, devido à importância sanitária, tem sido relativamente bem estudada quanto à sistemática, gerando várias propostas taxonômicas. Flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* França, e subgênero *Psathyromyia* Barretto, possuem importância em saúde pública por serem vetores de arbovírus como o vírus da estomatite vesicular e por serem suspeitas de transmitir diversos protozoários tripanossomatídeos (Kinetoplastidae, Tripanosomatidae). Os machos devido à diferença morfológica da estrutura da genitália externa são identificados com facilidade, porém, as fêmeas de algumas espécies de *Psathyromyia* são extremamente parecidas, sendo identificadas por caracteres por vezes duvidosos. Isto implica na dificuldade de incriminação das espécies que realmente estejam participando na manutenção do ciclo de tripanossomatídeos como as leishmânias em humanos, causadoras de leishmaniose e, por conseguinte quanto a decisões de medidas de controle. O significado taxonômico da armadura do átrio genital de flebotomíneos foi proposto primeiramente por Madulo-Leblond *et. al.*, (1991). Desde então, apenas poucos estudos foram feitos sobre a importância taxonômica do átrio nas espécies. O átrio é uma estrutura quitinosa com a forma de estribo, com uma membrana fina tendo uma armadura com espinhos pequenos entre os braços da furca. Ele está localizado no sentido da entrada do duto de ovipostura e a membrana de átrio liga à abertura do duto (s) dutos da espermateca. O objetivo deste estudo foi o de separar as espécies crípticas de fêmeas do subgênero *Psathyromyia*, usando as estruturas do átrio genital como caráter taxonômico. Fêmeas de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *dendrophyla*, *L. (P.) scaffi* e *L. (P.) shannoni* foram obtidas de colônias de laboratório, criadas a partir de adultos coletados originalmente em floresta

próximas de Manaus – Amazonas, Brasil. As fêmeas foram dissecadas e os três últimos segmentos tergais do abdome foram separados e colocados em Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% por um período de 24 horas. As amostras foram lavadas em ácido acético a 10% em seguida lavadas em água, e colocadas em glicerina para dissecação em um microscópio estereoscópico. Estiletes foram então usados para separ o tegumento e assim expor o átrio e, em seguida, foram montados em lâmina, fotografados e medidos o comprimento da furca, o comprimento total do átrio, a largura da parte interna do átrio e descritas formas e agrupamentos dos espinhos. Para o estudo nove lâminas foram montadas e obtido o átrio de cada espécie. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa PAST. Os arranjos dos espinhos variaram para cada espécie estudada: para *L. (P.) dendrophyla*, as fileiras foram formadas de um a três grandes espinhos formando uma coluna de fileiras na membrana. A armadura do átrio de *L. (P.) scaffi* tem de três a seis espinhos formando um pente em uma faixa horizontal no meio da membrana do átrio. *L. (P.) shannoni* tem pentes de três a seis espinhos curtos no meio da membrana e grandes espinhos nas bordas laterais da membrana do átrio, sem formar pentes. Foi encontrada uma diferença significativa entre o comprimento da furca, o comprimento total do átrio e a largura interna do átrio em *L. (P.) dendrophyla* e *L. (P.) scaffi* ($p=0,0004$), ($p=0,0005$) e ($p=0,009$) e *L. (P.) scaffi* e *L. (P.) shannoni* ($p=0,007$), ($p=0,0009$) e ($p=0,001$); nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o tamanho das estruturas dos átrios de *L. (P.) dendrophyla* e *L. (P.) shannoni*. Foi constatada que o átrio genital foi uma ferramenta útil para distinguir algumas espécies crípticas de fêmeas de *Psathyromyia*.

Palavras-chave: morfologia; taxonomia; Amazônia.

“The female genital atrium of three cryptic *Lutzomyia* (França, 1924) species of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) of the subgenus *Psathyromyia* (Barretto, 1962) from Central Amazon”

ABSTRACT: The phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are insects with high diversity of species and due to haematophagic habit of the females, several species are incriminated as vectors of some etiologic agents of medical and veterinary importance. The subfamily has been relatively well studied systematic and several taxonomic proposals were generated. The sand flies of the genus *Lutzomyia* França, and subgenus *Psathyromyia* Barretto have public health importance because they are vectors of arboviruses such as vesicular stomatitis virus and are suspected of transmitting several trypanosomatid protozoa (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae). The males are easily identified due to the morphological difference of the structure of the external genitalia. However, females of that subgenus are extremely similar, being identified with dubious morphological characters. This fact implies the difficulty of species incrimination that are actually involved in the maintenance cycle of trypanosomes as leishmaniasis in humans or sylvatic mammals in Amazon Basin. The taxonomic importance of the armature in genital atrium of sand flies was first examined by Madulo-Leblond *et al.*, (1991). Then, just very few studies about taxonomic importance of atrium had been done. The atrium is a chitinous structure shaped like a wish-bone, with a thin membrane bearing an armature with small spines between the arms of the furca. It is located towards the entrance of the oviposition duct and the atrium membrane connects to the opening of the spermathecal duct. The aim of this study was to separate cryptic female species of the subgenus *Psathyromyia*, using the structures of genital atrium as a taxonomic character. Lab reared females of *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla*, *L. (P.) scaffii* and *L. (P.) shannoni* were dissected as a followed to isolate the genital atrium and spermathecae. The last tergal three segments of the abdomen were separated and placed on Potassium Hydroxide of 10% (KOH) for a period of 24 hour. The samples were washed in 10% acetic acid, water and placed in glycerin for dissection on a stereoscopic microscope. Entomological pins were then used to separate them ventrally and thus expose the atrium and next the atrium slide mounted and photographed and measured the length of the furca, total length of the atrium, width of inner part of the atrium and the shape of the spines. Statistical

analyses were done by PAST program. Nine slide mounted atrium of each studied species were obtained. The arrangement of the spines varied for each studied species: To *L. (P.) dendrophyla*, the spines were large and formed one to three spine combs forming rows in the membrane. The *L. (P.) scaffi* armature has three to six spines combs forming a horizontal stripe in the middle of the atrium membrane. *L. (P.) shannoni* has combs of three to six short spines in the middle of the membrane and large individual spines in the lateral borders of the atrium membrane. We found a significant size difference between the length of the furca, total length of the atrium and the internal width of the atrium in *L. (P.) dendrophyla* and *L. (P.) scaffi* ($p=0,0004$), ($p=0,0005$) and ($p=0,009$) and *L. (P.) scaffi* and *L. (P.) shannoni* ($p=0,007$), ($p=0,0009$) and ($p=0,001$); none significant differences were found between the size of the atria structures to *L. (P.) dendrophyla* and *L. (P.) shannoni*. We concluded that the genital atrium is an interesting and useful tool to distinguish in some cases, cryptical female species of *Psathyromyia*.

Keywords: morphology; taxonomy; Amazon.

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos holometábolos de pequeno porte, apresentando quatro fases de desenvolvimento sendo ovo, larva (quatro instares larvais bem definidos), pupa e adulto (Foratini 1973). Várias espécies são incriminadas como vetores de vários agentes etiológicos de importância médico-veterinária (SVS 2007).

A subfamília, devido à importância sanitária, tem sido relativamente bem estudada, sendo geradas várias propostas taxonômicas (Young & Duncan 1994; Galati 2003).

Existe um alto índice de diversidade nos flebótomos do gênero *Lutzomyia* França, e existem várias espécies suspeitas de serem na verdade espécies crípticas (Young e Duncan 1994; Dujardin *et. al.*, 2005; Pinto *et. al.*, 2010) e dentro deste gênero, o subgênero *Psathyromyia* Barretto, é composto por espécies com diferenças morfológicas bastante sutis. As fêmeas de *L. scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956), *L. dendrophyla* (Mangabeira-Filho, 1942) e *L. shannoni* (Dyar, 1929) são espécies de *Psathyromyia* muito semelhantes em suas estruturas da morfologia externa, bem como os caracteres relacionados com as espermatecas.

Essas espécies por se abrigarem durante o dia em troncos de árvores são consideradas como dendrofílicas e relativamente fáceis de serem capturadas em coletas na base dessas árvores. Outras também dendrofílicas da fauna Amazônica, *L. (P.) abonnenci* e *L. (P.) punctigeniculata* são encontradas raramente, devido a pouca densidade de suas populações na região (Guerra *et. al.*, 2006; Silva *et. al.*, 2007).

As fêmeas de *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, são suspeitas de transmitir diversos protozoários tripanossomatídeos (Kinetoplastida) entre eles *Endotrypanum shanudinni* (Mesnil & Brimont 1908) (Lainson *et. al.*, 1979; Le Pont *et. al.*, 1980; Arias *et. al.*, 1985; Young *et. al.*, 1987; Rogers *et. al.*, 1988; Rowton *et. al.*, 1991). Em experimento de laboratório foi comprovado que *L. dendrophyla* é uma espécie suscetível à infecção por *Leishmania amazonenses* (Ryan *et. al.*, 1986). Nos Estados Unidos, *L. shannoni* é incriminada como um importante vetor do vírus da estomatite vesicular (VSV) (Comer *et. al.*, 1990, 1991, 1994).

O uso da pigmentação torácica para separar fêmeas de *L. scaffi*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, foi primeiramente usado em estudos de flebótomos da fauna colombiana por Morales *et. al.*, (1982), quando da descrição da fêmea de *L. scaffi*, que também afirmam serem

necessários exemplares machos para uma identificação segura destas espécies. Christensen (1972) alega que, mesmo usando estas características, as fêmeas ainda são inseparáveis.

As espécies deste subgênero parecem estar intimamente relacionadas com as do Grupo *Aragoi*, por isso Barreto (1962), as incluem no subgênero *Psathyromyia*.

Morales *et. al.*, (1982), Christensen (1972) e Barretto (1962) relatam que os machos devido à diferença morfológica da estrutura da genitália externa são identificados com facilidade. Porém, as fêmeas são extremamente parecidas, sendo identificadas com certa dificuldade, com caracteres por vezes duvidosos e somente por especialistas, através de caracteres cromáticos existentes nas pleuras do tórax e abdômen. As espermatecas dessas três espécies são bastante semelhantes, no que diz respeito principalmente à observação do ducto individual, ducto comum e o corpo, que tem um formato de cápsulas cilíndricas (Figura 39), tornando a identificação dessas fêmeas bastante difíceis. Tais fatores geram inferências tendenciosas em estudos de biodiversidade, implicando na dificuldade de incriminação das espécies, uma vez que a resolução taxonômica é crucial para esse tipo de estudo.



Figura 39 – Formato da espermateca de fêmeas de *Lutzomyia (Psathyromyia) dendrophyla* podendo se observar a haste da furca, parte do ducto comum, os dutos individuais, o corpo e a cabeça da espermateca.

A importância taxonômica da armadura no átrio genital de flebotomíneos foi examinada primeiramente por Madulo-Leblond *et. al.*, (1991) quando notaram que o comprimento dos espinhos da armadura no átrio genital de fêmeas de *Phlebotomus papatasi* e *P. dubosqi* era diferente. Pesson *et. al.*, (1994) em seus estudos verificaram que estas duas espécies podiam ser separadas por este caráter taxonômico.

O átrio genital de flebotomíneos foi identificado como uma ferramenta taxonômica útil em espécies africanas e asiáticas do gênero *Phlebotomus* Rondani, onde foi aplicado com sucesso nos subgêneros *Larroussious* e *Phlebotomus* Nitzulescu, (Killick-Kendrick *et. al.*, 1994; Pesson *et. al.*, 1994) como um caráter distintivo, sugerindo que a armadura genital seria mais útil na identificação do que a armadura faringea, sendo posteriormente usado para separar fêmeas de *Paraphlebotomus spp.*, quando Killick-Kendrick *et. al.*, (1997) descreveram uma nova espécie – *Phlebotomus (Paraphlebotomus) mireillae* e utilizando a armadura do átrio genital conseguiram diferenciar essa espécie da fêmea de *P. saevus*. Em um estudo realizado no Paquistão, Kakarsulemankel *et. al.*, (2004), diferenciaram oito espécies de flebotomíneos, através da armadura do átrio genital.

Na América do Sul, Valenta *et. al.*, (1999) demonstraram que o átrio genital também funcionou para o gênero *Lutzomyia* França, como um bom caráter taxonômico, na diferenciação de espécies crípticas do grupo *Verrucarum* e também ao examinarem a armadura do átrio genital de outras espécies de flebotomíneos da Venezuela.

Estudos da armadura do átrio genital nas Américas, até o momento, foram limitados a poucas espécies de flebotomíneos (Tang & Añez 1996). Añez & Tang (1997) utilizando três métodos para determinar a idade das fêmeas de flebotomíneos nulíparas e múltiparas: aparência das glândulas acessórias, ovários e marcas de dobragem nas extremidades da armadura átrio genital, mostraram que esta última foi a mais significativa e útil na determinação de paridade.

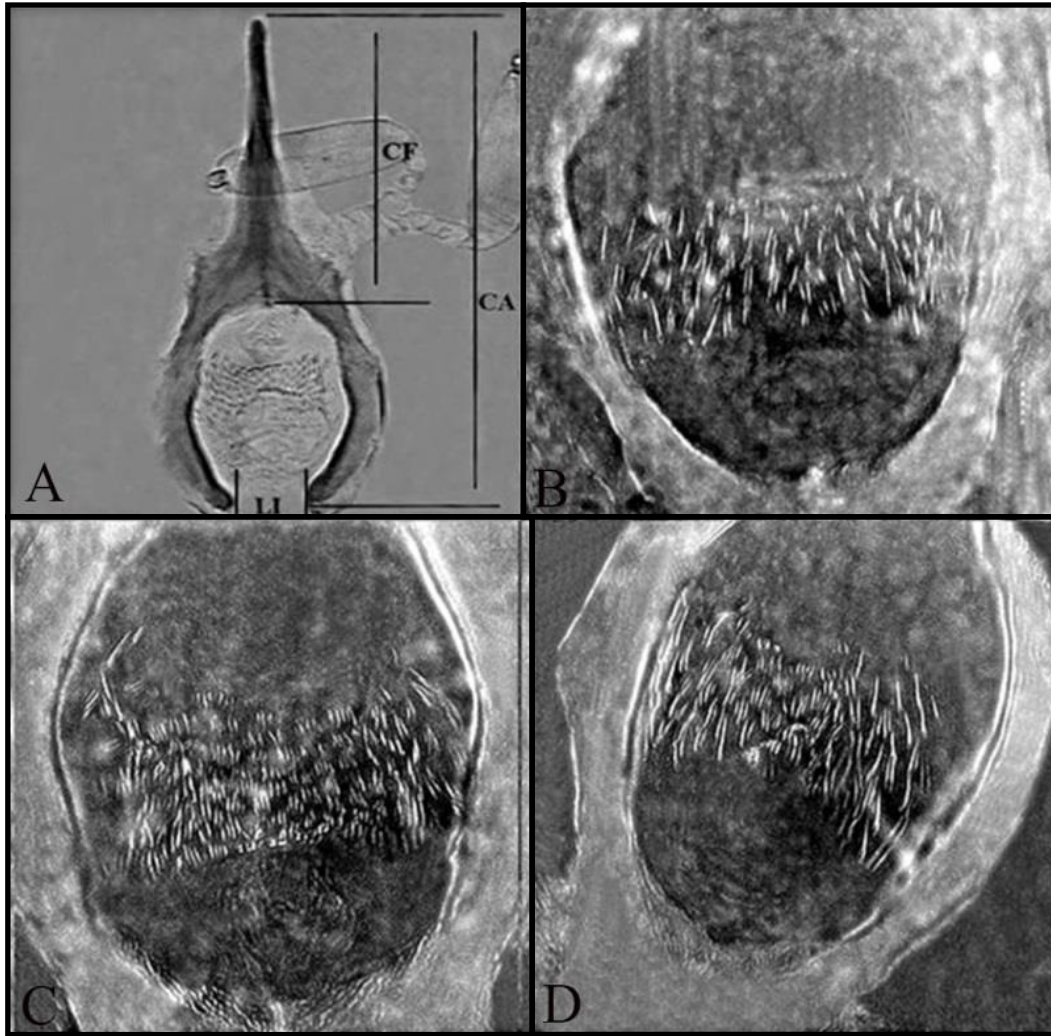
O átrio é uma estrutura quitinosa com formato do osso estribo, com uma membrana fina contendo uma armadura, que é uma faixa composta de pequenos espinhos entre os braços da furca, apontando posteriormente. Sua morfologia é constante para indivíduos de uma mesma espécie, porém a diferenciação característica entre as espécies é a forma, tamanho da armadura, e tamanho, número e arranjo dos espinhos. Essa estrutura localiza-se no sentido da entrada do duto de ovipostura e a sua membrana ligada à abertura do canal da spermateca, e, segundo Valenta *et. al.*, (1999) pode ser utilizada para expressar características constantes

entre indivíduos da mesma espécie, esuficientemente diferente entre as espécies para permitir a separação taxonômica.

O objetivo do presente estudo foi descrever o átrio genital de fêmeas de três espécies *L. scaffi*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, que são crípticas e compartilham o mesmo ecótopo, visando à inclusão de mais caracteres para a identificação dessas espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As fêmeas de primeira geração criadas de *Lutzomyia dendrophyla*, *L. scaffi* e *L. shannoni* foram criadas no laboratório de entomologia do Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD / FIOCRUZ, de acordo com a metodologia descrita por Killick-Kendrick & Killick-Kendrick (1991). Para melhores detalhes sobre a metodologia de criação, ver o capítulo I dessa dissertação. Os procedimentos para isolar o átrio genital e espermatecas foi segundo os descritos por Killick-Kendrick *et. al.*, (1994). Os três últimos segmentos terciais do abdome foram cortados com auxílio de estiletos e colocados em Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% por um período de 24 horas. As amostras foram em seguida lavadas em ácido acético a 10% e depois em água destilada, e colocadas em glicerina para dissecação em um microscópio estereoscópico. Os segmentos foram então separados, para isolar as espermatecas. Estiletos foram usados para separá-los ventralmente e assim expor o átrio, sendo em seguida montados em lâmina e fotografados em fluído de Berlese. As imagens foram obtidas utilizando máquina fotográfica digital da marca JVC – 3 CCD, acoplada a um microscópio óptico trinocular da marca Leica DM 1000, com objetiva de 40x e um computador, sendo utilizado o programa Auto Montage 4.0 (Syncroscopy). Foi utilizado o comprimento da furca (CF), o comprimento total do átrio (CA) a largura da parte interna do átrio (LI) (Figura 40 A) e a forma e padrão dos pentes de espinhos (Figuras 40 B a D). As medidas acima foram usadas para comparar o átrio genital das espécies, e a disposição de seus respectivos espinhos dispostas na membrana da armadura. Foi utilizado o teste estatístico Kruskal-Wallis para as análises estatísticas sendo utilizado o programa PAST.



Figuras 40 – **A** – Furca de *Lutzomyia scaffi*. Linhas que indicam quais extremos de estruturas das furcas que foram medidas: CA - comprimento total do átrio, CF – comprimento da furca e LI - largura interna da furca; **B** – átrio genital de *Lutzomyia dendrophyla* composto de 1 a 3 espinhos longos; **C** – átrio genital de *Lutzomyia scaffi* formado de 3 a 6 espinhos curtos formando um pente em uma faixa horizontal na membrana; **D** – *Lutzomyia shannoni* – membrana composta de 3 a 6 espinhos curtos no meio da membrana e grandes espinhos nas bordas laterais.

3. RESULTADOS

Foram montadas nove furcas com armadura do átrio genital intactos de cada espécie estudada. As medições do comprimento total do átrio, comprimento da furca, comprimento da abertura do átrio (Tabela 4) e arranjos dos espinhos (Tabela 5) variaram para cada espécie examinada: para *L. dendrophyla*, foram encontrados agrupamentos de um a três espinhos grandes, agrupados ou não em toda a extensão da membrana. A armadura do átrio de *L. scaffi* tem agrupamentos de três a seis espinhos formando pentes em faixas horizontais mais abundantes no meio da membrana do átrio. *L. shannoni* possui formação de pentes de três a seis espinhos curtos no meio da membrana e grandes espinhos não agrupados nas bordas laterais da membrana do átrio.

Tabela 4 – Morfometria dos átrios genitais (medida em μm) das fêmeas de *L. (P.) scaffi*, *L. (P.) dendrophyla* e *L. (P.) shannoni*, com variação na amplitude do tamanho do comprimento total do átrio (CA), do comprimento da furca (CF) e da largura interna do átrio (LI), em uma amostragem de nove fêmeas medidas de cada uma das três espécies de flebotomíneo estudada da Amazônia Central, Amazonas, Brasil.

	<i>L. scaffi</i>			<i>L. dendrophyla</i>			<i>L. shannoni</i>		
	CA	CF	LI	CA	CF	LI	CA	CF	LI
Máximo	202,6	120	61,3	186,6	109,3	42,6	192	117,3	34,6
Mínimo	186,6	112	26,6	173,3	88	10,6	176	88	8
Mediana	196,7	115,2	40,5	179,2	101,6	26,6	182,2	103,7	19,5

Tabela 5 – Número e arranjos dos espinhos da armadura do átrio genital de fêmeas de três espécies crípticas de flebotomíneos.

Espécies	Número	Tamanho	Arranjo e localização
<i>L. dendrophyla</i>	1-3	Grandes	Agrupados ou não em toda a extensão da membrana
<i>L. scaffi</i>	3-6	Curtos	Forma um pente em uma faixa horizontal compacta no meio da membrana do átrio
<i>L. shannoni</i>	3-6	Curtos e Grandes	Forma pente de 3-6 espinhos curtos no meio da membrana e grandes espinhos não agrupados nas bordas laterais da membrana do átrio.

Foram encontradas diferenças significativas entre o comprimento total do átrio, comprimento da furca e a largura da membrana interna dos átrios (Tabela 6) em *L. dendrophyla* e *L. scaffi* ($p=0,0004$), ($p=0,0005$) e ($p=0,009$) e *L. scaffi* e *L. shannoni* ($p=0,007$), ($p=0,0009$) e ($p=0,001$), mas nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o tamanho das estruturas dos átrios de *L. dendrophyla* e *L. shannoni*.

Tabela 6 – Análises Estatísticas dos Átrios das fêmeas de flebotomíneos, com aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis (H:8.654, $p < 0.01$) realizado no programa PAST.

ESPÉCIES					
<i>L. dendrophyla</i> x <i>L. scaffi</i>			<i>L. scaffi</i> x <i>L. shannoni</i>		
Átrio	Furca	Abertura	Átrio	Furca	Abertura
$p=0,0004$	$p=0,0005$	$p=0,009$	$p=0,007$	$p=0,0009$	$p=0,001$

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Para estas espécies crípticas do subgênero *Psathyromyia*, o caracter mais evidente utilizado na separação dessas fêmeas, é a pigmentação apresentada nas pleuras dessas espécies. As diferenças morfológicas são bastante sutis, que os caracteres morfológicos utilizados como a armadura farigeana, o cibário, os ascóides antenais, os palpômeros e as espermatecas, comparativamente tem pouco valor taxonômico. Nas espécies examinadas nesse estudo foram encontradas diferenças no átrio genital através do comprimento da furca, comprimento total do átrio, a largura interna do átrio e o agrupamento dos espinhos na armadura. Estes caracteres mostraram que é possível separar as fêmeas deste estudo através desses caracteres.

Killick-Kendrick *et. al.*, (1994), em estudos realizados com fêmeas de flebotomíneos do subgênero *Larroussius* no Quênia concluíram que a armadura do átrio genital deveria ser utilizada para descrições e redescritões de espécies. Em um trabalho realizado na Venezuela com fêmeas nulíparas e múltíparas, usando como critérios de diagnóstico as glândulas acessórias, ovários e deformações no átrio genital, Tang & Añez (1996) conseguiram identificar 97% das fêmeas de flebotomíneos coletadas nas vilas de San Juanito e Zea, estado de Merida, região Andina Ocidental da Venezuela, através do átrio genital.

Nesse estudo foi constatado que pelas observações do átrio genital das três espécies, foi feita a diferenciação das fêmeas de *L. scaffi*, *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, utilizando as medidas das estruturas anatômicas propostas por Valenta *et. al.*, (1999) e também na distribuição dos espinhos, ao longo da membrana do átrio. Foram encontradas diferenças significativas entre as estruturas das espécies, *L. scaffi* e *L. dendrophyla*, e *L. scaffi* e *L. shannoni*. Não foram observadas diferenças nas estruturas utilizadas para medição entre *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, apenas diferenças no tamanho e na disposição dos espinhos na membrana dos átrios. Foram encontradas outras mudanças no fenótipo dessas três espécies (consultar dados apresentados no capítulo II de Morfometria Geométrica).

Conclui-se com esse estudo que há diferenças morfológicas nos átrios das três espécies. A utilização da morfologia e da morfometria do átrio genital pela sua observação adicionou um importante caráter para diferenciação de fêmeas crípticas do subgênero *Psathyromyia* da Amazônia Central Brasileira.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Añez, N. & Tang, Y. 1997. Comparison of three methods for age-grading of female Neotropical phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 3-7.
- Arias, J.R.; Miles, M.A.; Naiff, R.D.; Povea, M.M.; Freitas, R.A.; Biancardi, C.B. & Castellon, E.G. 1985. Flagellate infections of Brazilian sandflies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 1098-1108.
- Barretto, M.P. 1962. Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, subfamília Phlebotominae). *Revista Instituto Medicina Tropical*. São Paulo 4: 91-100.
- Christensen, H.A. 1972. Check list of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Panama including two species not previously reported. *Mosquito News* 32: 88-89.
- Comer, J.A.; Kavanaugh, D.M.; Stallknecht, D.E.; Corn, J.L. 1994. Population dynamics of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to the epizootiology of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island Georgia. *Journal Medicine Entomological* 31: 850-854.
- Comer, J.A.; Stallknecht, D.E.; Corn, J.L.; Nettles, V.F. 1991. *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae): a biological vector of the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia. *Parassitologia* 33(1): 151-158.
- Comer, J.A.; Tesh, R.B.; Modi, G.B.; Corn, J.L. & Nettles, V.F. 1990. Vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype: replication in and transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 483-490.
- Dujardin, J.; Le Pont, F.; Matias, A. & De La Riva. 2005. Morphometric evidence of speciation within Bolivian *Lutzomyia aragaoi* (Diptera: Psychodidae). *Infection Genetetics and Evolution* 5: 362-365.

- França, C. 1924. Notes parasitologiques. *Jornal de Sciencias Mathematicas, Physicas & Naturaes* Lisboa (3):17. Separata 12p.
- Forattini, O.P. 1973. Entomologia Médica. IV. Psychodidae. Leishmanioses. Bartonelose. Edgard Blucher, São Paulo. 658p.
- Galati, E.A.B. 2003. Classificação de Phlebotominae. In E.F. Rangel, R. Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-51.
- Guerra, J.A.O.; Ribeiro, J.A.S.; Coelho, L.I.A.R.C.; Barbosa, M.G.V.; Paes, M.G. 2006. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Caderno Saúde Pública Rio de Janeiro* 22(11): 2319-2327.
- Kakarsulemankel, J.K. 2004. New Record of Armature in the Genital Atria of Female Sandflies of Pakistan to Discriminate Species of Phlebotominae Sandflies (Diptera, Psychodidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (6): 912-915.
- Killick-Kendrick, R.; Tang, Y.; Johnson, R.N.; Ngumbi, P.M. & Robert, L.L. 1997. Phlebotomine sandflies of Kenya (Diptera: Psychodidae). V. *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *mireillae* n.sp. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91: 417-428.
- Killick-Kendrick, R.; Tang, Y.; & Killick-Kendrick, M. 1994. Phlebotominae sandflies of Kenya (Diptera: Psychodidae). IV. The armature in the genital atrium of female *Larrossius* as a means of identification. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88: 433-437.
- Killick-Kendrick, M. & Killick-Kendrick, R. 1991. The initial establishment of sandfly colonies. *Parasitologia* 33: 315-20.
- Laison, R.; Shaw, J.J.; Ward, R.D.; Ready, P.D. e Naiff, R.D. 1979. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novencinctus*) and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73: 239-242.

- Le Pont, F.; Pajot, F.X. & Reguer, R. 1980. Preliminary observations on the silvatic cycle of leishmaniasis in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 133.
- Madulo-Leblond, G.; Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, M. & Pesson, M. 1991. Comparision entre *Phlebotomus duboscqi* (Neveu-Lemaire, 1906) et *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786): etudes morphologique et isoenzymatique. *Parasitologia* 33: 387-391.
- Morales, A.; Rodrigues, M.C. & Ibagos, A.L. 1982. Description de la hembra de *Lutzomyia scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956) (Diptera, Psychodidae). *Biomédica Bogotá* 2: 17-21.
- Pesson, B.; Madulo-Leblond, G.; Killick-Kendrick, R.; Tang, Y. & Killick-Kendrick, M. 1994. The armature in the genital atrium as a new taxonomic character distinguishing females of *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88: 539-542.
- Pinto, I.S.; Andrade Filho, J.D.; Santos, C.B.; Falqueto, A. & Leite, Y.R.L. 2010. Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia* subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 47: 16-21.
- Ryan, L.; Lainson, R. & Shaw, J.J. 1986. The experimental transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson & Shaw, between hamsters by bite of *Lutzomyia furcata* (Mangabeira). *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 164-165.
- Rogers, W.O.; Burnheim, P.F. & Wirth, D.F. 1988. Deteccion of *Leishmania* within sand flies by kinetoplast DNA hybridization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39: 434-439.
- Rowton, E.; Mata, M.; Rizzo, N.; Navin, T. & Porter, C. 1991. Vectors of *Leishmania braziliensis* in the Petén, Guatemala, p. 501-504, In M. Maroli [ed.], Proc. 1st Int. Symposium on Phlebotomine Sandflies, Rome. *Parasitologia* 33:1.
- Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS – Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007 – 2ª Ed., Brasília.

- Silva, D.F.; Freitas, R.A.; Franco, A.M.R. 2007. Diversidade e Abundância de Flebotomíneos do Gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em Áreas de Mata do Nordeste de Manacapuru, AM. *Neotropical Entomology* 36 (1):138-144.
- Tang, Y. & Añez, N, 1996. The genital atrium as a new character for distinguishing parous and nulliparous Neotropical sandflies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 90: 203-206.
- Valenta, D.T.; Añez, N.; Tang, Y. & Killick-Kendrick, R. 1999. The genital atrium as a good taxonomic character to distinguish between species of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 93: 389-399.
- Young, D.G. & Duncan, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54:1-881.
- Young, D.G.; Morales, A.; Kreutzer, R.D.; Alexander, J.B.; Corredor, A., Tesh, R.B.; Ferro de Carrasquilla, C. & de Rodríguez, C. 1987. Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 24: 588-589.

5. CONCLUSÃO GERAL

- Os caracteres taxonômicos utilizados foram importantes para adicionar um caráter distintivo às larvas de flebotomíneos de espécies crípticas do subgênero *Psathyromyia*
- Que o uso da morfometria geométrica foi útil na separação de algumas espécies crípticas de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*), e que esta ferramenta pode ser de grande auxílio para diferenciar espécies taxonômicas difíceis.
- A utilização do átrio genital foi importante para adicionar um caráter distintivo de fêmeas crípticas do subgênero *Psathyromyia* da Amazônia Central Brasileira.
- As observações preliminares mostraram que *L. shannoni* e *L. scaffi* da bacia amazônica, podem ser criados em laboratório.

Conclui-se com esse estudo que a utilização de forma integrada destas ferramentas permitiu caracterizar fêmeas de *Lutzomyia* incluídas no subgênero *Psathyromyia*: *L. (P.) scaffi*, *L. (P.) dendrophyla* e *L. (P.) shannoni*, espécies crípticas e dendrofílicas de importância médico-veterinária que ocorrem na Amazônia Central.

APÊNDICE 1

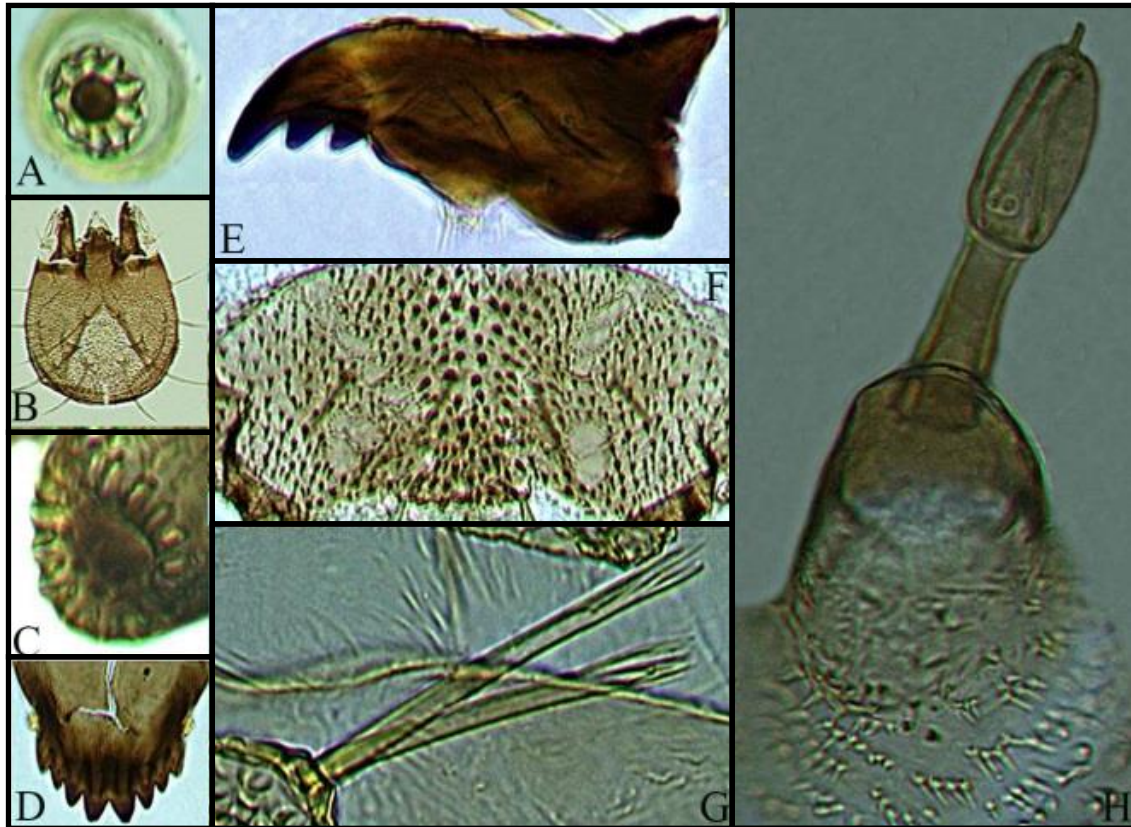


Figura 41 – quarto estágio larval de *L. scaffi*: A – espiráculo anterior formado por nove lóbulos; B – tagma cefálico; C – espiráculo posterior formado por 16 papilas; D – mento; E – mandíbula com pelos mandibulares; F – oitavo segmento abdominal, com disposição das manchas na área esclerotizada; G – cerdas pré-alares (10); H – antena: tubérculo antenal, segmentos antenais e sensilas.

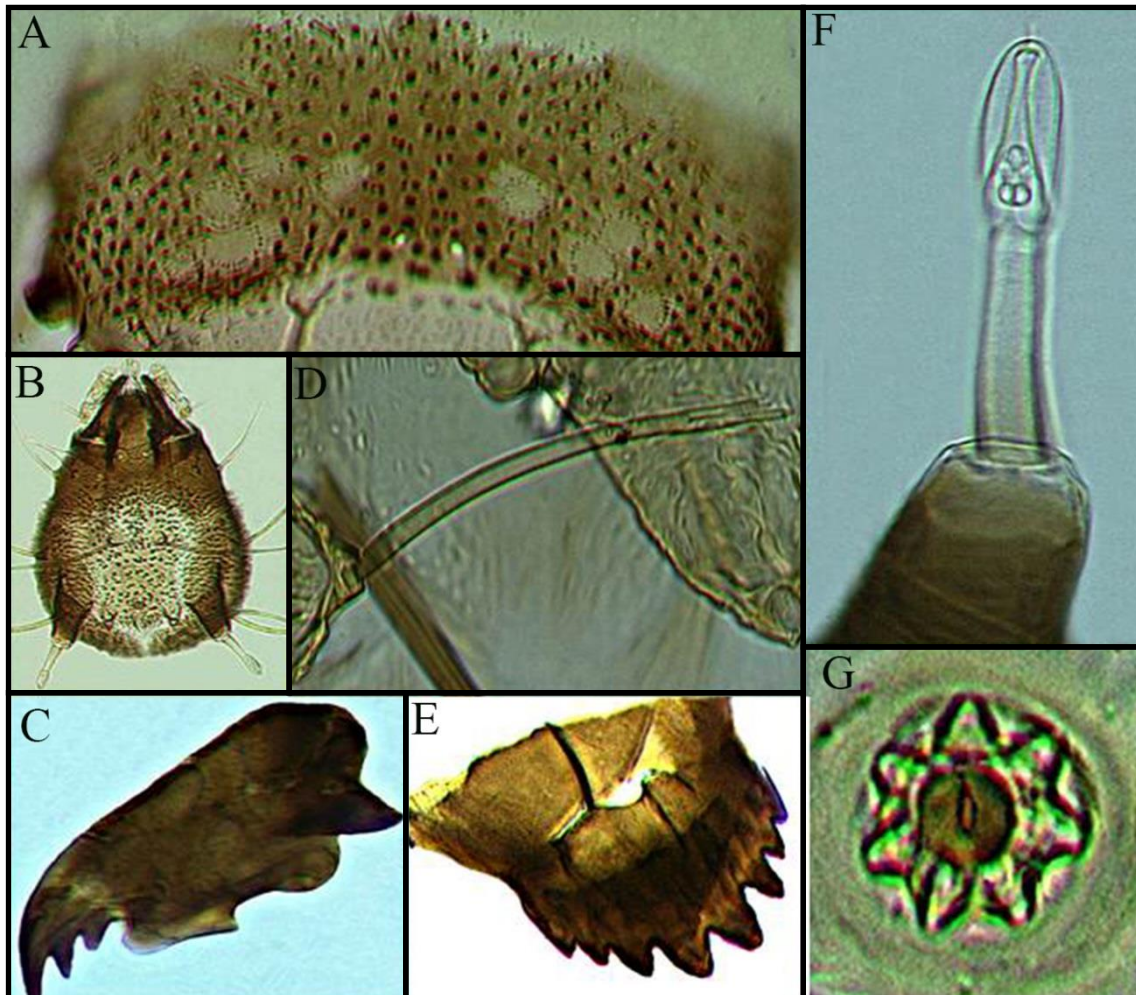


Figura 42 – quarto estágio larval de *L. dendrophyla*: A – oitavo segmento abdominal mostrando a área esclerotizada e disposição das manchas; B – tagma cefálico; C – mandíbula; D – cerda pré-alar (10); E – mento; F – antena inserida em um grande tubérculo e sensilas campaniformes e apical; G – espiráculo anterior formado por sete lóbulos.

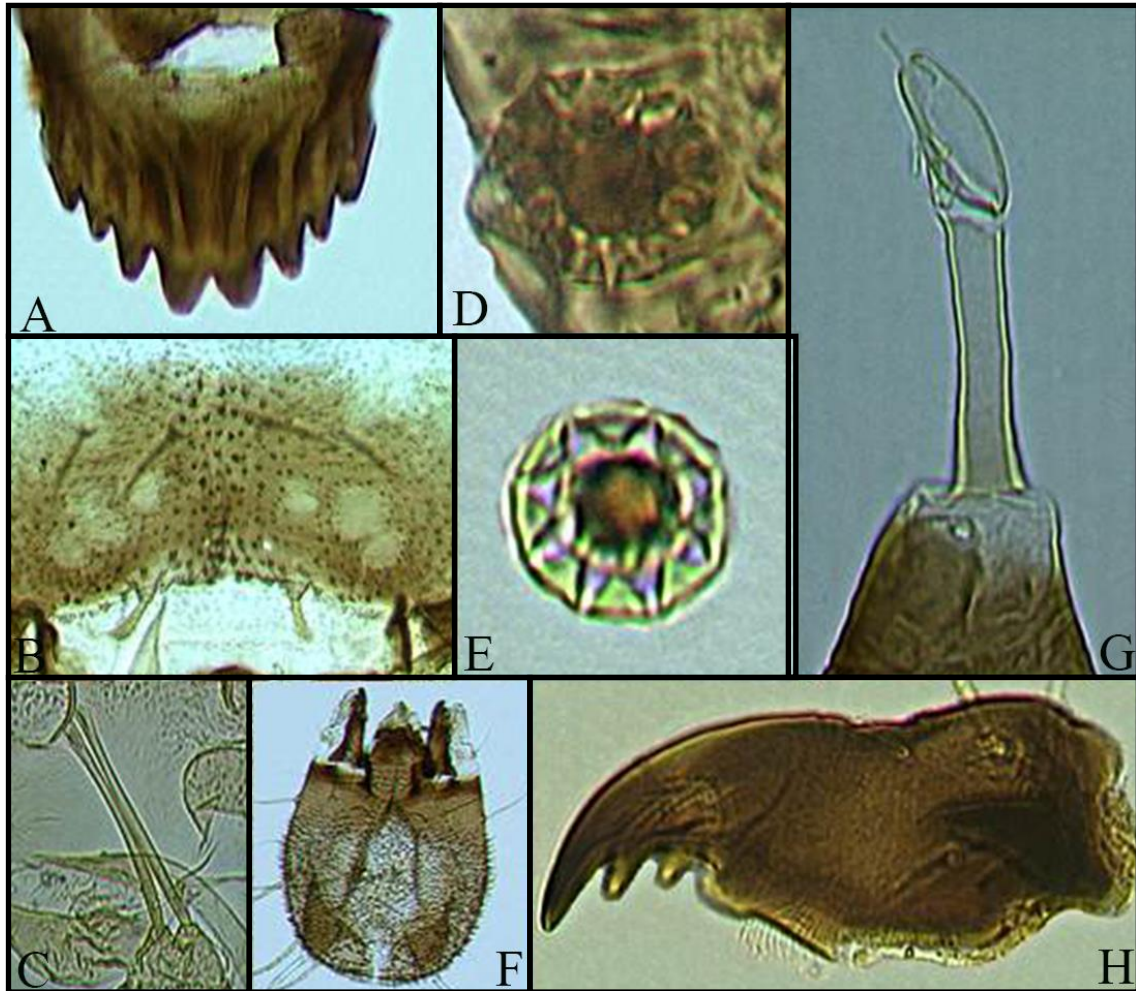


Figura 43 – estruturas de larvas de quarto ínstar de *L. shannoni*: A – mento; B – oitavo segmento abdominal mostrando a disposição das manchas e presença das cerdas submedianas dorsais (7); C – cerda pré-alares (10); D – espiráculo posterior formado por 14 lóbulos; E – espiráculo anterior com oito lóbulos; F – tagma cefálico; H – mandíbula com pelos mandibulares e parte da cerda S1.