

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

PIETRA LEMOS COSTA

Aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) do Brasil

RECIFE

2016

PIETRA LEMOS COSTA

Aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) do Brasil

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Coorientadores: Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Dr. James Gordon Hamilton

RECIFE

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- C837a Costa, Pietra Lemos.
Aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) do Brasil / Pietra Lemos Costa. - Recife: s.n, 2016.
119 p. : ilus., tab., 30 cm.
Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2016.
Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho.
1. Psychodidae - ultraestrutura. 2. Variação genética. 3. Atrativos Sexuais. 4. Insetos vetores. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

CDU 595.7

PIETRA LEMOS COSTA

Aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) do Brasil

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 24/10/2016

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dr. Luiz Carlos Alves
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa
Laboratório Keizo Azami (LIKA)

Dr. Jeffrey Jon Shaw
Universidade de São Paulo (USP)

A meus pais que sempre me incentivaram e nunca deixaram que eu desistisse dos meus sonhos. Vocês fazem parte desta caminhada.

A meu companheiro de todas as horas Erasmo e aos meus irmãos e sobrinhos, pelo apoio, carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos com muita luz e fé e conduzir minhas vitórias e conquistas.

A meus pais que sempre me apoiaram, incentivaram e confiaram para que pudesse realizar mais uma conquista.

A meu namorado, companheiro e amigo Erasmo Bezerra, por todo carinho e companheirismo durante esta jornada que não foi nada fácil.

A Dr. Sinval Brandão Filho, meu orientador, pela amizade, disponibilidade, competência e apoio.

A Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC) e James Gordon Hamilton (Lancaster University), meus co-orientadores, pelos conselhos, carinho, apoio e cuidado durante esta trajetória.

A Filipe Danta-Torres (CPqAM), pelo apoio, carinho, persistência e por acreditar no meu trabalho.

A José Dilermando Andrade Filho (CPqRR) pelo apoio em parte das análises morfológicas.

A Fábio Brayner, Luiz Carlos Alves, Jana Sandes e Rafael Padilha, por todo carinho, atenção e suporte nos experimentos de Microscopia Eletrônica.

A Ann Underhill e Karen Walker (Keele University), pelo suporte na colônia de flebotomíneos e experimentos de Microscopia Eletrônica.

A Domenico Otranto, Giada Annoscia, Maria Stefania Latrofa, Vivianna Tarallo e todos os colegas de laboratório do Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia da Università degli Studi di Bari, Itália, pelo apoio e carinho durante minha permanência no laboratório.

Ao técnico Fernando José da Silva, pela amizade, cuidado, empenho e dedicação no trabalho de campo.

A Débora Miranda e Vanessa Fitipaldi pelo apoio e dedicação nos trabalhos de campo.

A Kyldman Silva pelas contribuições na colônia de flebotomíneos.

A Kamila Gaudêncio pelo apoio e amizade.

A todos os colegas de turma (2012-2016) pelos momentos maravilhosos em que tivemos.

A todos os integrantes do Departamento de Imunologia que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

A todos os professores que fizeram parte deste curso.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, na figura do Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, pela disponibilidade de equipamentos, materiais e instalações.

Ao amigo Rodrigo Leal pelo carinho, atenção e todos os momentos de descontração proporcionados.

A amiga Ana Virgínia pelo carinho e apoio, além dos conselhos que sempre são pertinentes.

A Maria Cláudia Agra e todos que fazem parte da Vigilância Ambiental de Caruaru pelo apoio incondicional e momentos de descontração.

A Secretaria Estadual de Saúde, na pessoa de Alexandre Menezes e Eronildo Felisberto, que me concederam licença para realização deste estudo, além do apoio incondicional para realização deste trabalho.

A IV Regional de Saúde de Caruaru, nas pessoas de Nilson Monteiro, Efraim Naftali e Djair Lima pelo apoio.

A população de Baturité, Machados e Niterói, pelo acolhimento para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Ciência sem Fronteiras pelo suporte financeiro.

COSTA, Pietra Lemos. Aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) do Brasil. 2016. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

Lutzomyia migonei (França 1920) é um vetor conhecido de *Leishmania braziliensis*, agente causador da leishmaniose cutânea na América do Sul. Recentemente, foi sugerido que esta espécie também pode transmitir *Leishmania infantum*, contribuindo nas infecções por leishmaniose visceral. Neste estudo avaliamos pela primeira vez os aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lu. migonei* no Brasil. Não foram observadas diferenças morfológicas ou morfométricas significativas entre as populações estudadas. No entanto, ao analisar a variabilidade genética verificou-se a existência de dois cladogramas monofiléticos irmãos. Ao analisar a ultraestrutura de *Lu. migonei* verificou-se a presença de estruturas disseminadoras de feromônio distribuídas em diferentes segmentos abdominais dos machos e que a produção de feromônio aumenta gradualmente com a maturação das células glandulares, os quais parecem estabilizar em insetos adultos mais maduros em torno de três a sete dias pós-emergência, coincidindo com o período em que os machos são mais capazes de atrair as fêmeas. Entender o comportamento biológico e observar as evidências para comunicação de feromônio poderá ajudar a compreender o papel dos feromônios sexuais neste importante vetor. Ademais, o uso de marcadores moleculares (p.ex.: citocromo oxidase subunidade I) poderá fornecer informações valiosas sobre a genética de diferentes populações de *Lu. migonei* e sobre uma possível relação entre a variabilidade genética e a competência vetorial e/ou produção de diferentes tipos de feromônios.

Palavras-chave: *Lutzomyia migonei*. Ultraestrutura. Feromônios sexuais. Variabilidade genética.

COSTA, Pietra Lemos. **Biological, morphological and genetic aspects of different *Lutzomyia migonei* (França, 1920) populations of Brazil.** 2016. (Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health – Aggeu Magalhaes Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2016.

ABSTRACT

The sand fly *Lutzomyia migonei* (França 1920) is a known vector of *Leishmania braziliensis*, the causative agent of cutaneous leishmaniasis in South America. Recently it has been suggested that this specie can also transmit *Le. infantum* thus contributing to the burden of visceral leishmaniasis infection. This study describes for the first time the biological, morphological and genetic aspects of different *Lutzomyia migonei* populations of Brazil. No significant morphological or morphometric differences between all populations were observed. However, when analyzing the genetic variability we found the stocks of two close monophyletic clades. Analyzing the ultrastructure of *Lu. migonei* verified the presence of disseminating pheromone structures distributed in different abdominal segments of the male and the pheromone production gradually increases with maturation of glandular cells, which appeared to stabilize in mature adult insects around three to seven days post emergence, coinciding with the period in which males are able to attract females. Understanding the biological behavior and observe the evidence for pheromone communication can help to understand the role of sex pheromones in this important vector. Furthermore, the use of molecular markers (i.e.: cytochrome oxidase subunit I) can provide valuable information about the genetics of different populations of *Lu. migonei* and the possible relationship between genetic variability and vector competence and / or production of different types of pheromones.

Keywords: *Lutzomyia migonei*. Ultrastructure. Sexual pheromone. Genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática dos semioquímicos.	25
Figura 2 -	Mancha pálida no IV tergito abdominal de macho adulto de <i>Lu. longipalpis</i> .	31
Figura 3 -	Teste de bioensaio com exemplares de <i>Lu. migonei</i> .	47
Figura 4 -	Ávore filogenética baseada em regiões do mDNA (COI).	51
Figure 5 -	Eletromicrografia de varredura do abdomen de <i>Lu. Migonei</i> .	53
Figura 6 -	Eletromicrografia de transmissão de célula glandular de feromônio de machos adultos de <i>Lu. migonei</i> com 24 h pós-emergência..	55
Figura 7 -	Eletromicrografia de transmissão de células da glândula de feromônio de machos adultos de <i>Lu. migonei</i> com 72h pós-emergência.	56
Figura 8 -	Eletromicrografia de transmissão de células da glândula de feromônio de machos adultos de <i>Lu. migonei</i> com 120h pós-emergência.	57
Figura 9 -	Eletromicrografia de transmissão de células da glândula de feromônio de machos adultos de <i>Lu. migonei</i> com 168h pós-emergência.	58
Figura 10 -	Eletromicrografia de transmissão de células da glândula de feromônio de machos adultos de <i>Lu. migonei</i> provenientes do campo.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados morfométricos dos machos de <i>Lu. migonei</i> .	49
Tabela 2-	Dados morfométricos das fêmeas de <i>Lu. migonei</i> .	49
Tabela 3-	Número de exemplares, haplótipos representativos identificados e variação nucleotídica intra-genogrupo (média, min-max) recuperado para haplótipos <i>cox1</i> .	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LV – Leishmaniose visceral

L. infantum – *Leishmania infantum*

Lu. longipalpis – *Lutzomyia longipalpis*

Lu. cruzi – *Lutzomyia cruzi*

Lu. lenti – *Lutzomyia lenti*

Lu. carmelinoi – *Lutzomyia carmelinoi*

Lu. umbratilis – *Lutzomyia umbratilis*

Lu. anduzei – *Lutzomyia anduzei*

Lu. pseudolongipalpis – *Lutzomyia pseudolongipalpis*

COI – citocromo C oxidase subunidade I

DNA - Deoxyribonucleic Acid

per – *period gene*

CoA – coenzima A

P. papatasi – *Phlebotomus papatasi*

Lu. intermedia – *Lutzomyia intermedia*

Lu. pessoai – *Lutzomyia pessoai*

Lu. renei – *Lutzomyia renei*

Lu. ovallesi – *Lutzomia ovallesi*

S. minuta – *Sergentomyia minuta*

Lu. furcata – *Lutzomyia furcata*

Lu. quinquefer – *Lutzomyia quinquefer*

Lu. sallesi – *Lutzomyia sallesi*

Lu. peruensis – *Lutzomyia peruensis*

IPP – Isopropenil difosfato

DMAPP – Dimetillalil difosfato

MAD – Mevalonato dependente

DOXP – Deoxisilulose fosfato

MEP – Metileritritol fosfato

CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

TA – Temperatura ambiente

PCR – Reação em cadeia de polimerase

CaCl₂- Cloreto de cálcio

pb - Pares de base

K2P – Kimura 2 parâmetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	19
2.1	Flebotomíneos	19
2.1.1	Complexo de espécies	20
2.1.2	Morfologia, biologia e ecologia	23
2.1.3	Comunicação química	25
2.1.3.1	<i>Feromônios</i>	26
<u>2.1.3.1.1</u>	<u><i>Feromônios sexuais</i></u>	27
2.1.3.2	<i>Biosíntese de feromônio de insetos</i>	31
2.1.3.3	<i>Glândulas produtoras de feromônio em insetos</i>	33
2.1.3.4	<i>Uso de feromônios para monitoramento e controle em insetos</i>	37
<u>2.1.3.4.1</u>	<u><i>Monitoramento com armadilha</i></u>	37
<u>2.1.3.4.2</u>	<u><i>Captura em massa</i></u>	38
<u>2.1.3.4.3</u>	<u><i>Interrupção de acasalamento</i></u>	38
3	JUSTIFICATIVA	41
4	OBJETIVOS	42
4.1	Objetivo Geral	42
4.2	Objetivos Específicos	42
5	MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1	Área de estudo	43
5.2	População de flebotomíneos	43
5.3	Morfologia e morfometria de <i>Lu. migonei</i>	44
5.4	Análise genética das populações de <i>Lu. migonei</i>	44
5.5	Microscopia eletrônica de varredura	45
5.6	Microscopia eletrônica de transmissão	45
5.7	Bioensaio de laboratório	46
5.8	Análise de dados	47
6	RESULTADOS	49
6.1	Morfometria de <i>Lu. migonei</i>	49
6.2	Análise genética das populações de <i>Lu. migonei</i>	49
6.3	Microscopia eletrônica de varredura	52

6.4	Microscopia eletrônica de transmissão	54
6.5	Bioensaio de laboratório	59
7	DISCUSSÃO	61
8	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são hospedeiros naturais de vários microorganismos incluindo agentes etiológicos de doenças de importância médica e veterinária como vírus, bactérias e protozoários. Quatro gêneros de protozoários tripanossomatídeos são encontrados parasitando este grupo de insetos: *Endotrypanum*, *Trypanosoma*, *Sauroleishmania* e *Leishmania* (BRAZIL et al., 2015). Apenas o gênero *Leishmania* é patogênico ao homem, tendo os flebotomíneos como vetores. Diversos países no mundo apresentam uma alta incidência de leishmaniose cutânea e visceral (ALVAR et al., 2012).

De acordo com Maroli et al. (2013), estima-se que 98 espécies, sendo 42 *Phlebotomus* e 56 *Lutzomyia* são capazes de transmitir o parasito no mundo. No Velho Mundo, das 42 espécies de flebotomíneos vetores comprovados ou prováveis de leishmaniose, 20 são implicados na transmissão da *Leishmania infantum*, seis na transmissão da *Leishmania donovani*, sete na transmissão da *Leishmania major*, sete na transmissão da *Leishmania tropica* e três na transmissão da *Leishmania aethiopica*.

Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia* é o maior e de mais ampla distribuição geográfica. É também o único de importância médica, pois inclui várias espécies envolvidas na transmissão de 15 espécies de *Leishmania*: *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania shawi*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania pifanoi*, *Leishmania lindenbergi*, *Leishmania venezuelensis* e *Leishmania colombiensis* (BRAZIL et al., 2015; MAROLI et al., 2013).

As leishmanioses são um problema de saúde pública devido a sua magnitude, distribuição geográfica e por produzir formas clínicas que podem causar mortes, incapacidades ou mutilações. Encontram-se distribuída em mais de 98 países e territórios, com mais de 350 milhões de pessoas sob risco de adoecer (ALVAR et al., 2012).

Dependendo da espécie infectante e da resposta imune do hospedeiro, a doença pode se manifestar de três formas principais. A leishmaniose cutânea (LC) se caracteriza pela presença de úlceras (única ou múltiplas) na pele, lesões satélites ou linfangites nodulares. A leishmaniose mucocutânea (LMC), com envolvimento da mucosa, e a leishmaniose visceral (LV), com envolvimento de órgãos internos (fígado, baço e medula óssea), são formas graves, sendo a LV potencialmente fatal se não tratada precocemente (DE VRIES et al., 2015).

Nas Américas, casos de leishmaniose humana têm sido reportados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção das ilhas Caribenhas, Chile e Uruguai. Dados recentes mostram que uma média de 60.000 casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea e 4.000 casos de leishmaniose visceral são diagnosticados anualmente, com uma taxa de mortalidade de 7% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

Estima-se que em torno de 75% do total de casos reportados de LC estão concentrados em dez países, quatro dos quais são da região das Américas (Brasil, Colômbia, Peru e Nicarágua) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). A LC apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil com registro de casos em todas as regiões do país. A partir da década de 80, consolida-se a expansão geográfica da doença e, em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados federados (BRASIL, 2007).

As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LC, no Brasil, são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia complexa*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia shawi* e *Lutzomyia ayrozai* (BRAZIL et al., 2015). Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetoras por atenderem aos critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. É importante ressaltar que o papel vetorial de cada uma dessas espécies dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino do inseto. Embora ainda não tenha sido comprovada a importância epidemiológica de *Lutzomyia neivai* (PITA-PEREIRA et al., 2009) e *Lutzomyia fisheri* (MARCONDES et al., 2005, PITA-PEREIRA et al., 2011) como vetores da LC, estas espécies de flebotomíneos têm sido encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania* (BRAZIL et al., 2015; RANGEL; LAINSON, 2009; RÊGO et al., 2015; SARAIVA et al., 2008).

A LV possui uma ampla distribuição mundial, sendo encontrada nas Américas, África, Sul da Europa, Ásia e Oriente Médio. Nas Américas, ocorre desde o México até a Argentina, com o Brasil contribuindo com 90% dos casos do continente (LAINSON; RANGEL, 2005; MISSAWA et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) são registrados anualmente 500 mil novos casos, com 59 mil óbitos. No Brasil, a LV vem apresentando um elevado número de casos em períodos médios a cada cinco anos, podendo ser observado diferenças no comportamento epidemiológico da doença de acordo com a presença da mesma nas localidades de origem, por exemplo, entre estados e municípios (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009).

No Brasil, o agente etiológico da LV é a *L. infantum*, sendo transmitida principalmente por flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (CARVALHO et al., 2007; LAINSON; RANGEL, 2005). *Lutzomyia cruzi* também é vetor da LV, participando da transmissão da doença nos municípios de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 1998), e no município de Jaciara, Mato Grosso (MISSAWA et al., 2011). Recentemente, evidências incriminaram *Lutzomyia forattini* e *Lutzomyia migonei* como novos potenciais vetores da LV no Novo Mundo (GUIMARÃES et al., 2016; MAROLI et al., 2013). Adicionalmente, *Lutzomyia cortelezzii* no Estado de Minas Gerais e *Lutzomyia evansi* na Colômbia e Venezuela também são espécies que podem estar envolvidas no ciclo de transmissão de *L. infantum* (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Lutzomyia migonei é uma espécie amplamente distribuída no Brasil, podendo ser encontrada nos domicílios e abrigos de animais, apresentando elevada capacidade de adaptação a ambientes antropicamente modificados (GUIMARÃES et al., 2012; RANGEL; LAINSON, 2009). Esta ampla distribuição pode contribuir para uma diferenciação e especiação devido ao isolamento geográfico e adaptação local, especialmente quando associado a uma seleção sexual (HAMILTON, 2008).

A ecologia química dos flebotomíneos tem recebido particular atenção por conta da produção de feromônio sexual pelos machos e, isto vem sendo bem estudado quanto ao principal vetor da LV, *Lu. longipalpis*, parecendo ser um excelente marcador para os membros desta espécie, que por sua vez pertence a um complexo de espécies. (HAMILTON, 2008; WATTS et al., 2005). Além disso, o uso de marcadores moleculares em estudos genéticos vem contribuindo para a elucidação de membros de espécies crípticas de vetores, incluindo os flebotomíneos. Diante do exposto, o emprego destes tipos de ferramentas poderá fornecer informações valiosas sobre a genética de diferentes populações de *Lu. migonei* e sobre uma possível relação entre a variabilidade genética e a competência vetorial e/ou produção de diferentes tipos de feromônios, visto que nenhum estudo desta magnitude foi realizado utilizando esta espécie como modelo. Neste sentido, o presente estudo visou descrever os aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lu. migonei* do Brasil.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Flebotomíneos

Os dípteros são o segundo grupo mais diverso dos insetos, depois dos coleópteros. Mais de 125.000 espécies de dípteros tem sido descritas, sendo estimado em 1.000.000 o número total de espécies existentes atualmente (WICKER-THOMAS, 2007). Estas espécies estão classificadas em 188 famílias, podendo ser encontradas por todo o mundo, incluindo a Antártica (WICKER-THOMAS, 2007). A importância econômica desta ordem é imensa, visto que muitas espécies são pragas agrícolas ou vetores causadores de doenças em animais e no homem.

Os flebotomíneos são pequenos dípteros hematófagos de grande importância médica e veterinária (DANTAS-TORRES et al., 2010). Eles são vetores de parasitos do gênero *Leishmania*, agentes causadores das leishmanioses, os quais pertencem a um grupo de doenças que afetam milhares de pessoas em todo o mundo. No Brasil, as leishmanioses representam um grande problema de saúde pública e o seu controle está longe de ser alcançado em um futuro próximo. Estes insetos surgiram provavelmente durante o período Cretáceo inferior (LEWIS, 1982). A subfamília Phlebotominae pertence à família Psychodidae, subordem Nematocera, sendo composta por seis gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994). O gênero *Chinius* é um táxon distinto usado para algumas espécies de flebotomíneos chineses com caracteres primitivos (LENG, 1987).

Atualmente, diversos entomologistas seguem esta classificação. Dos gêneros de flebotomíneos no Novo Mundo, *Lutzomyia* é o maior e com uma ampla distribuição geográfica, com presença desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. Cerca de 988 espécies destes insetos são conhecidas no mundo, sendo 529 espécies nas Américas e 269 registradas no Brasil (GALATI, 2014).

O gênero *Lutzomyia* é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (YOUNG; DUNCAN, 1994). Noventa e oito espécies deste gênero e do gênero *Phlebotomus* são vetores comprovados ou suspeitos de leishmanioses, embora este número esteja em ascensão, seja pela descrição de novas espécies ou, apenas, pela incriminação de novos vetores (MAROLI et al., 2013). Na região Neotropical, 20 espécies são consideradas vetores comprovados (BRAZIL et al., 2015).

A fauna de flebotomíneos no Brasil é composta por mais de 260 espécies (GALATI, 2014), representando uma das faunas mais bem estudadas em todo o mundo, tornando-se importante para o subsídio de informações base para desenvolvimento de políticas públicas de saúde voltadas para os programas de controle das leishmanioses (DANTAS-TORRES et al., 2010).

2.1.1 Complexos de espécies

Os flebotomíneos apresentam uma importância médica indiscutível na transmissão das leishmanioses e sua correta identificação taxonômica é um componente crucial em qualquer estudo epidemiológico (LANZARO; WARBURG, 1995). A identificação e classificação de espécies de flebotomíneos dependem da comparação de caracteres morfológicos externos e internos. Entretanto, estas abordagens têm frequentemente levado a um erro na identificação de indivíduos dentro de espécies “irmãs” ou em torno de espécies que são morfológicamente próximas (DUJARDIN, 2008).

A morfometria é uma ferramenta taxonômica poderosa para identificar novas espécies, além de poder ajudar em investigações sobre os limites taxonômicos de uma espécie (DUJARDIN, 2008). Os caracteres morfométricos são contínuos caracteres relacionados ao crescimento e desenvolvimento, visto que frequentemente são utilizados para estimar distâncias entre pontos anatômicos chamados pontos de referência.

Diferenças métricas consistentes entre grupos vivendo em contato uns com os outros sugerem isolamento reprodutivo e, portanto, especiação (DUJARDIN et al., 1999a). Como as propriedades métricas não são apenas o produto dos efeitos ambientais, mas também o reflexo da composição genética dos insetos (DUJARDIN et al., 1999b, DUJARDIN, 2008), comparar propriedades morfométricas entre espécies pode ajudar a classificá-los de acordo com as semelhanças gerais como estimado pelas distâncias métricas. Sendo assim, espécies crípticas quando analisadas morfometricamente têm sido diferenciadas com acurácia em triatomíneos (DUJARDIN et al., 1999b), flebotomíneos (DE LA RIVA et al., 2001; LANE; READY, 1985) e mosquitos (DUJARDIN, 2008). Ademais, informações nas variações morfológicas são importantes para compreender o potencial das diversas espécies de flebotomíneos na transmissão de doenças.

Nas últimas três décadas, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para elucidar a genética evolucionária e estruturas populacionais em insetos vetores, tendo estes estudos contribuído para diferenciar membros de complexos de espécies crípticas de

vetores da malária (LOAIZA et al., 2012; SCARPASSA et al., 2011), leishmanioses (BAUZER et al., 2007) e da doença de Chagas (MONTEIRO et al., 2004). Espécies crípticas são espécies discretas que são difíceis e muitas vezes impossíveis de se distinguir morfológicamente, embora os aspectos genéticos, comportamentais, ecológicos, susceptibilidade a infecção e hábitos alimentares frequentemente variam, definindo seu status para vetor ou não vetor. Além disso, as espécies que divergiram muito recentemente dificultam a compreensão do isolamento reprodutivo, relacionamentos evolutivos e distribuição geográfica, pois o fluxo de genes entre espécies ou entre diferentes unidades evolucionárias podem ter conseqüências epidemiológicas relevantes, bem como pode facilitar a transferência inter-específica de genes epidemiologicamente importantes ou alelos e alterar os padrões de transmissão de doenças (MAZZONI et al., 2008).

Para superar a classificação morfológica clássica que é baseada em caracteres morfológicos, principalmente estruturas internas como, cibário, faringe, espermoteca em fêmeas e genitália terminal em machos e sobrepor o tempo gasto durante este processo, além da necessidade de um profissional com expertise taxonômica, abordagens moleculares tem sido cada vez mais empregada para explorar a taxonomia, estruturas populacionais e filogenia dos insetos vetores incluindo flebotomíneos (GOMEZ et al., 2014; KATO et al., 2015; NZELU et al., 2015).

Seguindo a proposta do uso de seqüência de DNA como ferramenta de apoio para estudos de diversidade biológica e classificação, Herbert et al. (2003) sugeriram o uso e análise do fragmento 5' do gene mitocondrial citocromo C oxidase subunidade I (COI), chamado de DNA barcode. Esta região é importante para facilitar inventários de biodiversidade e realizar identificação de espécies. O fragmento 5' do COI parece ser uma excelente ferramenta para estudos de insetos de importância médica, bem como estudos que requerem a rápida e acurada identificação de espécies que estão presentes na transmissão da área, além de revelar espécies crípticas em estudos sobre flebotomíneos (AZPURUA et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2014).

Apesar de muitas demonstrações da efetividade do DNA barcoding em outros taxa, poucos estudos em flebotomíneos, no Brasil, tem utilizado esta metodologia como uma ferramenta molecular válida para identificação de espécies e para revelar espécies crípticas (GUTIÉRREZ et al., 2014).

Recentemente, um estudo usando a região Barcode do COI foi realizado em populações de *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia umbratilis* da Amazônia Brasileira (SCARPASSA; ALENCAR, 2013). O resultado demonstrou que esta região constitui uma

ferramenta valiosa na identificação destas espécies que são consideradas muito próximas e sugeriu que *Lu. anduzei* apresentou uma alta diversidade de haplótipos e evidências na estrutura genética, demonstrando a necessidade de mais estudos de genética de populações em torno desta espécie. Para confirmar os achados observados em 2013, Scarpassa et al. (2015) observaram em estudos de diversidade genética e estrutura de populações de *Lu. anduzei* que esta, de fato, apresenta altos níveis de diversidade genética, sendo maior que os observados em *Lu. umbratilis*, sugerindo que *Lu. anduzei* é geneticamente mais diversificado.

Em análises taxonômicas do complexo *Lu. umbratilis*, análises filogenéticas mostraram que o marcador molecular COI utilizado no estudo apresenta alta capacidade discriminatória, demonstrando a presença de dois clados dentro de populações da região da Amazônia Central e do Nordeste do Brasil (DE SOUZA FREITAS et al., 2015, 2016).

A existência de espécies crípticas no complexo *Lu. longipalpis* foi observada em estudos utilizando marcadores moleculares e morfológicos em populações da América Central e do Sul, levando a identificação do *Lu. pseudolongipalpis* (ARRIVILLAGA; FELICIANGELI, 2001), formalmente reconhecido como o primeiro táxon do complexo *Lu. longipalpis* (SOARES; TURCO, 2003). Um pouco mais tarde, foi sugerido que *Lu. cruzi* deveria ser considerado uma espécie críptica dentro do complexo *Lu. longipalpis* (VIGODER et al., 2010).

No Brasil, a presença do complexo *Lu. longipalpis* foi proposta pela primeira vez por Mangabeira (1969), baseado no número de manchas pálidas no abdômen, uma mancha (1S) ou duas manchas (2S), visíveis nos tergitos abdominais. Análises de feromônio sexual de machos e dos sons liberados durante a cópula, bem como marcadores microssatélites e genes de especiação, forneceram mais uma evidência do complexo de espécies de *Lu. longipalpis* (BAUZER et al., 2010). O *period gene* (*per*) controla o ritmo biológico e inicia o papel central na atividade de eclosão e de locomoção dos insetos (HARDIN et al., 1990). *Per* tem sido utilizado em estudos de moscas de frutas e demonstrado ser um marcador eficiente, especialmente quando se trata de identificação de espécies crípticas (SAWYER et al., 2006).

Em flebotomíenos, *per* tem sido utilizado em estudos de genética de populações para identificar possíveis membros do complexo *Lu. longipalpis*, no Brasil. Combinado com outros marcadores como, marcadores comportamentais (sons liberados durante a cópula e tipo de feromônio sexual produzido), análises de variabilidade de *per* sugeriram a existência de dois grupos de populações de *Lu. longipalpis*, no Brasil. Um grupo apresenta uma mancha (1S) nos tergitos abdominais, porém com diferentes produções de feromônio e padrões de pulsação dos sons e, o segundo grupo, com duas manchas (2S), é representado por uma única espécie

no Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil. Machos deste grupo produzem sons tipo Burst e o feromônio cembreno-1 (ARAKI et al., 2009).

A região Nordeste do Brasil é a região com maior incidência de casos de leishmaniose visceral (BRASIL, 2016). Sendo assim, estudos demonstraram a presença de pelo menos duas espécies irmãs dentro do complexo *Lu. longipalpis* (ARAKI et al., 2009; LINS et al., 2012; SILVA et al., 2011).

Assim, marcadores genéticos relacionados com as manchas abdominais pode realmente ser uma ferramenta importante para a taxonomia molecular do complexo *Lu. longipalpis*, especialmente relacionadas aos estudos eco-epidemiológicos para avaliar a capacidade potencial do vetor entre populações distintas.

A análise genética utilizando o gene *per* revelou pela primeira vez uma estruturação geográfica moderada entre populações de *Lu. longipalpis*, e uma variabilidade significativa entre os fenótipos 1S e 2S. Este resultado ressalta a importância do *per* como um importante marcador Barcode para as populações de *Lu. longipalpis* (LIMA COSTA et al., 2015).

Diante do exposto acima observa-se que algumas populações de flebotomíneos vêm sendo exaustivamente estudadas para elucidar sua existência como espécies crípticas. No entanto, poucos estudos específicos utilizando populações de *Lu. migonei* foram realizados, no intuito de esclarecer a existência de mais uma espécie críptica dentro da subfamília Phlebotominae. Ao observar a ampla distribuição geográfica desta espécie, Vigoder et al. (2010) sugeriram que este fato poderia contribuir para diferenciação da população e especiação devido ao isolamento geográfico e adaptação local e, utilizaram os sons liberados durante a cópula como importante marcador para verificar a possibilidade de um complexo de espécies envolvendo *Lu. migonei*. Neste mesmo estudo observaram que machos desta espécie também produziam sons durante a cópula, similar a espécie *Lu. longipalpis*. Estes sons apresentam pequenos pulsos (6-8 pulsos) com um intervalo inter-pulso em torno de 26 ms. Diante do resultado, os autores sugeriram a possibilidade de *Lu. migonei* pertencer a um complexo de espécies, bem como a necessidade de mais esforços incluindo análise de exemplares de áreas com transmissão de leishmaniose visceral para elucidar se de fato esta espécie pertence ou não a um complexo.

2.1.2 Morfologia, biologia e ecologia

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, apresentando as fases de ovo, quatro estágios larvais pupa e adulto. As larvas vivem em locais úmidos, ricos em matéria orgânica

em decomposição e ao abrigo de luz. Os locais de criação das larvas são pouco conhecidos e de difícil acesso. Desta forma a maioria das formas de controle deste inseto está focada nas formas adultas. Os ovos são elípticos, escuros e apresentam protuberâncias formando desenhos que são importantes do ponto de vista taxonômico. As larvas são vermiformes com cerdas em todo o corpo e longas cerdas caudais, apresentando a cápsula cefálica bem desenvolvida. As larvas apresentam quatro estádios de desenvolvimento (larva 1–4) e ao final do último estágio, elas abandonam o ambiente úmido onde se desenvolvem, buscando locais mais secos para pupar (FORATINI, 1973).

Os adultos medem em geral de 2 a 4 mm de comprimento e apresentam o corpo densamente coberto por pêlos finos e algumas vezes possuem escamas intermescladas sobre as asas e esternitos abdominais. Estes dípteros apresentam o abdômen composto por 10 segmentos, com os três últimos modificados para formar a genitália externa. Nas fêmeas os segmentos abdominais 8-10 acham-se telescopados para dentro do segmento 7. A genitália masculina externa deriva do nono segmento abdominal e também é importante para identificação das espécies (WILLIAMS, 2002).

As fases larvais dos flebotomíneos alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo, enquanto os adultos de ambos os sexos, se alimentam de açúcares de plantas. Somente as fêmeas adultas são hematófagas, sendo o alimento importante para a maturação dos ovos (FORATTINI, 1973). Embora os hábitos alimentares das formas imaturas de flebotomíneos sejam conhecidos, pouco se sabe sobre os seus criadouros naturais. Larvas têm sido encontradas em ambientes domésticos (fendas de chão e paredes, porões de casas e construções abandonadas), peridomésticos (tocas de animais, latrinas, debaixo de pedras, aterros) e silvestre (cavernas, formigueiros, raízes tubulares, toca de roedores). O conhecimento mais específico desses sítios de criação pode facilitar o controle desses insetos (FELICIANGELI, 2004).

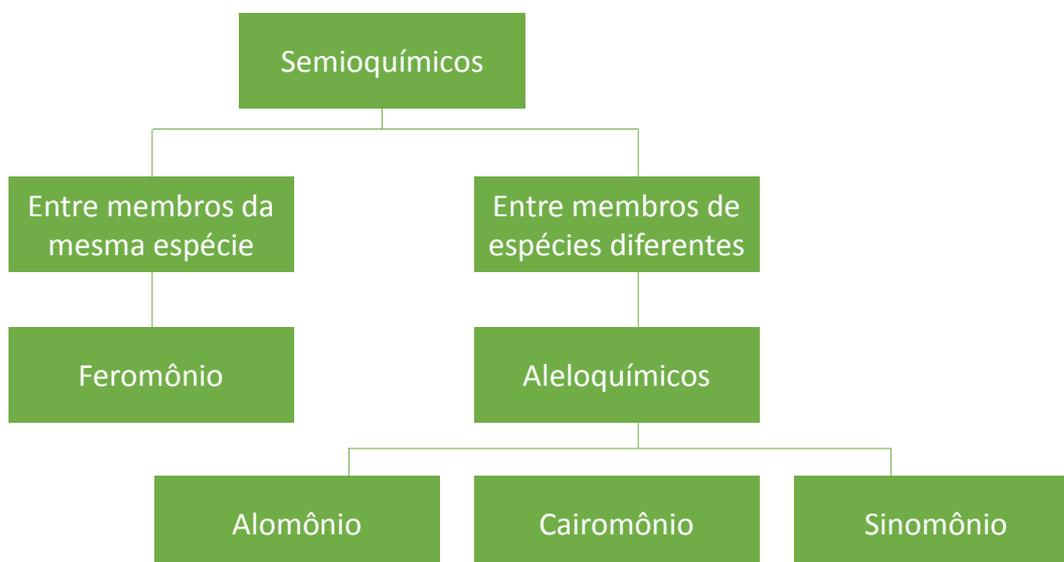
Os adultos apresentam dimorfismo sexual e possuem uma dieta rica em carboidratos. Os açúcares são as fontes de energia destes insetos. O hábito de hematofagia é exclusivo das fêmeas, que utilizam o sangue dos vertebrados como fonte protéica para maturação dos ovos. A postura ocorre alguns dias após o repasto sanguíneo e vários fatores podem estar envolvidos na oviposição, entre eles um complexo de interações ambientais, físicas e químicas (NIEVES et al., 1997). Estudos sobre fatores físicos revelaram que a temperatura e umidade relativa são importantes na regulação do comportamento de oviposição. Além disso, observou-se que o substrato de oviposição estimula uma resposta tigmotrópica em fêmeas grávidas de flebotomíneos (EL NAIEM; WARD, 1992). El Naiem e Ward (1990, 1991), ao

pesquisar a existência de feromônio de oviposição observaram a existência destes em ovos de *Lu. longipalpis*. Este feromônio foi isolado das glândulas de feromônio de fêmeas e é secretado nos ovos durante a oviposição (NIEVES et al., 1997).

2.1.3 Comunicação química

Os sentidos químicos são, provavelmente, um dos primeiros sentidos a ter evoluído e todas as formas de vida celular das bactérias aos animais são sensíveis à informação química. As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre dois organismos são denominadas semioquímicos. Este termo engloba não somente as substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informações (infoquímicos), mas também as toxinas e nutrientes. Se a comunicação for intraespecífica, as substâncias químicas são chamadas de feromônios. No entanto, se a comunicação ocorrer em espécies diferentes (interespecíficas), as substâncias químicas empregadas são chamadas de aleloquímicos (VILELA; DELLA-LÚCIA, 2001) (Figura 1).

Figura 1- Representação esquemática dos semioquímicos.



Fonte: Elaborado pela autora

Os aleloquímicos podem ser divididos em:

- a) **Alomônio:** substância ou mistura química de substâncias, usada em

comunicações interespecíficas. Evoca uma resposta que é adaptativa favorável ao emissor, porém não para o receptor. Geralmente são compostos utilizados para defesa da espécie;

b) **Cairomônio:** usada na comunicação interespecífica. Evoca uma resposta que é adaptativa, favorável tanto para o emissor quanto para o receptor. Ex: substâncias produzidas por uma presa e que são percebidas pelo receptor;

c) **Sinomônios:** usada em comunicações interespecíficas. Evoca uma resposta adaptativa, favorável para o emissor e receptor. Ex: odores florais, associados aos seus polinizadores;

d) **Antimônio:** substância adquirida ou produzida por um organismo que quando em contato com outro indivíduo de outra espécie, provoca uma resposta comportamental ou fisiológica mal adaptativa a ambos, emissor e receptor. Ex: substâncias presentes no pólen ou néctar de algumas plantas;

e) **Apneumônio:** substância química emitida por material inerte que evoca uma resposta comportamental ou fisiológica adaptativamente favorável ao receptor, porém deletéria ao organismo de outra espécie que possa ser encontrado em ou sobre o material inerte. Ex: atração do parasitóide pelo odor da farinha de aveia onde se encontra seu hospedeiro.

2.1.3.1 Feromônios

O termo feromônio foi proposto por Karlson e Butenandt (1959) para designar a classe de compostos químicos que permitem a comunicação entre membros da mesma espécie. O termo deriva do Grego *pherein* (carregar, transferir) e *horman* (excitar, estimular) (TILLMAN et al., 1999).

Os insetos são exímios usuários de sinais químicos, os quais desempenham papéis diversos e fundamentais na transferência de informações entre indivíduos da mesma espécie ou de espécie diferente. De fato, é provável que nenhum outro grupo de animais tenha feito uso de forma tão sofisticada de compostos químicos de sinalização na sua biologia (MACNEIL; MILLAR, 2012).

Feromônios e hormônios são distintamente diferentes. Os hormônios são produzidos nas glândulas endócrinas e lançados internamente para agir sobre um tecido alvo no interior do organismo, e os feromônios são produzidos nas glândulas e são descarregados em dutos externos (REGNIER; LAW, 1968).

Os feromônios afetam o sistema nervoso central em dois diferentes mecanismos. Uma classe dos compostos causa uma resposta comportamental imediata e o outro tem um efeito retardado no comportamento, sendo esta resposta retardada uma mudança fisiológica induzida pelos feromônios. Estímulos químicos que iniciam respostas comportamentais imediatas são chamados de desencadeadores enquanto aqueles que induzem respostas atrasadas são referidos como preparadores (REGNIER; LAW, 1968).

A natureza da comunicação química entre animais isolados requer que os feromônios sejam voláteis e, portanto, sujeitos às leis da difusão gasosa. Os feromônios são na maioria dos casos liberados das glândulas exócrinas como líquidos que se evaporam para o ar e formam uma nuvem de vapor sobre o animal como forma de sinalização (BOSSERT; WILSON, 1963). À distância através da qual um feromônio pode transmitir uma mensagem está relacionada com a função da volatilidade do composto, estabilidade no ar, velocidade de difusão, eficiência olfativa do receptor, e, claro, as correntes de vento. Estes compostos causam reações comportamentais ou fisiológicas específicas em um ou mais indivíduos da mesma espécie e apresentam um papel importante de mediador de comunicação em bactérias, protozoários, plantas e animais em seus ambientes (TILLMAN et al., 1999). O sistema de feromônios de insetos tem provado ser uma das mais ricas fontes intelectuais para a ecologia química.

Ao longo das últimas quatro décadas, uma extensa pesquisa sobre feromônios de insetos resultou na química e/ou elucidação do comportamento dos componentes de feromônio de mais de 1.500 das cerca de 875.000 espécies descritas de insetos (DALY et al., 1998). Os sistemas de feromônios de insetos caracterizam-se por misturas de componentes múltiplos com frequência de isômeros geométricos ou ópticos que podem em certos sistemas, funcionar de forma sinérgica (BORDEN et al., 1976).

Embora as estruturas de feromônios de insetos representem uma mistura de funcionalidades químicas, os compostos de feromônios podem ser classificados em seis grupos comportamentalmente funcionais: sexuais, de agregação, de dispersão, alarme, recrutamento (trilha), e maturação. No entanto, este trabalho irá focar nos feromônios sexuais (TILLMAN et al., 1999).

2.1.3.1.1 Feromônios sexuais

Os feromônios de atração sexual são utilizados por um grande número de insetos para atrair os sexos opostos para o acasalamento, podendo ser produzidos pelo macho, pela

fêmea ou por ambos. Estes feromônios normalmente são liberados apenas quando o inseto está pronto para o acasalamento. Em alguns casos, os feromônios de atração sexual já são suficientes para produzir o acasalamento, mas frequentemente a visão, os sons e os odores também são importantes. Em geral este tipo de feromônio é constituído de mais de um componente químico. A interferência química é evitada visto que espécies diferentes usualmente utilizam códigos diferentes para se comunicar, ou seja, utilizam componentes diferentes em proporções específicas para formar trilhas de odor específicas (BAKER, 1990; UNBEHEND et al., 2014).

Este tipo de feromônio pode ser efetivo a partir de centenas de metros ou até quilômetros. Feromônios voláteis que carregam mensagem para longas distâncias são liberados por diferentes mecanismos e estruturas quando comparados aos feromônios de contato de curta distância. O método simples que é utilizado para liberação dos feromônios voláteis é através da evaporação passiva do feromônio a partir de uma glândula de superfície exposta, porém mesmo assim adaptações comportamentais e morfológicas específicas tornam o processo ainda mais eficiente (AYASSE et al., 2001; JOHANSSON; JONES, 2007).

O uso de feromônios voláteis para atração em longas distâncias tem sido extensivamente estudado em Lepidopteras. Glândulas de feromônio de fêmeas são de origem ectodermal e são encontradas em associação próxima com as cutículas. Como visto em muitas espécies de mariposas podem estar escondidas em locais tais como as dobras das membranas intersegmentares de segmentos abdominais, no entanto, a localização varia de acordo com a espécie. Glândulas de feromônio de fêmeas da espécie *Tryridopteryx ephemeraefirmis* são encontradas no tórax ao invés das membranas intersegmentares do abdômen (ROELOFS; WOLF, 1988).

Em fêmeas de afídeos, os feromônios sexuais são produzidos nas glândulas da tíbia das pernas metatorácicas, ao passo que o feromônio sexual de fêmeas de moscas domésticas é produzido por células oenócitas associadas com a cutícula abdominal, e transportadas para a superfície cuticular, local da liberação. A maioria das glândulas de feromônio é endócrina e faltam distintos reservatórios, sendo assim os produtos dos feromônios são liberados à medida que são sintetizados (MCCLURE et al., 2007).

Feromônios sexuais são usualmente emitidos em um tempo específico do dia ou da noite, sendo um dos mecanismos utilizados para limitar as respostas pelos machos de espécies congêneres. Pode-se dizer que este mecanismo é governado por um ritmo circadiano endógeno que pode persistir por diversos dias sob contínua escuridão. No entanto, a respeito do ritmo circadiano endógeno o tempo para as fêmeas virgens sinalizarem sua aptidão para o

acasalamento pode ser modificado pela prevalência de condições abióticas (TILLMAN, 1999).

Feromônios sexuais não voláteis também iniciam um papel importante no acasalamento em curtas distâncias. Estes compostos são subconjuntos de lipídeos cuticulares que protegem os insetos da dessecação. Eles são provavelmente sintetizados nas células oenócitas juntamente com outros hidrocarbonos cuticulares e, se espalham pela superfície corporal. Assim, quando as antenas dos machos tocam qualquer parte da fêmea, os machos podem imediatamente reconhecê-la como fêmea da mesma espécie (MAHAMAT; HASSANALI, 1998).

Fêmeas de *Drosophila* estimulam o comportamento da cópula de machos de mesma espécie com um feromônio composto de hidrocarbonos cuticulares. Estes feromônios apenas são detectados pelas antenas, tarso ou partes bucais quando os machos se aproximam ou entram em contato direto com a fêmea. Uma vez iniciada a cópula, a fêmea receptiva expulsa o oviduto e produz um líquido que estimula ainda mais o macho (REGNIER; LAW, 1968).

Machos de afídeos parasitóides, *Aphidius ervi* e *Aphidius nigripes* iniciam um vôo contra o vento em direção a fêmeas virgens a vários metros de distância, porém uma vez muito próximo os machos exibem um ritual de acasalamento que inclui batida das asas. O primeiro passo envolve um feromônio de longa distância, enquanto que o segundo é iniciado por um feromônio de curto alcance na cutícula da fêmea, sendo que este só atua em pequenas distâncias (GLINWOOD et al., 1999; MCNEIL; BRODEUR, 1995).

Em flebotomíneos, a espécie *Lu. longipalpis* forma um leque sobre ou próximo a hospedeiros vertebrados, no qual machos adultos produzem tanto feromônio sexual quanto de agregação (SPIEGEL et al., 2011). Em *Phlebotomus papatasi* o contato entre machos e fêmeas durante a cópula é feito frequentemente com a ponta das patas ou das antenas. A função deste comportamento é desconhecida, mas têm sido implicada na transferência e recepção de hidrocarbonetos cuticulares (BRAY; HAMILTON, 2007), sinais químicos importantes no comportamento de acasalamento de determinados insetos (HOWARD; BLOMQUIST, 2005). A presença de hidrocarbonetos cuticulares foi relatada em *P. papatasi* com diferenças nos perfis de hidrocarbonetos encontradas entre espécies, populações e sexos (PHILLIPS et al., 1990). Por isso, é perfeitamente concebível que *P. papatasi* possa usar essa informação para reconhecer e, talvez, discriminar parceiros potenciais.

Ao observar machos e fêmeas de *P. papatasi* durante o comportamento de cópula verificou-se que as patas dianteiras de ambos os sexos permaneciam em contato, sugerindo-se a possibilidade do contato com partes bucais e antenas. Este mecanismo utilizado pode

sinalizar a transferência de feromônio de agregação do seu local de produção, o que sinalizaria aos machos a intenção de alimentação ao invés de acasalamento (CHELBI; BRAY, HAMILTON, 2012).

Outro mecanismo durante a cópula de *P. papatasi* é o toque das genitálias de ambos os sexos. A batida das asas é um comportamento bastante comum durante o acasalamento em flebotomíneos, sendo observadas em espécies do Novo e Velho Mundo (BRAY et al., 2010). Tanto em *P. papatasi*, quanto em *Lu. longipalpis*, a batida das asas é realizada por ambos os sexos: os machos batem as asas quando se aproximam das fêmeas, desencadeando breves batidas de asas exibida pela fêmea, o que prevê o início da cópula. Na espécie *Lu. longipalpis* a batida das asas pelos machos tem função na dispersão do feromônio sexual, além de produzir sinais auditivos que podem funcionar no reconhecimento do companheiro. Estes sinais copulatórios não se restringem a *Lu. longipalpis*, e recentemente foram observados em *Lu. cruzi*, *Lu. migonei* e *Lu. intermedia* (CHELBI; BRAY; HAMILTON et al., 2012).

Por estas características observadas no comportamento de flebotímenos, a ecologia química de algumas espécies, em especial *Lu. longipalpis*, tem recebido atenção particular porque os feromônios sexuais produzidos pelos machos parecem ser bons marcadores de membros do complexo de espécies (HAMILTON et al., 2005; WARD et al., 1983; WATTS et al., 2005) e devido a possibilidade destes tipos de feromônios poderem ser utilizados em um monitoramento mais seletivo e eficiente e/ou em armadilhas de controle (HAMILTON; KRISHNAKUMARI, 2004).

Mangabeira (1969) foi um dos primeiros a discutir o status taxonômico de *Lu. longipalpis*, no Brasil. Ele observou que machos coletados no estado do Ceará e Pará diferiam quanto ao número de manchas presentes nos tergitos abdominais. Machos provenientes do Ceará apresentavam dois pares de manchas claras no terceiro e quarto tergito (Figura 2), enquanto que machos capturados do Pará possuíam um par de manchas claras no terceiro tergito. Esta variabilidade morfológica também foi investigada por Ward et al. (1983), no qual demonstraram um isolamento reprodutivo entre indivíduos com um par e dois pares de manchas. Estes achados foram base para suportar a hipótese de que *Lu. longipalpis* pertencia a um complexo de espécies. A partir de então, uma série de estudos para clarear o status taxonômico desta espécie foram empregados (LINS et al, 2012; SANTOS et al, 2013).

Figura 2- Mancha pálida no IV tergito abdominal de macho adulto de *Lu. longipalpis*.



Fonte: Spiegel et al. (2002)

Lane e Ward (1984) observaram por microscopia eletrônica de varredura que a superfície dos tergitos nas áreas com manchas pálidas era caracterizada pela ausência de macrotríquias e presença de pequenas pápulas. Após análise histológica por microscopia óptica constatou-se que as manchas pálidas correspondiam a um tecido esponjoso subcuticular (LANE; BERNARDES, 1990). A partir de então, sugeriu-se que estas manchas seriam o local de secreção de feromônios, muito provavelmente, feromônio de atração sexual. As pequenas pápulas na cutícula correspondiam ao local de liberação de feromônio, visto que as glândulas de feromônio em insetos estão associadas a poros cuticulares que permitem o transporte do feromônio da glândula à superfície cuticular (PERCY-CUNNINGHAM; MACDONALD, 1987). A confirmação de que seria um local de saída de feromônio veio com observações de que os machos vibram suas asas rapidamente durante a corte e a copulação, o que poderia ser um comportamento que aumentaria a dispersão do feromônio.

2.1.3.2 Biosíntese de feromônio em insetos

Embora exista muito conhecimento no que se referem aos atributos químicos e comportamentais dos sistemas de feromônios de insetos, as investigações sobre a biossíntese de feromônios, a regulação endócrina da biossíntese, e os eventos moleculares envolvidos foram mais recentes e de âmbito limitado. Estas investigações vêm ocorrendo nas últimas duas décadas, com ênfase nos feromônios sexuais e de agregação nos modelos de blatódeos, coleópteros, dípteros e lepidópteros. Diversas pesquisas nas espécies mais representativas dessas ordens foram conduzidas por conta de suas importâncias econômicas e grande quantidade de feromônio produzidas pelas mesmas (CARDE; MINKS, 1997).

Enquanto que a extrema abundância e diversidade de espécies nessas quatro ordens (Blattodea, 4.000 espécies; Coleoptera, 300.000 espécies; Diptera, 150.000; Lepidoptera, 150.000), necessariamente impedem generalizações, um conhecimento do controle bioquímico e endócrino da produção de feromônios está começando a surgir para modelos de espécies de cada uma dessas ordens supracitadas. Levando-se em consideração o local do tecido produtor de feromônio nos insetos, a biosíntese de feromônios, ultimamente, depende de certa regulação da atividade biosintética enzimática nesses tecidos e/ou de uma regulação na expressão do gene da biosíntese enzimática nos tecidos já referidos (TILLMAN et al., 1999). Neste tópico o foco será na ordem Diptera.

Os dípteros utilizam feromônios de curto alcance ou feromônios sexuais de contato que consistem em uma longa cadeia de hidrocarbonetos e compostos relacionados que fazem parte da camada de cera da cutícula. Os componentes de feromônios, os quais são sintetizados pelos mesmos mecanismos gerais que são usados para produzir a longa cadeia e ramificada de metil hidrocarbonetos cuticulares, são importantes no equilíbrio da água. O feromônio da mosca doméstica, (Z)-9-tricoseno e homólogos são produzidos por sucessivas adições de malonil CoA (derivado do aminoácido valina) ao acetil CoA por uma síntese de ácido gordo para dar o octadecanoil CoA de 18 carbonos (MCNEIL; MILLAR, 2012).

Hidrocarbonetos saturados metil ramificados também são encontrados como componentes de feromônio de flebotomíneos, com as ramificações metil a serem introduzidas por reação da cadeia de crescimento com metilmalonil CoA ao invés de malonil CoA (MCNEIL; MILLAR, 2012).

Em flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, sabe-se que o principal componente químico de feromônio pertence à classe dos terpenos, tendo quatro terpenos distintos sendo identificados, dois dos quais já completamente caracterizados a ter 16 carbonos (homosesquiterpenos) e dois compostos com 20 carbonos (diterpenos) (HAMILTON et al., 2005, 2008).

Compostos terpeno são um dos amplos grupos de produtos naturais que possuem um papel significativo como repelentes ou atraentes para muitos organismos (LANGENHEIM, 1994). São derivados do precursor isoprenil difosfato de 5 carbonos (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (CANE, 1999). Estes compostos são produzidos por uma rota metabólica celular, a rota mevalonato ou a rota mevalonato dependente (MAD) (GOLDSTEIN, 1990), os quais estão presentes em muitos eucariotos e bactérias. Alternativamente, IPP e DMAPP também podem ser produzidos através de uma rota diferente, a rota metileritritol fosfato (MEP), também conhecida como rota deoxisilulose

fosfato (DOXP), o qual opera em muitas bactérias, plantas cloroplastos e alguns parasitas eucarióticos (EISENREICH et al., 2004; GONZÁLEZ-CABALLERO et al., 2013). Em insetos, diversos estudos da rota mevalonato têm sido realizados devido ao seu importante papel em bioativar moléculas como hormônios juvenis e feromônio de agregação (BELLÉS et al., 2005).

2.1.3.3 *Glândulas produtoras de feromônios em insetos*

Feromônios sexuais são frequentes nos insetos e parecem ser uma alternativa para o controle dos vetores que transmitem doenças a humanos e animais, além de pestes agrícolas. Estes químicos são produzidos por células glandulares nos tecidos epidérmicos, estando usualmente concentrado em discretas áreas sob a superfície cuticular (SPIEGEL et al., 2002). A cutícula pode ser ornamentada com uma variedade de modificações estruturais, permitindo assim um aumento na área de superfície para evaporação dos feromônios (WARD et al., 1993).

A distribuição das glândulas no corpo e as substâncias produzidas apresentam grande diversidade. Essas glândulas são formadas por células secretoras epidérmicas concentradas em áreas discretas abaixo da cutícula, localizadas entre ou nos próprios segmentos abdominais. Entretanto, em algumas espécies as células glandulares encontram-se espalhadas pela epiderme em diferentes partes do corpo, como nos segmentos tarsais, associados às mandíbulas ou em segmentos torácicos. De acordo com Noirot e Quenedey (1974), as células secretoras em insetos são divididas em três classes:

- a) **Classe 1:** A célula está em contato direto com a cutícula pela qual a secreção deve atravessar. A cutícula pode estar modificada de acordo com a liberação e o armazenamento da secreção. Estas células não possuem um reservatório e o feromônio é liberado diretamente após sua síntese. Em alguns casos, a glândula pode se abrir em uma invaginação da epiderme que pode servir como um reservatório onde o feromônio se acumula;
- b) **Classe 2:** As células desta classe não estão em contato direto com a cutícula e a secreção deve passar através das células da classe 1 antes de atravessar a cutícula. Este tipo de glândula não é muito comum;
- c) **Classe 3:** As células são compostas por várias células e por um duto cuticular que conecta a célula glandular à cutícula. A secreção passa através deste duto para

ser liberada ao exterior.

As glândulas de feromônio em insetos geralmente pertencem às classes 1 ou 3. O controle da liberação dos feromônios para o meio ambiente envolve a regulação de dois fatores: síntese e dispersão. Quando a glândula não está associada a um reservatório, a síntese é seguida diretamente pela dispersão. Entretanto, quando um reservatório está presente o feromônio pode ser estocado e a síntese e dispersão podem ser temporariamente independentes (NOIROT; QUENNEDEY, 1974). De acordo com Tillman et al. (1999), os fatores endócrinos usualmente regulam a síntese de feromônios em insetos.

Todos os precursores para a biossíntese de feromônio podem ser atribuídos ao carbono proveniente da ingestão dietética. Sendo assim, os feromônios podem ser sintetizados *de novo* nas células glandulares ou podem ser derivados de precursores presentes na alimentação. Em alguns casos, os microrganismos simbiotes podem contribuir para a síntese (TILLMAN et al., 1999).

As estruturas disseminadoras de feromônios sexuais têm sido observadas em machos adultos de diversas espécies de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae), com aspectos de cratera, com emersão de espinhos ou pápulas mamiformes (WARD et al., 1993). Essas estruturas estão normalmente localizadas em manchas pálidas encontradas em diferentes tergitos abdominais de acordo com cada espécie. (LANE; SOUZA BERNARDES, 1990; SPIEGEL et al., 2002; WARD et al., 1993).

Em torno de 740-1200 estruturas disseminadoras de feromônio estão presentes em machos de *Lu. pessoai*, distribuídos entre o III e VII tergitos abdominal. Uma das funções deste feromônio é atrair as fêmeas para o local de acasalamento. Em *Lu. longipalpis*, os machos apresentam manchas pálidas no IV segmento abdominal ou no III/IV, dependendo da população deste complexo e da área estudada.

Em meados da década de 80, Lane e Ward (1984) observaram por microscopia eletrônica de varredura que a superfície dos tergitos nas áreas com manchas pálidas na espécie *Lu. longipalpis*, era caracterizada pela ausência de macrotríquias e pela presença de pequenas pápulas de 3-3,5 μm de diâmetro com um poro central de 0,25 μm de diâmetro. Estas pápulas, na época, foram sugeridas como os locais de secreção e liberação dos feromônios, provavelmente os de atração sexual, visto que as glândulas de feromônio em insetos estão invariavelmente associadas a poros cuticulares que permitem o transporte destes à superfície cuticular (PERCY-CUNNINGHAM; MACDONALD, 1987). Extrações dos tecidos em hexano e subsequente análise dos componentes em espectrometria de massa e cromatografia líquida

identificaram dois compostos distintos: um homosesquiterpeno e um diterpeno (LANE et al., 1985; LANE; SOUZA BERNARDES, 1990; PHILLIPS et al., 1986;):

a) Homosesquiterpenos (C₁₆H₂₆) PM 218:

- 3-metil- α -himacaleno: encontrado nas populações de Jacobina-BA (HAMILTON et al., 1999a);

- 9-metilgermacreno-B: encontrado nas populações da gruta da Lapinha e de Montes Claros-MG e em Sobral- CE (HAMILTON et al., 1999b).

b) Diterpeno (C₂₀H₃₂) PM 272: caracterizado como um cembreno, sendo apenas encontrado em populações do Nordeste do Brasil (Sobral-CE, Santarém e Ilha do Marajó-PA, Natal-RN e Maceió-AL). Outro diterpeno, porém com diferente tempo de retenção na cromatografia e espectrometria de massa foi identificado na população de Jaíbas-MG (HAMILTON et al., 2004).

Ambos os compostos são similares a feromônios utilizados por outros insetos. Sendo assim, ao analisar o extrato das glândulas em ultraestrutura verificou-se que as mesmas eram biologicamente ativas (MORTON; WARD, 1989), confirmando que os feromônios são um componente importante no comportamento da cópula desta espécie em conjunto com os sons liberados durante o acasalamento (WARD et al., 1988). Posteriormente observou-se que as relações de cruzamento estão associadas aos semioquímicos independente da morfologia e que são produzidos por glândulas terçais abaixo das manchas pálidas (glândulas de feromônio). A comunicação química em conjunto com os sons liberados durante a cópula representa uma barreira pré-zigótica não geográfica, tendo um papel importantíssimo no mecanismo de isolamento de espécies de flebotomíneos estritamente relacionadas (HAMILTON et al., 2004).

Fêmeas de *Lu. cruzi* e *Lu. longipalpis* são indistinguíveis morfológicamente e ambas as espécies de machos apresentam manchas pálidas nos seus tergitos abdominais com estruturas de disseminação de feromônio similares a pequenas pápulas, quando observado em microscópio eletrônico de varredura (SPIEGEL et al., 2002). Machos de *Lu. cruzi* tem produzido feromônio, o 9-metilgermacreno-B (BRAZIL; HAMILTON, 2002) o qual também é o feromônio de uma das populações de espécies do complexo *Lu. longipalpis*.

Estudo utilizando microscópio eletrônico de transmissão revelou que as glândulas de feromônio *Lu. cruzi* estão agrupadas no IV tergito abdominal, como descrito em *Lu. longipalpis* (LANE; SOUZA BERNARDES, 1990). As células das glândulas secretoras de feromônios apresentam características típicas, tais como um grande número de mitocôndrias e

a formação de microvilos na membrana plasmática apical, formando assim um pequeno reservatório secretor. Este reservatório está conectado com o exterior através de um curto ducto cuticular (SPIEGEL et al., 2004).

Por outro lado, em machos adultos de *Lu. lenti* e *Lu. carmelinoi*, as estruturas de disseminação de feromônio estão presentes no V e VI segmento tergal. Embora as manchas pálidas não possam ser observadas pelo esteromicroscópio, os tergitos abdominais onde as glândulas estão localizadas parecem ser opacas, quando comparadas com outros tergitos abdominais. As estruturas disseminadoras de feromônio possuem o formato de uma maçã contendo um poro central (SPIEGEL et al., 2002).

Em *Lu. renei*, apenas uma simples estrutura disseminadora de feromônio pôde ser observada, na região anterior do VI seguimento tergal, parecendo com uma pequena elevação rodada com um poro central (SPIEGEL et al., 2002). A espécie *Lu. ovallesi* parece ter saliências com formas irregulares em torno do poro apical da pápula. Embora não se saiba se estas protuberâncias fazem parte da estrutura do poro ou da sua morfologia irregular, é possível que elas sejam uma secreção de cera cuticular. No gênero *Sergentomyia* as pápulas se projetam a partir de um poro central e que, em *S. minuta* são bifurcadas. Curiosamente, pápulas de *S. minuta* estão associados com poros cuticulares que parecem estar em crateras delineadas. Crateras cada um com um poro central mais claramente definidos são vistos em *Lu. quinquefer*, *Lu. sallesi* e *Lu. peruensis*. As pápulas espinhadas de *Sergentomyia* spp. são invertidas como crateras com poros espinhados em *Lu. migonei* e *Lu. furcata* em que o poro é uma abertura estrelada irradiando a partir de uma coluna central (WARD et al., 1993).

Nos últimos anos, os estudos sobre ecologia química de flebotomíneos têm recebido uma atenção especial, principalmente em torno do complexo *Lu. longipalpis*, devido a sua diversidade populacional tornando-o um modelo interessante para pesquisas com relação a componentes enzimáticos e mecanismos de produção de feromônio, no entanto nada se sabe a respeito dos componentes químicos da espécie *Lu. migonei*. Por ser um vetor de ampla distribuição geográfica nas Américas, e por ter um papel importante na transmissão da LTA por *L. (V.) braziliensis*, além de sua provável participação na transmissão da leishmaniose visceral, estudos direcionados para esta espécie são iminentes e podem contribuir não apenas para o controle vetorial em áreas de transmissão da LV, reduzindo a infecção e transmissão aos hospedeiros, mas também para melhor entender o isolamento reprodutivo em torno destes insetos.

2.1.3.4 *Uso do feromônio para monitoramento e controle em insetos*

Nos últimos anos, apesar das pesquisas voltadas para feromônios ter se voltado para o controle de insetos praga (WRIGHT, 1964a, 1964b), o volume de informações obtidas permitiu um melhor entendimento da evolução dos sistemas de acasalamento, comunicação, isolamento reprodutivo e especiação em insetos em geral.

Um dos tipos de feromônio que vem sendo massivamente estudado é o de atração sexual. Este vem sendo muito utilizado na agricultura dentro de programas integrados de manejo de pragas. Para utilizar este tipo de controle é importante conhecer a composição química do feromônio natural emitido, como sua resposta é modulada e quando e onde a comunicação química ocorre no hábitat natural da espécie. Sendo assim, alguns métodos pelos quais os feromônios são utilizados no manejo de insetos compreendem quatro categorias:

2.1.3.4.1 *Monitoramento com armadilhas*

Nas décadas de 1950 e 1960, principalmente nos EUA e na Europa, os focos de infestação e a densidade populacional de pragas agrícolas e florestais eram estimados por meio de armadilhas contendo fêmeas virgens. As armadilhas eram instaladas uma semana antes da emergência da fase adulta dos insetos e vistoriadas a cada dois dias. Os machos capturados eram contados e eliminados, enquanto as fêmeas virgens eram substituídas por outras recentemente emergidas.

No Brasil, essa mesma metodologia foi inicialmente utilizada na fruticultura de clima temperado para o monitoramento da lagarta-enroladeira da maçã *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae), da mariposa-oriental *Grapholita molesta* (Busch) (Lepidoptera: Tortricidae) (KOVALESKI, 1992, 2005) e da traça-dos-cachos da videira *Cryptoblabes gnidiella* (Millière) (Lepidoptera: Pyralidae) (RINGENBERG, 2004), sendo posteriormente substituída pelo emprego de armadilhas de feromônios sexuais sintéticos.

As armadilhas de feromônio sexual sintético para o monitoramento de insetos geralmente são utilizadas para três finalidades (WALL, 1990): a) detectar a presença de insetos; b) conhecer as suas flutuações populacionais; e c) conferir se existe a necessidade de aplicar medidas de controle (BOTTON et al., 2001; KOVALESKI; RIBEIRO, 2002; RINGENBERG, 2004).

As armadilhas de feromônio sexual promovem capturas seletivas, são de baixo custo e capazes de detectar a espécie-praga, mesmo quando incide em baixa infestação. Essas armadilhas têm vantagens quando comparadas às armadilhas luminosas e àquelas que usam atrativos, as quais apresentam inconvenientes de não serem seletivas e de terem necessidade de água, energia ou de outros complementos para seu perfeito funcionamento (BENTO, 2001).

2.1.3.4.2 Captura em massa

Este tipo de captura é uma forma de controle de pragas em que se utiliza grande número de armadilhas de feromônio sexual sintético, com finalidade de atrair e capturar os indivíduos para manter a sua população abaixo do nível de dano econômico (BENTO, 2001; HOWSE et al., 1998). Essas armadilhas devem ser instaladas assim que for detectada a presença da espécie-praga. Uma das vantagens deste método em relação aos outros que usam feromônio sexual sintético está na necessidade de doses menores dessas substâncias.

2.1.3.4.3 Interrupção de acasalamento

Este método tem por objetivo interferir nos processos ou nos mecanismos que atuam sobre a capacidade dos machos localizarem as fêmeas para o acasalamento, desorientando-os pela liberação de feromônio sexual sintético no ambiente.

Os insetos necessitam de pequenas quantidades de feromônio sexual para localizar o seu parceiro. Assim, a liberação de maior quantidade dessas substâncias no habitat do inseto pode dificultar e até impedir a localização do parceiro, causando supressão dos acasalamentos (AGOSTA, 1990).

Todos os métodos supracitados vêm obtendo sucesso no controle de várias pragas na agricultura e oferece inúmeras vantagens sobre o uso de inseticidas, uma vez que os inseticidas causam danos ecológicos, são tóxicos e inespecíficos. O uso dos feromônios no manejo de pragas possui várias vantagens: 1) devido os feromônios serem espécie-específicos, seu uso faz com que as medidas de controle afetem somente a espécie alvo; 2) feromônios não são tóxicos, não prejudicam a saúde dos manipuladores e não interfere na dinâmica populacional de outros organismos não alvos; 3) feromônios são utilizados para controlar ou para levantamento de pragas, mesmo quando a densidade populacional é baixa; 4) feromônios são utilizados em doses bem menores que a maioria dos inseticidas; 5)

feromônios não são aplicados diretamente, contudo são confinados a dispositivos para sua liberação (PLETTNER, 2002).

No entanto, algumas desvantagens podem ser observadas ao usar feromônios para controle de populações. Uma delas é que essas substâncias não protegem contra invasão de novos insetos de campo adjacentes. O uso de feromônio requer que a área destinada ao controle seja isolada de outras áreas com populações da praga. Outra problemática detectada diz respeito à eficiência da técnica de interrupção de acasalamento, sendo esta dependente da densidade populacional; caso esta seja muito grande a ponto que machos e fêmeas se encontrem com frequência, provavelmente este tipo de interrupção não será efetivo para suprimir e manter a praga abaixo dos níveis de dano. Outro problema ocorre em insetos praga onde o sistema de comunicação sexual é duplo, ou seja, machos e fêmeas são responsáveis pela comunicação. Se a interrupção da comunicação química for promovida somente para um canal (machos atraídos por fêmeas), o outro canal pode ser suficiente para promover níveis normais de acasalamento e tornar infrutíferos os esforços de controle. Mais desvantagens podem ser observadas em espécies nativas que tenham feromônio similar ao sintético utilizado para controle da espécie alvo. Caso outra espécie responda ao feromônio, será necessário determinar se as espécies não alvos são raras ou ecológica ou economicamente importante, a fim de decidir se o controle com feromônio pode ser utilizado (PLETTNER, 2002).

O monitoramento e controle de insetos utilizando feromônio sexual são métodos seguros, frequentemente eficientes e economicamente viáveis. Diversos programas de manejo iniciaram o uso de armadilhas de controle contendo feromônios como uma ferramenta indispensável para o monitoramento de populações de insetos de importância agrícola (BENTO et al., 2001). Entretanto, no que concernem os insetos vetores de doenças de importância médico-veterinária, os feromônios tem sido usados com sucesso apenas em alguns insetos, *Musca domestica* (feromônio sexual) e *Periplaneta americana* (feromônio de agregação) (ERIAS, 2001).

No caso dos insetos vetores que transmitem as leishmanioses, pesquisadores demonstraram, recentemente, que é possível melhorar o controle de flebotomíneos através do uso de uma versão sintética do feromônio sexual de *Lu. longipalpis*, (S)-9-metilgermacreno-B. Este feromônio sintético atrai tanto machos quanto fêmeas de *Lu. longipalpis*, prevenindo que estes vetores se desloquem para outros ambientes (BRAY et al., 2010, 2014). Devidamente formulado, este feromônio pode atrair fêmeas alimentandas de *Lu. longipalpis*, para longe de pessoas e cães e para abrigos tratados com inseticida, onde podem ser mortos.

Esta tecnologia pode, portanto, aumentar muito a eficácia de inseticidas em abrigos de animais, reduzindo assim a transmissão da doença (BRAY et al., 2014).

Além do gênero *Lutzomyia*, existe progresso em estudos de comunicação química de outros gêneros de flebotomíneos como *Sergentomyia* e *Phlebotomus*. Ainda que terpenos similares àqueles encontrados no complexo *Lu. longipalpis* tenham sido observados em outras espécies como *S. minuta* e *S. fallax*, seu papel na comunicação de feromônio ou outras funções biológicas não são claras. Por outro lado, estudos têm demonstrado evidências comportamentais para presença de feromônio sexual em *P. papatasi*, sem identificação de estruturas de feromônio (CHELBI; BRAY; HAMILTON, 2012; GONZÁLEZ-CABALLERO et al., 2013; WARD et al., 1991).

3 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses permanecem como doenças negligenciadas em todo o mundo, com mais de 350 milhões de pessoas vivendo sob risco da infecção. Como não existem vacinas para humanos, os esforços para reduzir o número de casos da doença se concentram no tratamento dos pacientes, na eliminação de reservatórios infectados e no controle do vetor através do uso de inseticidas. Embora estes tipos de abordagens tenham alcançado um sucesso parcial, existem dificuldades significativas com cada uma dessas técnicas. O uso destas práticas não impediu a expansão da doença para áreas urbanas, fortalecendo a ideia de que o controle efetivo do inseto vetor é importante para a redução da carga mundial desse agravo. Recentes avanços nas estratégias de controle de vetores têm ajudado a reduzir o impacto em alguns focos da doença. O uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, coleiras repelentes para cães e armadilhas com feromônios, tem sido estratégias eficazes no controle da doença, além de reduzirem o risco de potenciais danos a saúde humana e ao meio ambiente.

Apesar de várias armadilhas com feromônio já estarem sendo usadas no manejo de pragas agrícolas, ainda é insipiente o uso para o controle de vetores transmissores de patógenos para o homem e animais, visto que poucos são os estudos no que se refere a ecologia química desses vetores. Recentemente, armadilhas contendo sachês com feromônio sexual sintético foram testadas para o controle do *Lu. longipalpis* e obtiveram resultados promissores, no qual o feromônio sexual atraiu ambos os sexos para o local do experimento tratado com inseticida (lambdacialotrina), reduzindo assim a população desse vetor. No entanto, não se tem estudos voltados para a ecologia química de muitos outros vetores, como *Lu. migonei*, o que enfatiza a importância dessas pesquisas contribuir não apenas para o controle vetorial em áreas de transmissão da doença, mas também para melhor entender o isolamento reprodutivo de diferentes populações dessa espécie. Ademais, o uso de marcadores moleculares (p.ex.: citocromo oxidase subunidade I) poderia fornecer informações valiosas sobre a genética de diferentes populações de *Lu. migonei* e sobre uma possível relação entre a variabilidade genética e a competência vetorial e/ou produção de diferentes tipos de feromônios.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Descrever os aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lu. migonei* do Brasil.

4.2 Objetivos específicos

- a) Analisar aspectos morfológicos e morfométricos de três populações de *Lu. migonei* provenientes de diferentes regiões do Brasil;
- b) Analisar a variabilidade genética dessas três populações de *Lu. migonei*;
- c) Caracterizar a estrutura disseminadora e a glândula de feromônio de *Lu. migonei*;
- d) Avaliar a atração de fêmeas de *Lu. migonei* a machos coespecíficos na presença de hospedeiros vertebrados.

5 METODOLOGIA

5.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em três municípios de diferentes Estados: Machados (PE), Baturité (CE) e Niterói (RJ). O município de Machados está situado na Zona da Mata Norte, Pernambuco, limita-se ao norte e a oeste com Orobó e, ao sul com São Vicente Férrer, ao sudeste com Bom Jardim e a leste com Vicência. Distante a 105 km da capital, Recife. O município possui 50.957 km² e está localizado nas coordenadas geográficas 07°40'56"S; 35°31'22"O, a uma altitude de 416 m do nível do mar. As vias de acesso são através da BR-232/408; PE-90/089 (AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO, 2016).

O município de Baturité está situado no Estado do Ceará, a 100 km da capital Fortaleza. Limita-se ao norte com Pacoti, Redenção e Guaramiranga, ao sul com Itapiúna, leste com Aracoiaba e oeste com Mulungu e Capistrano. Possui uma área de 308,780 km² e clima tropical úmido, com média de temperatura variando entre 24° a 30° C (IBGE, 2016).

O município de Niterói está situado no Estado do Rio de Janeiro a 13 km da capital com uma área de 129,375 km² e clima tropical úmido. Sua temperatura média é de 22,6°C, sendo 20,2°C a temperatura média do mês mais frio (julho) e 25,6°C do mês mais quente (fevereiro). A pluviosidade tem média de 1.093 mm anuais (IBGE, 2016).

5.2 Populações de flebotomíneos

Os flebotomíneos utilizados da espécie *Lu. migonei*, foram provenientes de duas fontes: coletados em trabalho de campo utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC ou então obtidos de colônia mantida em laboratório. A colônia foi mantida a uma temperatura de 25-26°C, com a umidade relativa em torno de 80%, seguindo procedimentos de Brazil et al. (1997). As coletas de campo foram realizadas pela equipe do Laboratório de Taxonomia e Sistemática de Flebotomíneos do Centro Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE. Os exemplares coletados foram identificados pela morfologia externa conforme classificação taxonômica proposta por Young e Duncan (1994). Utilizaram-se machos de *Lu. migonei* em colônia de laboratório com diferentes idades pós-emergência (24, 72, 120 e 168 horas), além de exemplares da mesma espécie provenientes do campo.

5.3 Morfometria de *Lu. migonei*

Foi analisado um total de 15 exemplares de cada sexo das três populações provenientes de amostras de campo. As fotos foram tiradas utilizando estereomicroscópio com câmera digital conectada em um computador. As imagens foram processadas e as medidas retiradas usando Leica Application Suite version 4.1 software (Leica Microsystems).

Todos os flebotomíneos foram observados sob estereomicroscópio de luz e o comprimento e/ou a largura das principais estruturas dos machos e das fêmeas foram medidas de acordo com Hamilton et al. (2005): comprimento das asas (CA) e largura das asas (LA), bem como comprimento do labrum (CL), terceiro segmento da antena (A3), bomba genital (BG), basistilo (B), estilo (S). Estes caracteres são considerados taxonomicamente relevantes para diferenciação de *Lutzomyia* spp.

5.4 Análise genética das populações de *Lu. migonei*

Após análise morfológica, 46 exemplares de *Lu. migonei* provenientes do campo foram submetidos a estudos genéticos. DNA genômico foi extraído utilizando um método *in-house*. De forma breve, exemplares foram individualmente inseridos em um microtubo de 1,5 mL e homogeneizado usando micropistilo estéril. Então, 400 µg de proteinase K (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) foi adicionado em cada tubo, os quais foram agitados em vortex e incubados por 16 h a 37°C. Depois, 50 µl de solução do precipitado protéico foi adicionado e os tubos foram invertidos diversas vezes e deixado em repouso por 10 min a 4°C. Os tubos foram centrifugados a 13.000 x g por 5 min para separar o sobrenadante (contêm DNA) o qual foi transferido para um microtubo limpo. Em seguida, 300 µl de isopropanil a 100% foi adicionado, sendo homogeneizado por inversão dos tubos por diversas vezes. Após a centrifugação (at 13.000 x g for 5 min), o sobrenadante foi descartado e o pellet deixado a temperatura ambiente (TA) para secar até, posteriormente, ser lavado com 300 µl de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados a 13.000 x g por 1 min e o pellet novamente deixado para secar em T.A por 30 min até ressuspensão com 30 µL de tampão TE. Finalmente, os microtubos foram encubados a 56°C por 15 min para facilitar a homogeneização do DNA e então estocados a -20°C até serem testados por reação em cadeia de polimerase (PCR).

Região parcial do gene *cox1* (710 bp) foram amplificadas usando primers LCO1490 e HCO2198 (FOLMER et al., 1994). Cada reação de PCR consistiu de 4 µl de DNA genômico (~100 ng) e 46 µl do mix de PCR contendo 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH

8,3) e 50 mM KCl, 250 μ M de cada dNTP, 100 pmol de cada primer e 1,25 U of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). O gene *cox1* foi amplificado usando as seguintes condições: 95°C por 10 min (primeira ativação da polimerase e denaturação), seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 min (denaturação); 56°C por 1 min (anelamento), 72°C por 1 min (extensão); e uma extensão final de 72 °C por 7 min.

Produtos de PCR foram examinados em gel de agarose a 2% fixado com GelRed (VWR International PBI, Milano, Italy) visualizado em sistema de documentação de gel, GelLogic 100 (Kodak, New York, USA). Os amplicons foram purificados e sequenciados, em ambas as direções usando os mesmos primers como os da PCR, empregando a Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (v.2, Applied Biosystems) em um sequenciador automático (ABI-PRISM 377). Todos os haplótipos representativos de *Lu. migonei* obtidos serão depositados no GenBank.

5.5 Microscopia eletrônica de varredura

Machos de *Lu. migonei* foram sedados por 5 min a -10°C e fixados com glutaraldeído 2,5% (pH=7,4). Após fixação, os insetos foram lavados em tampão cacodilado 0,1M (pH=7,2) e, então fixados com tetróxido de ósmio por 1 h. As amostras foram desidratadas por um aumento de concentração utilizando solução de etanol e, em seguida introduzidas no ponto crítico para redução ao máximo da temperatura e retirada de todo etanol. Ao finalizar esta etapa, as amostras foram montadas em stubs para, finalmente, serem metalizadas com ouro. O material foi examinado em microscópio eletrônico de varredura EVO LS15 ZEISS (Carl Zeiss Microscopy - Jena, Germany).

5.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Insetos provenientes de colônia mantida em laboratório e do campo foram sedados por 5 min a -10°C e, então fixados por imersão em glutaraldeído 2,5% diluídos em tampão cacodilato 0,1M (pH=7,2). Para permitir uma melhor fixação do tecido, o abdômen de cada exemplar foi dissecado imediatamente após fixação. Estes segmentos foram fixados por 2h em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M (pH=7,2), lavados duas vezes com o mesmo tampão e pós fixado por 1 h em tetróxido de ósmio 1%/0.8% ferricianida de potássio/5 mM CaCl₂, diluído em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Após esta etapa as amostras foram lavadas em tampão, desidratadas em séries graduadas de acetona e embebidas

em Epon. Seções ultrafinas foram fixadas em acetato de uranila e observadas em microscópio eletrônico de transmissão, FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin (FEI Company, OR, USA).

5.7 Bioensaio em laboratório

Bioensaios foram realizados com machos e fêmeas (~ 144 horas após emergência) de *Lu. migonei* provenientes de colônia de laboratório, com finalidade de observar a atratividade das fêmeas às atividades biológicas do feromônio sexual natural dos machos. Este experimento foi realizado utilizando um olfatômetro de tubo em Y.

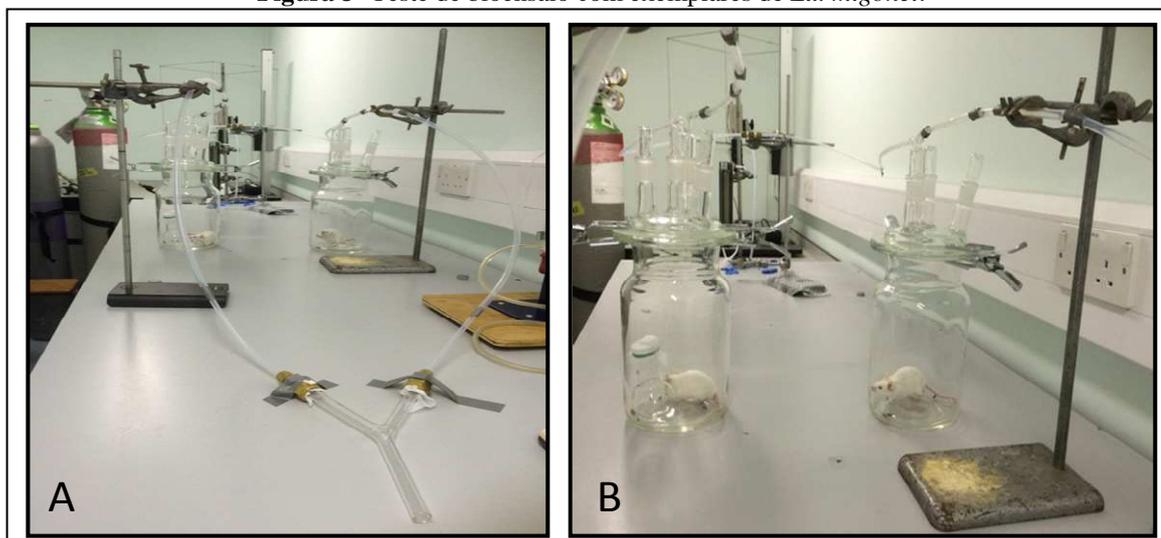
Este aparato consiste em um tubo de vidro em forma de Y (10 mm de diâmetro interno (ID)), composto por uma haste ramificada com 10 cm de comprimento, sendo cada uma separadas por um ângulo de 65°. O olfatômetro foi disposto horizontalmente sobre uma bancada que amortecia as vibrações, com uma rede de algodão disposta em torno da abertura de cada haste para evitar o escape dos exemplares. As duas hastes foram conectadas a dois tubos compridos de Teflon (40 cm × 3 mm ID; Supelco, Gillingham, Reino Unido), utilizando conectores de bronze (Swagelok Company, Solon, OH). Grade de ar zero (gases BOC, Guildford, UK) foi limpo utilizando um filtro de carvão ativado (Supelpure HC, Gillingham, Reino Unido) e passado para cada haste do olfatômetro através da junção T nos tubos de Teflon. A velocidade do ar na extremidade de saída da haste do olfatômetro foi medida utilizando um medidor de fluxo de bolhas, mantendo-o a 5 ml de s⁻¹.

Para realizar o bioensaio um camundongo foi inserido em um frasco de vidro transparente (recipiente de vidro de reação) de 5L conectado através de um tubo de Teflon a haste controle do tubo em Y e um outro camundongo foi inserido em um recipiente de vidro de reação de 5L separado e conectado através de um tubo de Teflon a haste teste do tubo em Y do olfatômetro. Um frasco de 50 mL r/b contendo 08 ou 32 machos de *Lu. migonei* foi inserido no recipiente de reação com o camundongo, sendo este conectado a haste teste do olfatômetro. Um pedaço de tela esterelizada cobrindo a abertura do frasco r/b para prevenir o escape dos machos foi utilizado. Um frasco similar de 50 ml r/b sem machos de *Lu. migonei* com uma tela cobrindo a abertura foi inserido no recipiente de reação de 5L contendo apenas camundongo. A resposta individual de 49 fêmeas de *Lu. migonei* para 32 machos da mesma espécie + odor do camundongo e, 30 fêmeas para 08 machos de *Lu. migonei* + odor do camundongo foi determinada. As fêmeas foram removidas de uma gaiola uma de cada vez utilizando aspirador manual e inseridas em um pequeno recipiente de Teflon. A extremidade aberta do recipiente foi inserido na saída da haste do tubo em Y. As fêmeas moveram-se do

pequeno recipiente de Teflon e entraram na haste do tubo em Y. Máximo de 2 min foi determinado para cada fêmea escolher para qual haste do tubo em Y iria, lado teste (machos + camundongos) ou lado controle (apenas camundongo). Fêmeas que se moveram até a metade da haste foram consideradas com resposta positiva, enquanto as que não escolheram nenhuma das hastes do tubo em Y foram consideradas com resposta negativa. Para controlar qualquer efeito de erro de posicionamento, uma rotação de 180° sobre o eixo horizontal a cada 10 replicatas foi realizada no olfatômetro.

Todo aparato de vidro foi limpo com solução de detergente Teepol a 5% (VWR International, Lutterworth, UK), água destilada e acetona, e esterelizado a 200°C overnight. Todo o experimento foi realizado em luz fluorescente a 26-27°C entre 09:00-13:00 horas.

Figura 3- Teste de bioensaio com exemplares de *Lu. migonei*.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) Visão geral do olfatômetro de tubo em Y. (B) Recipientes de vidro de reação de 5L contendo camundongo + frasco de 50 mL r/b contendo flebotomíneos machos (lado teste) e sem flebotomíneos machos (lado controle).

5.8 Análises de dados

Todas as medidas morfométricas são apresentadas em milímetros e estão expressas em média mais ou menos desvio padrão. Os dados foram inicialmente avaliados através do teste de Lilliefors para normalidade e, em seguida, comparados usando análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis, para dados normais e não-normais, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando BioEstat 5.0.

Teste binominal (SOKAL; ROHLF, 1995) foi utilizado para determinar se mais fêmeas de *Lu. migonei* foram atraídas pelo grupo teste (camundongo + machos) comparados

com o grupo controle (apenas camundongo) do que seria esperado pela chance de 50/50.

Sequências do gene *cox1* foram alinhadas usando o program ClustalW (LARKIN et al., 2007) e comparadas com outras disponíveis no GenBank (BLAST-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O percentual de variação nucleotídica (Pwc, %) entre os haplótipos identificados foi calculado usando o modelo de substituição Kimura 2-parâmetros (K2P) com taxa Gamma Distribuída (G) entre pontos (KIMURA, 1980) implementado no software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Para análise filogenética, sequências de *Lutzomyia* spp. disponíveis do GenBank foram também incluídas. A relação filogenética foi inferida por análise Maximum Likelihood (ML) (KIMURA, 1980), conduzida utilizando o modelo General Time Reversible (GTR) usando o MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Uma sequência de *Phlebotomus perniciosus* (número de acesso: AB985709) foi usada como *outgroup*.

6 RESULTADOS

6.1 Morfometria de *Lu. migonei*

Os dados morfométricos dos machos e fêmeas de *Lu. migonei* das três populações estudadas são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Não houveram diferenças morfológicas ou morfométricas significativas entre as populações estudadas, porém os machos e as fêmeas de Machado e de Baturité apresentaram, de modo geral, medições mais parecidas e em alguns casos (p.ex.: comprimento da asa e segmento antenal 3) superiores aos de Niterói.

Tabela 1- Dados morfométricos dos machos de *Lu. migonei*

Estruturas	Machos		
	Machados-PE	Baturité-CE	Niterói-RJ
Comprimento da asa	1440,05 ($\pm 23,67$)	1469,13 ($\pm 34,58$)	1387,48 ($\pm 37,64$)
Largura da asa	436,21 ($\pm 17,68$)	444,43 ($\pm 14,30$)	431,51 ($\pm 14,59$)
Comprimento do labrum	161,71 ($\pm 6,92$)	166,58 ($\pm 7,54$)	158,59 ($\pm 7,53$)
Segmento antenal 3	150,74 ($\pm 7,87$)	148,75 ($\pm 4,05$)	137,38 ($\pm 8,88$)
Filamento genital	113,20 ($\pm 4,87$)	114,29 ($\pm 6,26$)	109,98 ($\pm 6,97$)
Coxito	248,33 ($\pm 8,72$)	248,66 ($\pm 6,55$)	225,70 ($\pm 7,30$)
Estilo	117,65 ($\pm 5,15$)	118,60 ($\pm 5,13$)	114,34 ($\pm 3,45$)

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 2- Dados morfométricos das fêmeas de *Lu. migonei*

Estruturas	Fêmeas		
	Machados-PE	Baturité-CE	Niterói-RJ
Comprimento da asa	1794,43 ($\pm 23,20$)	1729,93 ($\pm 39,16$)	1711,37 ($\pm 27,53$)
Largura da asa	555,40 ($\pm 35,35$)	532,80 ($\pm 24,69$)	538,64 ($\pm 27,58$)
Comprimento do labrum	241,98 ($\pm 9,24$)	241,14 ($\pm 7,56$)	241,39 ($\pm 5,68$)
Segmento antenal 3	182,50 ($\pm 7,54$)	175,39 ($\pm 8,49$)	165,58 ($\pm 8,68$)

Fonte: Elaborado pela autora

6.2 Análise genética das populações de *Lu. migonei*

A análise do BLAST de todas as sequências de *Lu. migonei* obtidas nesse estudo revelaram uma alta identidade nucleotídica (até 98%) com uma sequência de *Lu. migonei* disponível no GenBank (GU909508). No geral, 30 haplótipos *cox 1* (alinhado mais de 658 locais, 69% AT) foram identificados, dos quais os haplótipos I e II foram as sequências tipos mais prevalentes recuperadas (25,6%) entre todas as amostras examinadas (Tabela 3). Exceto

para três substituições nucleotídicas não-sinônimas (Tyr-Asp; Ile-Val; Met-Gln) todas as outras eram mutações silenciosas. Em geral, variações intraespecíficas calculadas entre todos os haplótipos foi de até 3,15%, revelando a existência de dois genogrupos distintos (A e B) entre todos os *Lu. migonei* examinados. A variação intra-genogrupo média foi de 0,75% e 0,6% para os grupos A e B, respectivamente (Tabela 3).

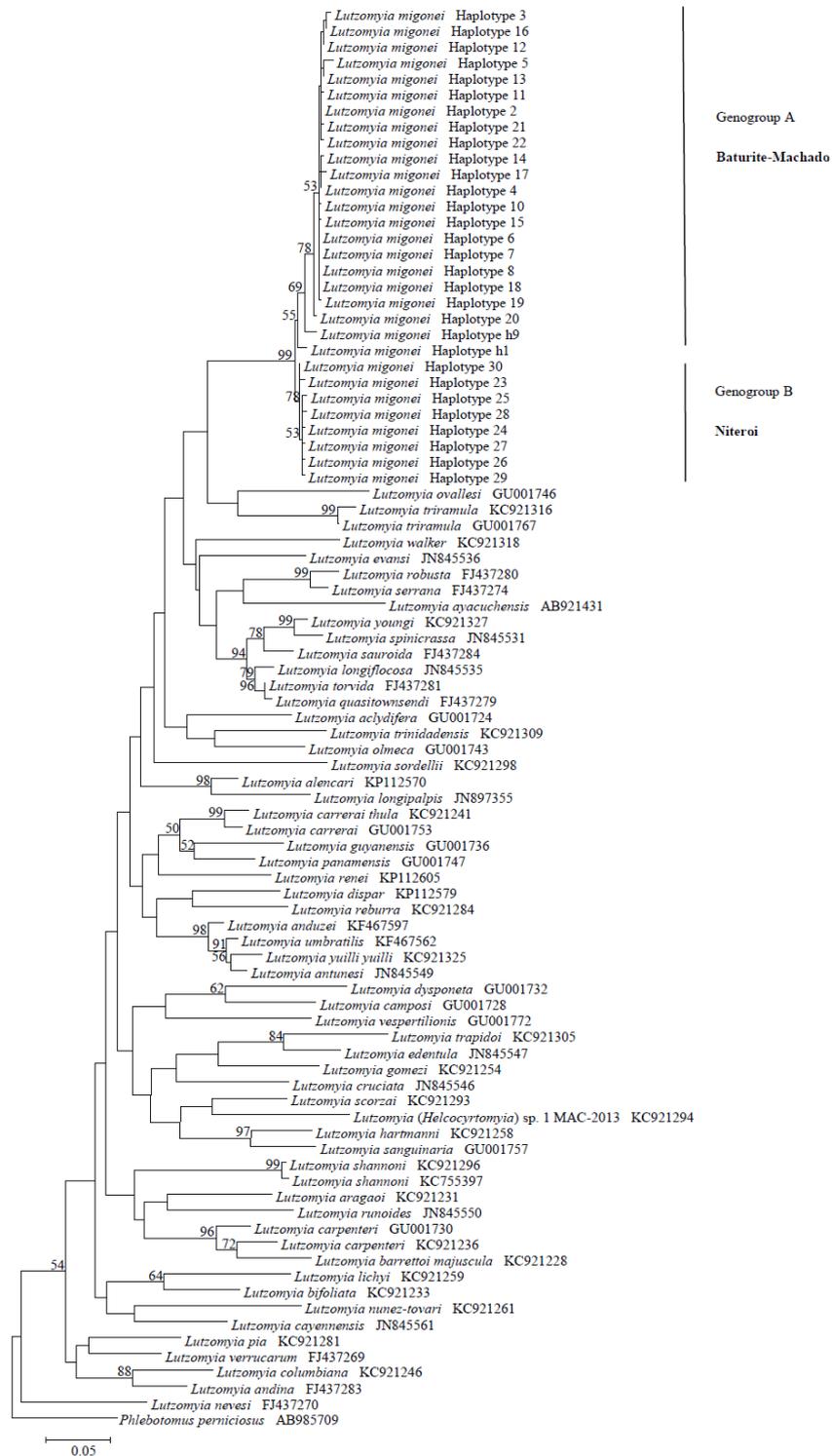
Tabela 3- Número de exemplares, haplótipos representativos identificados e variação nucleotídica intra-genogrupo (média, min-max) recuperado para haplótipos *cox1*.

Genogrupos	Origem geográfica	No. de exemplares	Haplótipos (no. de exemplares)	Variação intra-genogrupo (%)
A	Baturite e Machados	65 (15F; 19M)	I (6); II (5); III (2); IV (2); V (2); VI (1)	0,75 (2,35-0,15)
			VII (1); VIII (1); IX (1); X (1); XI (1); XII (1); XIII (1); XIV (1); XV (1) XVI (1); XVII (1); XVIII (1); XIX (1); XX (1) XXI (1); XXII (1) XXIII (1); XXIV (1); XXV (1); XXVI (1); XXVII (1); XXVIII (1); XXIX (1); XXX (2)	
B	Niteroi	27 (5F; 4M)	(1); XXVII (1); XXVIII (1); XXIX (1); XXX (2)	0,6 (1,4-0,3)

Fonte: Elaborado pela autora

As árvores ML inferidas a partir de sequências mitocondriais de *cox1* revelaram uma estrutura genética populacional semelhante a identificada pela análise de variação nucleotídica, exibindo dois clados monofiléticos irmãos com altos valores de bootstrap (99%) em seus ramos principais, distinto de outros *Lutzomyia* spp. (Figura 4).

Figura 4 - Ávore filogenética baseada em regiões do mDNA (COI).



Fonte: Elaborado pela autora

6.3 Microscopia eletrônica de varredura

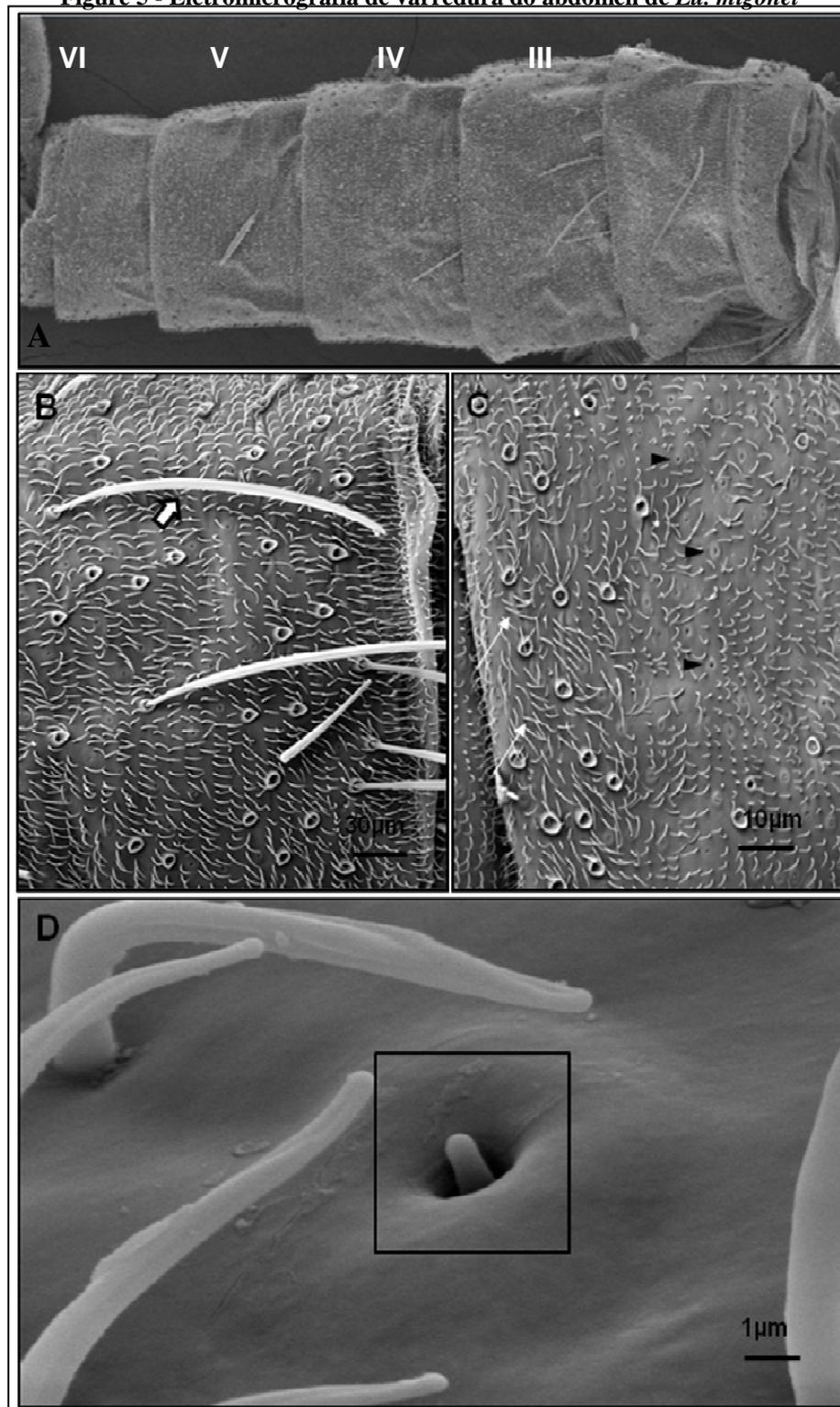
Para este trabalho foram utilizados exemplares machos de *Lu. migonei* provenientes de colônia de diferentes idades após emergência em laboratório, além de exemplares capturados de campo para análise em ambos os microscópios eletrônicos: varredura (MEV) e transmissão (MET).

As estruturas disseminadoras de feromônio podem ser observadas distribuídas em diferentes segmentos abdominais dos machos, conforme observado na Figura 5.

Nos machos de *Lu. migonei*, as estruturas disseminadoras de feromônio de atração sexual são encontradas distribuídas pelos tergitos III até o VI (Figura 5 A). Nesta espécie não é possível observar ao microscópio estereoscópico manchas pálidas nos tergitos abdominais tanto em insetos vivos quanto fixados.

As estruturas disseminadoras de feromônio são pequenas e apresentam elevações cuticulares (pápulas) em forma de cratera contendo um poro central onde está inserido um espinho (Figura 5 D), sendo visíveis em grande número apenas por microscopia eletrônica de varredura. Embora as microtríquias ocorram em uma distribuição regular nas regiões que contém as estruturas disseminadoras de feromônio, as macrotríquias estão ausentes nestes locais, ocorrendo apenas em alguns pontos específicos dos tergitos (Figura 5 B-C).

As macrotríquias dificultam a observação das estruturas disseminadoras de feromônio, contudo podem ser eliminadas através da imersão dos insetos em água destilada, PBS, etanol ou glutaraldeído, o que facilita a visualização da superfície dos tergitos e das estruturas disseminadoras de feromônio. Assim, observa-se apenas a base na qual as macrotríquias estão inseridas, que por sua vez é facilmente distinta das estruturas disseminadoras de feromônio, visto o seu grande tamanho. Em alguns pontos, macrotríquias podem ser observadas ainda inseridas em suas bases (Figura 5 B).

Figure 5 - Eletromicrografia de varredura do abdomen de *Lu. migonei*

Fonte: Elaborado pela autora.

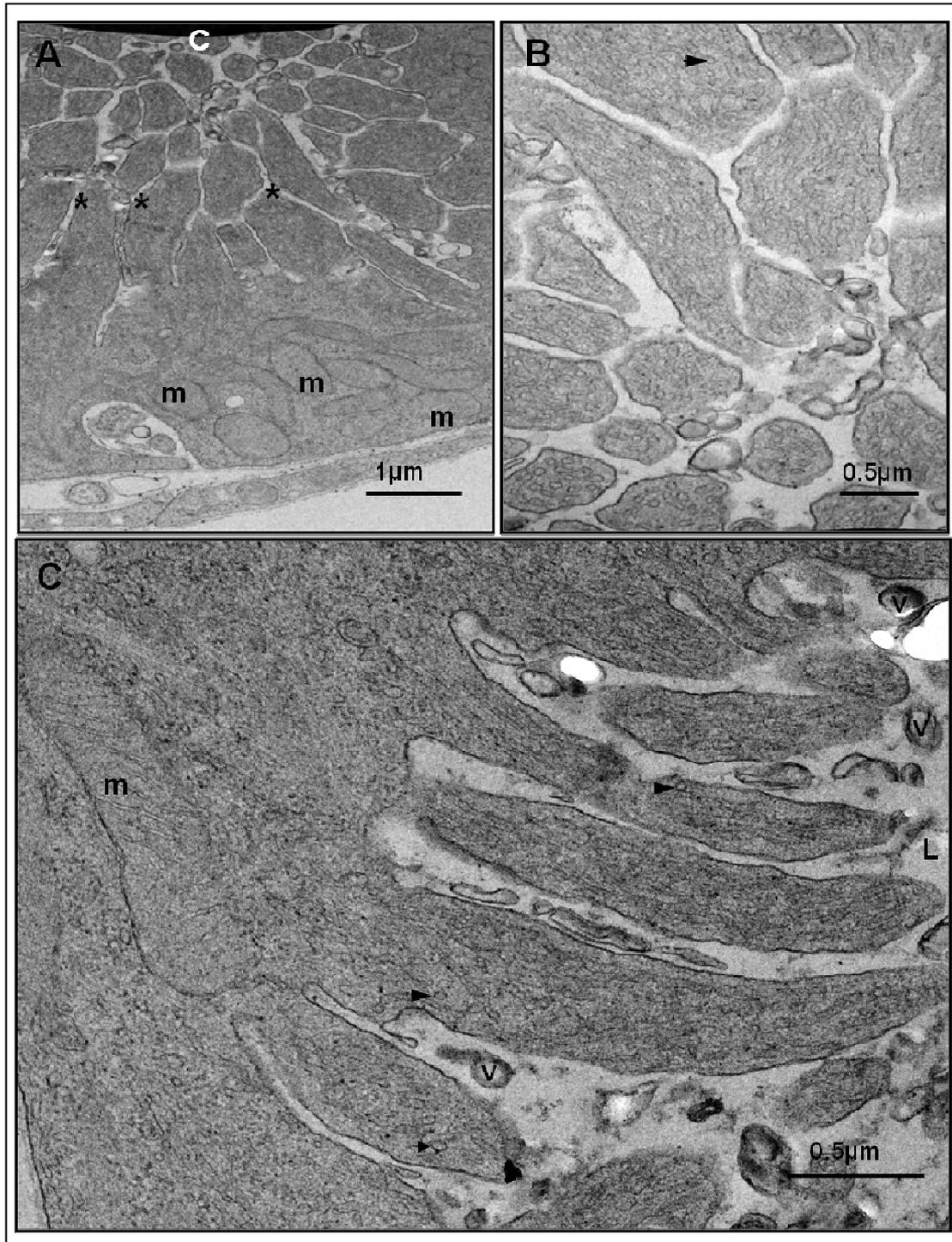
Legenda: (A) Detalhe do segmento tergal III ao VI. (B) Detalhe dos tergitos, mostrando as microtríquias com distribuição regular em toda superfície dos tergitos abdominais. (C) Estruturas disseminadoras de feromônio estão localizadas entre as microtríquias e podem ser facilmente distinguíveis da base das macrotríquias (►). (D) Detalhe da estrutura disseminadora de feromônio no tergito abdominal IV, parecendo uma elevação de uma pequena cratera com poro por onde sai um espinho (quadrado).

6.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Machos de *Lu. migonei* com diferentes idades (24, 72, 120 e 168 h) foram utilizados para estudar a ultra-estrutura das glândulas produtoras de feromônio. Após observar por MEV a presença das estruturas disseminadoras entre os III e VI tergitos abdominais, estes tergitos foram dissecados e processados para observação em MET.

Análises de machos adultos de *Lu. migonei* depois de 24 h após emergência em colônia revelaram uma única camada de epitélio formada por células glandulares de feromônio localizadas logo abaixo da cutícula. A porção apical da célula está modificada para formar um aparato típico contendo pequeno reservatório com diversos ductos esclerotizados no interior desta estrutura (Figura 6 A-C). É evidente a presença de pequenas vesículas na região do lúmen no citoplasma da célula, espaço onde a substância que será excretada é estocada (Figura 6C). A produção da substância excretora (aqui será referenciado pelo termo feromônio) é baixa ou não existente neste período de diferenciação da glândula, como pode ser evidenciado por sua ausência no lúmen. Peroxissomos não são observados, porém diversas mitocôndrias podem ser vistas (Figura 6A).

Figure 6 - Eletromicrografia de transmissão de célula glandular de feromônio de machos adultos de *Lu. migonei* com 24 h pós-emergência.

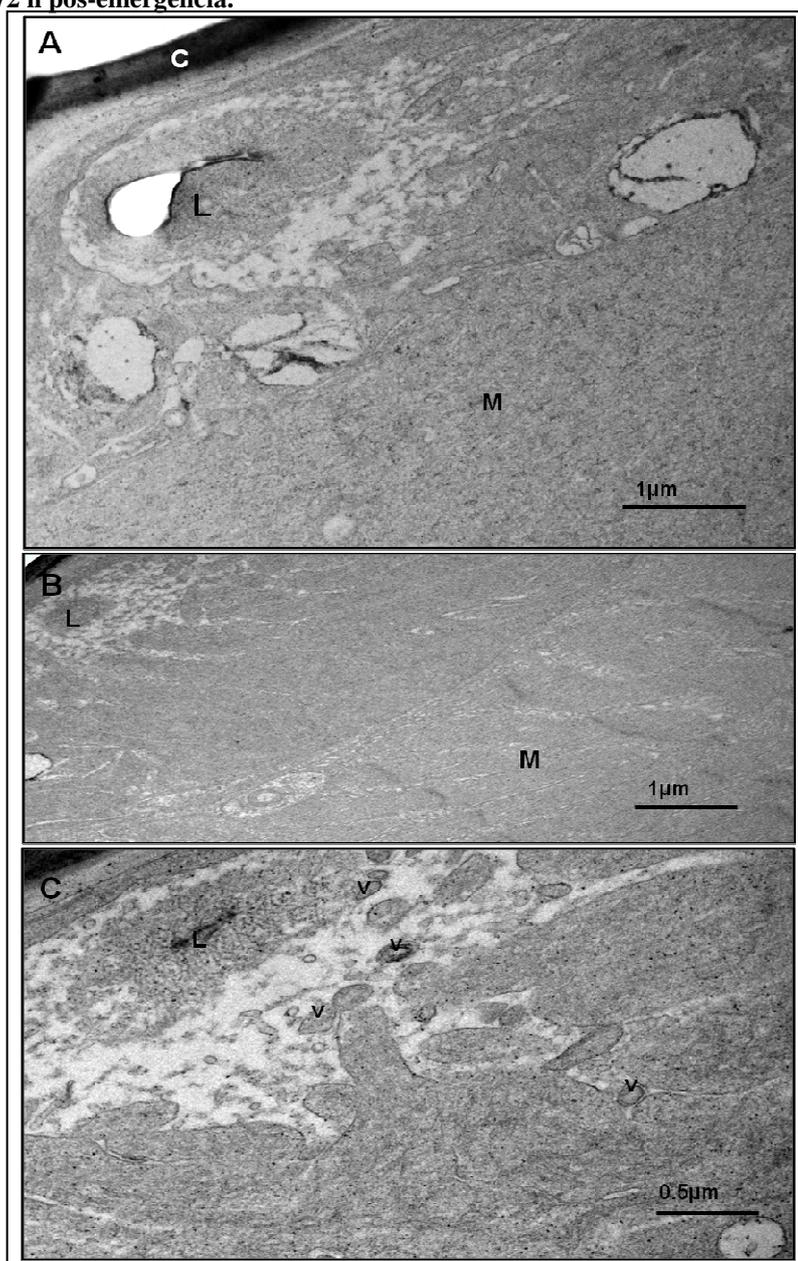


Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) Células glandulares estão localizadas abaixo da cutícula (indicada com um “C” branco), formando uma camada de epitélio único. A porção apical da célula é modificada para formar um aparato típico com pequenos reservatórios contendo diversos ductos esclerotizados (asterísticos) em sua estrutura interna. Diversas mitocôndrias (m) podem ser vistas. (B) Detalhes dos pequenos reservatórios contendo ductos (▶) em sua estrutura interna. (C) Detalhes dos reservatórios, ductos e das pequenas vesículas (v) na região do lumen e presença de mitocôndrias (m) na base dos reservatórios.

Seções em amostras contendo machos adultos de *Lu. migonei* depois de 72 h após emergência em colônia expuseram detalhes de alguns traços de estágios de maturação da biosíntese de feromônio (Figura 7 A-C). Pode-se observar a dissociação dos reservatórios após a liberação de feromônio no lúmen e a presença de poucas vesículas na base da estrutura glandular (Figura 7 A-B). Verifica-se uma conexão entre as vesículas (Figura 7 C).

Figura 7 (A-C). Eletromicrografia de transmissão de célula glandular de feromônio de machos adultos de *Lu. migonei* com 72 h pós-emergência.

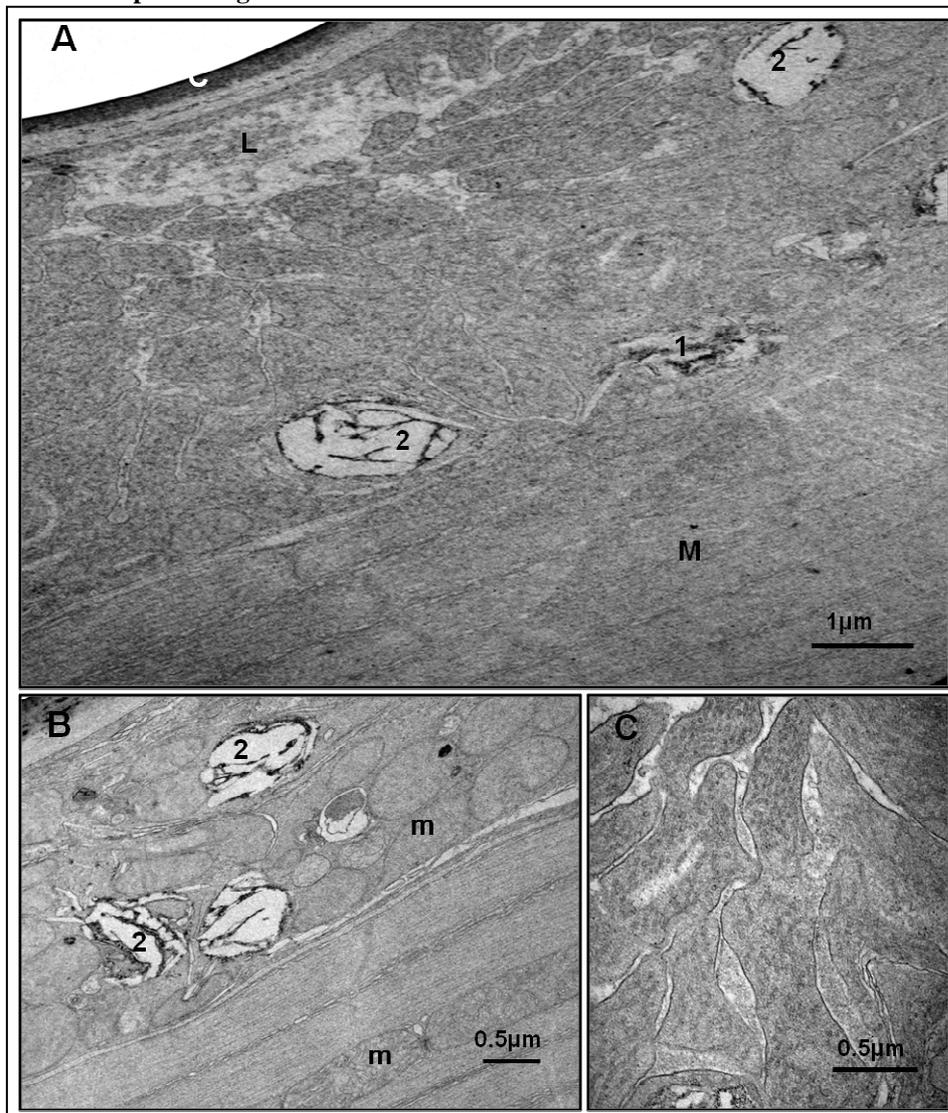


Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) Detalhe do formato da glândula de feromônio. Observe o lúmen (L) preenchido com feromônio. Note a dissociação dos reservatórios após a liberação do feromônio dentro do lumen e a presença de vesículas na base da estrutura, além de fibras musculares (M). (B-C) Detalhes da conformação intermediária da glândula de feromônio. Note a dissociação de todos os reservatórios, poucas vesículas (v) e o lumen (L) completamente cheio de feromônio.

A partir de 120 h que os machos adultos de *Lu. migonei* emergiram, observa-se a glândula de feromônio quase que em estágio maduro com feromônio no lúmen e dissociação de reservatórios após liberação da mesma (Figura 8 A-C). Dupla membrana pode ser vista ao redor dos reservatórios, além das vesículas conectadas entre si. A conformação dos reservatórios dissociados e o estágio de maturação da glândula são similares em machos adultos com 72 h após ter emergido. Diferenças podem ser detectadas exatamente no tempo de maturação da glândula.

Figura 8 - Eletromicrografia de transmissão de células da glândula de feromônio de machos adultos de *Lu. migonei* com 120h pós emergência.

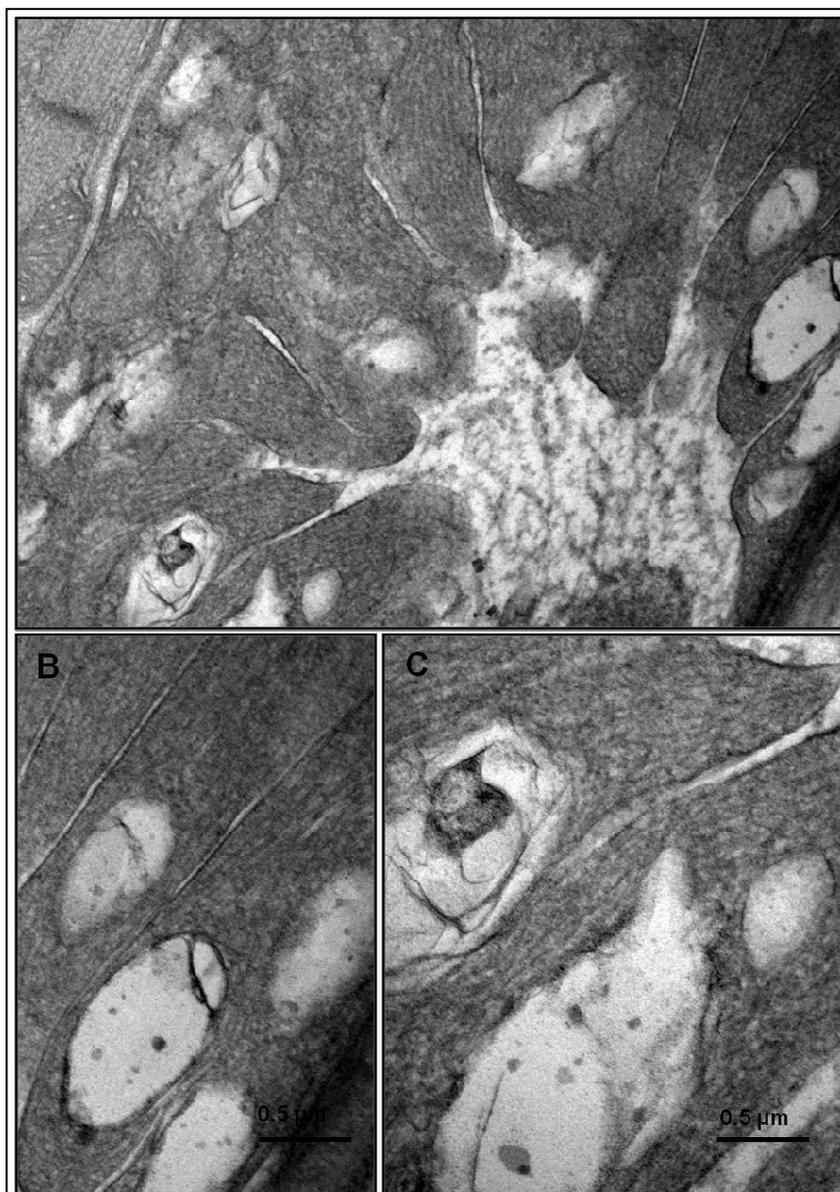


Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) Detalhes da dissociação dos reservatórios após a liberação de feromônio no lúmen. Glândula de feromônio quase madura. (A e B) Detalhes das vesículas que produzem feromônio: (1) vesícula murcha após produção e liberação de feromônio para os reservatórios; (2) vesículas completamente preenchidas com feromônio antes da liberação para os reservatórios. (C) Note a presença de ductos dentro dos reservatórios e uma membrana dupla no entorno dos mesmos. Lúmen (L), feixes musculares (M) e mitocôndria (m)

Ao observar machos adultos de *Lu. migonei* com 168 h após emergência, o feromônio está relacionado a maturação e/ou diferenciação da glândula, pelo fato das células glandulares de feromônio apresentarem características típicas de uma glândula de feromônio madura e, já existir traços confirmatórios de total biosíntese de feromônio, além da dissociação dos reservatórios e o espaço do lúmen estar completamente cheio de feromônio e, das vesículas na base do lúmen estarem conectadas (Figura 9A-C).

Figura 9 - Eletromicrografia de transmissão de células da glândula de feromônio de machos adultos de *Lu. migonei* com 168h pós emergência.

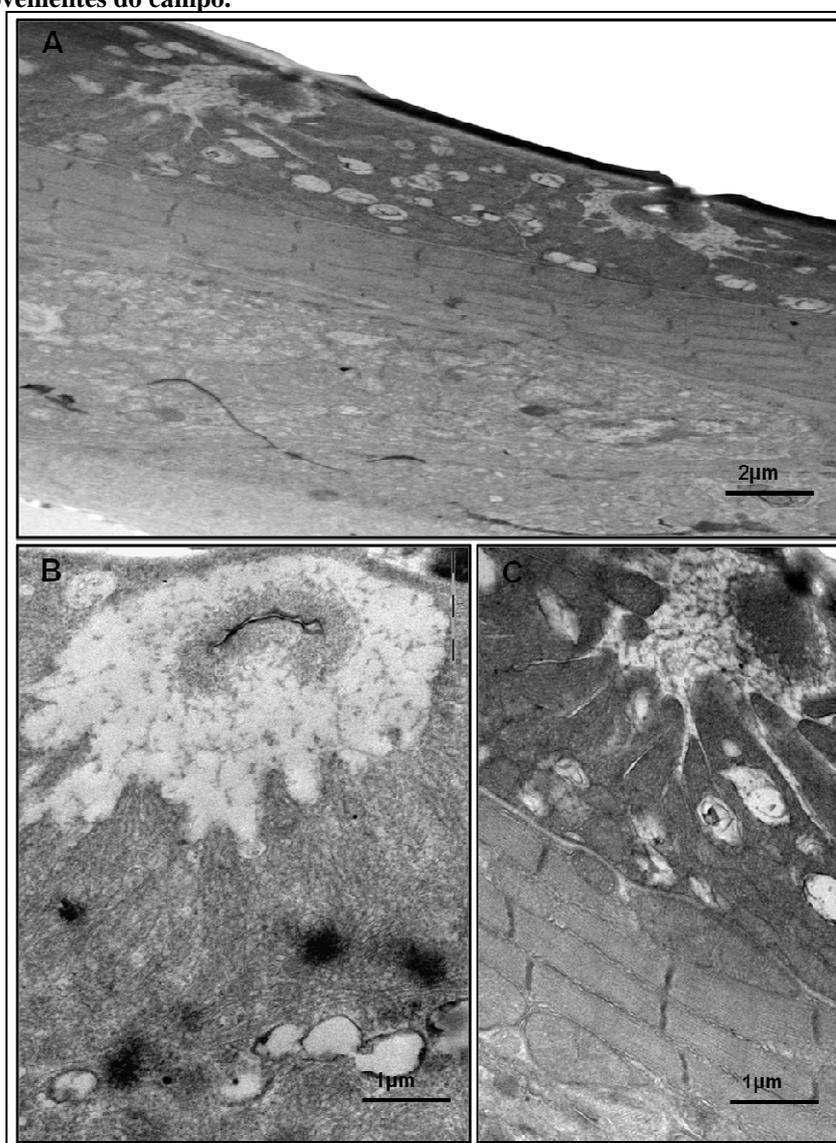


Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) Glândulas de feromônio em diferentes tempos de diferenciação/maturação e produção de feromônio. (B) Detalhe da glândula de feromônio totalmente diferenciada/maturada. Note a completa dissociação dos reservatórios e o lumen completamente preenchido por feromônio. (C) Detalhe da glândula durante a produção e liberação de feromônio para o lumen (L). Note a presença de vesículas (v) ao redor do tecido segmentado. M = fibras musculares.

Com relação aos exemplares de *Lu. migonei* provenientes do campo, as mesmas estruturas observadas em amostras da mesma espécie com diferentes idades e procedentes do laboratório podem ser relacionadas, no entanto algumas diferenças podem ser verificadas devido à impossibilidade de conhecer a idade dos exemplares. Não obstante, acredita-se que este exemplar revele ter em torno de 120 a 168 h após emergência em hábitat natural. Detalhes dos reservatórios com grupos de ductos no interior dos mesmos e a presença de vesículas em torno do citoplasma da célula glandular pode ser observado, assim como vesículas internalizadas por reservatórios em células bem preservadas (Figura 10).

Figura 10 – Eletromicrografia de transmissão de células da glândula de feromônio de machos adultos de *Lu. migonei* provenientes do campo.



Fonte: Elaborado pela autora

(A-B) Detalhe das vesículas internalizadas pelos reservatórios no tecido segmentado próximo a região do lumen.
(C) Detalhe dos reservatórios com os ductos por onde o feromônio é transportado após sua produção na vesicular para o lumen.

Acredita-se que as vesículas são estruturas que participam da produção dos feromônios e que estão interligadas umas com as outras e, estas, com os reservatórios por onde o feromônio após produzido é transportado dos reservatórios pelos ductos esclerotizados em seu interior, liberando-os para o centro do lúmen, apresentando-se como uma mancha acizentada, que ali fica concentrado antes de ser expelido para o meio externo. É possível que todo este aparato esteja conectado ao exterior por um pequeno ducto cuticular através de pequenas pápulas observadas em microscopia eletrônica de varredura.

Podem-se observar, pela primeira vez, que vesículas e reservatórios estão presentes em seções ultrafinas de exemplares de *Lu. migonei* tanto em amostras de campo quanto em exemplares de colônia e que o número e tamanho das células glandulares aumentam com a maturidade dos insetos.

6.5 Bioensaio de laboratório

Em olfatômetro, fêmeas demonstraram uma preferência para o grupo teste contendo odor de camundongo + machos de *Lu. migonei* comparados ao grupo controle, contendo apenas odor de camundongo. No experimento 1 com 32 machos, 33 fêmeas apresentaram preferência para o grupo teste e 16 fêmeas apresentaram preferência para o grupo controle (Teste binomial, $P < 0,0114$). No experimento 2 com oito machos, 21 fêmeas apresentaram preferência para o grupo teste e nove fêmeas apresentaram preferência para o grupo controle (Teste binomial, $P < 0,0428$).

7 DISCUSSÃO

Flebotomíneos são continuamente submetidos a várias pressões de controle, devido às mudanças no ambiente doméstico e peridoméstico. Variações fenotípicas são frequentemente observadas quando se estudam diferentes populações de flebotomíneos, como podem ser analisadas em *Lu. longipalpis*, exceto para o padrão das manchas pálidas nos tergitos de machos porque são raramente medidos (HAMILTON et al., 2005; LINS et al., 2012; WARD et al., 1983).

A identificação de flebotomíneos, no nível de espécie, é baseada em análises morfológicas e morfométricas de um grande número de estruturas, sendo a cabeça e a genitália as mais importantes. Entretanto, identificações morfológicas requerem habilidade e expertise taxonômica. Além disso, podem apresentar limitações de integridade dos espécimes ou mesmo montagens incorretas. (GUTIÉRREZ et al., 2014; LATROFA et al., 2012).

Diversos estudos relacionados a morfometria em flebotomíneos vem sendo empregados, sendo a espécie *Lu. longipalpis* mais estudada. O primeiro estudo desta espécie baseado em análises morfométricas ocorreu em populações da Colômbia, Bolívia, Brasil e Nicaraguá, ficando restrita a geometria das asas dos machos. Dados da análise morfométrica não apresentaram resultados significativos (DUJARDIN et al., 1997). Em seguida, De La Riva et al. (2001) estudaram a geometria das asas de machos desta mesma espécie provenientes da Bolívia e Nicaraguá, no qual as variações geométricas não revelaram grandes subdivisões geográficas, nem caracteres ecológicos ou fenotípicos separados.

Este é o primeiro estudo morfológico e morfométrico comparativo entre diferentes populações de *Lu. migonei* ocorrendo em áreas endêmicas de leishmaniose no Brasil. Não houveram diferenças morfológicas ou morfométricas significativas entre as populações estudadas, porém machos e fêmeas de Machado e de Baturité apresentaram, de modo geral, medidas parecidas e em alguns casos (p.ex.: comprimeto da asa e segmento antenal 3) superiores aos de Niterói. Resultados similares foram observados em estudo com diferentes populações de *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* de Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 2015).

Metodologias moleculares são interessantes e vem sendo utilizadas para explorar questões taxonômicas de diferentes níveis hierárquicos (DE LA HERRAN et al., 2001; GUTIÉRREZ et al., 2014; HANEL; STURMBAUER, 2000). Estas constituem uma ferramenta poderosa para elucidar estrutura populacional e genética evolutiva em insetos vetores, além de enfatizar espécies crípticas, para associar os machos com as fêmeas da

mesma espécie ou propor uma sistemática evolutiva. (DEPAQUIT, 2014; SCARPASSA; ALENCAR, 2012).

Atualmente, estudos utilizando gene que codifica o DNA mitocondrial têm sido amplamente empregados como observados em estudos de populações, taxonomia molecular e relação filogenética de muitos organismos (AVISE, 1994). O citocromo oxidase subunidade I é um dos maiores genes codificadores de proteínas, que funciona no transporte de elétrons e na síntese de ATP e apresentam a sequência de aminoácidos mais conservada (PRAMUAL et al., 2005; SCARPASSA et al., 2008, 2012).

Neste estudo, as análises filogenéticas revelaram uma alta identidade nucleotídica (até 98%) com uma sequência de *Lu. migonei* disponível no GenBank (GU909508), e a presença de dois genogrupos distintos (A e B) entre todos os *Lu. migonei* examinados (genogrupo A – Machado e Baturité e genogrupo B – Niterói). Além disso, observou-se uma estrutura genética populacional semelhante a identificada pela análise de variação nucleotídica, exibindo dois clados monofiléticos irmãos, o que pode sugerir que a barreira ecológica entre essas populações pode contribuir para a segregação destas, principalmente devido as mudanças climáticas e geográficas.

Resultados similares puderam ser observados com populações de *Lu. umbratilis* da região Amazônica e do Recife, no qual observaram-se a presença de dois clados distintos desta espécie utilizando citocromo oxidase e morfometria das asas. A presença dos clados sugere a existência de um contínuo intercruzamento entre as populações analisadas (DE SOUZA FREITAS et al., 2016). Estudo analisando nove populações do complexo *Lu. longipalpis* da região Nordeste e de Minas Gerais também detectaram a presença de dois grupos, no entanto para esta espécie baixa diferenciação genética foi observada quando comparada aos observados em *Lu. umbratilis* (COUTINHO-ABREU et al., 2008).

Estruturas disseminadoras de feromônio foram identificadas nos tergitos abdominais de machos adultos da espécie *Lu. migonei* através de microscopia eletrônica de varredura. Em todas as imagens observadas em ambos os tipos de microscopia eletrônica, varredura e transmissão, a cutícula apresentou-se modificada no local da abertura da glândula de feromônio, formando, assim, uma elevação da cutícula, que em *Lu. migonei* parece com uma pequena elevação com um poro central por onde sai um espinho. Acredita-se que estas modificações proporcionam uma maior área de superfície para a evaporação do feromônio (PERCY-CUNNINGHAM; MACDONALD, 1987). Ward et al. (1993) ao analisarem estruturas disseminadoras de feromônio, também verificaram que machos de *Lu. migonei* apresentavam esta estrutura e com as mesmas modificações.

Existe uma discussão sobre o papel das microtríquias e acredita-se que estas estruturas, que são pêlos acelulares fixados na cutícula dos insetos, tenham algum papel na dispersão de feromônios voláteis na superfície da cutícula (CHAPMAN, 2012). Microtríquias estão presentes em grande número, em todos os tergitos abdominais de *Lu. migonei*. As macrotríquias estão ausentes nas regiões dos tergitos onde as estruturas disseminadoras de feromônio estão localizadas, conforme também observado em análises de outras espécies de flebotomíneos (SPIEGEL et al., 2002).

Ao analisar machos de *Lu. migonei* em estereomicroscópio verificou-se que estes insetos apresentam uma coloração marrom-clara por todo o corpo e que manchas pálidas (*spots*) não são observadas nos tergitos abdominais onde estão localizadas as glândulas de feromônio, conforme também pode ser observado em análises de amostras de *Lu. longipalpis* (MANGABEIRA, 1969, SPIEGEL et al., 2002). Por outro lado, estudos realizados em duas espécies próximas do grupo *migonei* (*sensu* YOUNG; DUNCAN, 1994), *Lu. carmelinoi* e *Lu. lenti* demonstraram que estes insetos apresentam uma coloração similar a observada em *Lu. migonei*, também não sendo visíveis *spots* nos tergitos abdominais onde as glândulas de feromônio estão localizadas (SPIEGEL et al., 2002).

As estruturas disseminadoras de feromônio em *Lu. migonei* estão presentes nos tergitos abdominais III ao VI. No entanto, em espécies próximas como *Lu. lenti* e *Lu. carmelinoi* estas se encontram nos tergitos abdominais V e VI, respectivamente, parecendo uma estrutura em forma de maçã com um poro central (SPIEGEL et al., 2002; WARD et al., 1993). Apesar de essas duas últimas espécies pertencerem ao grupo *migonei*, verificam-se pequenas diferenças tanto na localização das glândulas de feromônio quanto no formato destas estruturas quando comparadas a *Lu. migonei*, sendo assim mais estudos precisam ser realizados para verificar se a morfologia destas estruturas poderia ser outro critério para o estabelecimento de relacionamentos sistemáticos mais precisos entre membros da subfamília Phlebotominae.

Mesmo com a presença de diversas estruturas disseminadoras de feromônio em machos adultos de *Lu. migonei*, estudos comportamentais químicos são necessários para verificar o comportamento de cópula desta espécie. Tem sido observado que antes da cópula, machos desta espécie batem as asas e produzem sons durante a copulação (ARAKI et al., 2009; SOUZA et al., 2004; VIGODER et al., 2010). Esse comportamento pode ser associado a dispersão de feromônio sexual através da batida das asas e está provavelmente envolvido na atração de fêmeas conespecíficas.

Nossos dados demonstraram pela primeira vez através da microscopia eletrônica de transmissão as células da glândula de feromônio de *Lu. migonei* conforme já descrito em outras espécies como, *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* (LANE; SOUZA BERNARDES, 1990; SPIEGEL et al., 2002, 2004, 2011). A glândula de feromônio de *Lu. migonei* apresenta vesículas e mitocôndrias, o que lhe confere característica secretória. Pequenos reservatórios com grande número de ductos esclerotizados inseridos nos mesmos podem ser observados. Acredita-se que esta estrutura possa facilitar a absorção da secreção, como descrito em outras espécies de flebotomíneos (SPIEGEL et al., 2002) e em besouros (NARDI et al., 1996; PIERRE et al., 1997), para a liberação de substância excretória, sugerindo-se conter feromônio, no espaço do lúmen. A grande quantidade de mitocôndrias observadas no entorno dos reservatórios através do citoplasma da célula glandular sugere uma alta atividade sintética nas glândulas. Fibras musculares próximas ao citoplasma da célula glandular também podem ser observadas.

Ao analisar as micrografias, pôde-se observar que as vesículas estão conectadas entre si e com os reservatórios no citoplasma da célula glandular, podendo, assim estar relacionada à biosíntese de feromônio. Estes achados podem ser verificados em outras espécies de flebotomíneos conforme descrito por Spiegel et al. (2002). A reação eletrodensa com osmium no espaço do lúmen, possível local de estocagem de feromônio, sugere que esta substância pode ser um lipídio, mas não podemos inferir com certeza visto que não foram realizadas análises químicas dessa substância, conforme ocorrido em machos adultos da espécie *Lu. longipalpis* (HAMILTON et al., 1996).

A organização das células glandulares de feromônio com pequenos reservatórios e ductos parece corresponder com células glandulares do tipo III, de acordo com a nomenclatura de Noirot e Quenedey (1974, 1991) bem como observado em *Lu. longipalpis* e outras espécies de flebotomíneos por Lane e Souza Bernardes (1990).

Para comparar a evolução da maturação/diferenciação da glândula de feromônio de *Lu. migonei* foram analisados machos adultos de diferentes idades após emergência em laboratório com machos adultos provenientes do campo. Nossos dados revelaram um único epitélio formado por células glandulares de feromônio localizados abaixo da cutícula. Acredita-se que a produção de feromônio depende da idade do vetor, visto que leva certo tempo para que ocorra a diferenciação das células. Ao analisar machos adultos de *Lu. migonei* com 24 h após emergência, observou-se que a porção apical da célula estava modificada para formar um aparato típico com pequenos reservatórios contendo diversos ductos esclerotizados em sua estrutura interna. A produção de feromônio era baixa ou inexistente neste período,

sendo evidenciado pela ausência da região do lúmen. Não foi observado peroxissomo, porém diversas mitocôndrias puderam ser vistas. Nossos resultados corroboram com outros estudos utilizando o modelo *Lu. longipalpis*, os quais indicam que as células glandulares ainda estão indiferenciadas em adultos jovens após emergência, portanto impossibilitando a produção de feromônio (BOUFANA et al., 1986; SPIEGEL et al., 2011).

Quando analisamos machos adultos de *Lu. migonei* com 72 h após emergência observamos alguns traços do estágio de diferenciação da biosíntese de feromônio. Dissociação de reservatórios após liberação de feromônio dentro do lúmen e a presença de poucas vesículas na base da estrutura glandular podem ser observados. Estas vesículas estão conectadas entre si através do citoplasma da célula glandular como observados previamente por MET em algumas espécies de flebotomíneos (BOUFANA et al., 1996; LANE; SOUZA BERNARDES, 1990; SPIEGEL et al., 2011). Sugere-se que os feromônios são secretados dentro das vesículas, migrando para os reservatórios logo em seguida e, finalmente sendo liberados para o lúmen através dos ductos esclerotizados localizados no interior destes reservatórios, porém mais análises de imunocitoquímica deverão ser realizadas para confirmar esta hipótese.

Os mecanismos de controle e liberação final de feromônios para o meio ambiente envolvem principalmente o controle de dois fatores: síntese e dispersão. Na ausência de uma estrutura de reserva diferenciada ou um espaço para armazenamento do feromônio sugere-se que o inseto é capaz de armazenar apenas uma quantidade limitada de feromônio nas glândulas. Quando a glândulas não estão associadas a um reservatório, a síntese é seguida diretamente pela dispersão. O controle da síntese é feito por estímulo neuronal ou por regulação endócrina de peptídeos que circulam pela hemolinfa. Diante do exposto, para espécies como *Lu. migonei*, ainda não se sabe ao certo como ocorre esse mecanismo, mesmo tendo a presença de reservatórios em sua estrutura glandular e, que, de fato, mais estudos são necessários para esclarecer as evidências observadas em MET. Já em *Lu. longipalpis*, acredita-se que a síntese de feromônio é seguida diretamente pela dispersão, visto a ausência de reservatórios diferenciados ou espaços de armazenamentos de feromônio.

Entre 120 e 168 h após emergência de machos adultos de *Lu. migonei* verifica-se que a glândula de feromônio encontra-se em alta produção de feromônio ao observar o espaço do lúmen completamente cheio de secreção. A conformação dos reservatórios dissociados e o estágio de diferenciação/maturação da glândula é muito parecido em ambas as idades. Então, células glandulares já apresentam todas as características típicas de diferenciação/maturação,

e já existem traços da biosíntese de feromônio. Diferenças entre as idades podem ser observadas apenas no tempo de diferenciação/maturação das glândulas.

Machos adultos de *Lu. migonei* são sexualmente receptivos e férteis algumas horas após a emergência (observações de colônia em laboratório, dados não publicados). Por conseguinte, análises do desenvolvimento da glândula de feromônio de machos de *Lu. migonei* em MET mostraram que com 24 h após emergência, as células produtoras de feromônio já iniciam sua diferenciação, estando esta em seu ciclo final em torno de 72 a 168 h após a emergência, coincidindo com os dados de que as fêmeas são mais atraídas por machos a partir de 120 horas após emergência. Este resultado é bastante interessante quando analisado em conjunto com bioensaios em laboratório que será apresentado mais adiante. Ademais, estes achados também podem ser observados em *Lu. longipalpis* com algumas ressalvas: nesta espécie a receptividade e fertilidade dos machos são em torno de 12 h e, a atração das fêmeas pelos machos entre 72 e 96 horas após a emergência (JONES; HAMILTON, 1998, SPIEGEL et al., 2002).

Praticamente nada se sabe sobre a produção de feromônio em *Lu. migonei* e se este é um pré-requisito para o acasalamento. Pesquisadores discutem a possibilidade de fêmeas escolherem machos que não produzem feromônio ocasionalmente após a emergência em relação dos machos mais velhos, produtores de feromônio. E, que, provavelmente, os sons produzidos pelo batimento das asas funcionariam como um novo parâmetro na escolha do parceiro (JONES; HAMILTON, 1998). *Lu. migonei*, por exemplo, produz mais de um tipo de som ao bater as asas e, acredita-se que este comportamento possa ser também um padrão de cópula desta espécie (VIGODER et al., 2010). No entanto, o papel do som na escolha do parceiro ainda é pouco conhecido e, mais estudos comportamentais precisam ser realizados a fim de elucidar esta questão.

Ao avaliar a atração de fêmeas de *Lu. migonei* a pequenos e grandes grupos de machos desta espécie na presença de odor do hospedeiro (camundongo) em laboratório, verificou-se que fêmeas deste vetor demonstraram atração significativa aos machos da mesma espécie e, esta atração ocorria em machos de aproximadamente 120 a 144 horas após a emergência. A escolha em usar odor de hospedeiro foi diante observações comportamentais desta espécie em campo, no qual a agregação durante o acasalamento foi frequentemente observada próximo ou no hospedeiro, indicando que o odor do hospedeiro é um componente importante para atração de semioquímicos de machos. Estas observações também puderam ser verificadas por Bray et al. (2009) porém com alguns ajustes, ao realizarem estudos de atração de feromônio sexual sintético de *Lu. longipalpis*. Pesquisadores acreditam que este

feromônio apresenta duas funções: feromônio sexual e feromônio de agregação de machos (BRAY et al., 2010; MORTON; SPIEGEL et al., 2005; WARD, 1989).

No entanto, se tal substância química de fato existir em *Lu. migonei*, há talvez um considerável fator em potencial para seu desenvolvimento e exploração em programas de controle. Experimentos comportamentais podem demonstrar atração de parceiros em potencial na ausência de acuidades visuais, podendo fornecer fortes evidências para a existência de feromônio sexual em uma espécie antes de sua caracterização química. Além disso, esses estudos são necessários para confirmar a atividade biológica de qualquer substância química para admissão da hipótese de desempenho de um papel no comportamento de acasalamento.

Consideráveis esforços ainda se fazem necessários para determinar qual tipo de químico *Lu. migonei* produz e, assim, determinar a forma mais eficiente de aplicar este feromônio em medidas de controle contra leishmanioses. Espera-se que o uso de feromônios como ferramenta de controle de flebotômíneos possa ajudar na redução ao uso de inseticidas, como observados em programas de controle de pestes agrícolas.

8 CONCLUSÕES

- a) Diferenças morfológicas e morfométricas não foram observadas nas populações de *Lu. migonei* do Brasil;
- b) Dois clados monofiléticos irmãos foram observados entre as populações estudadas (genogrupo A: Machado e Baturite, genogrupo B: Niterói);
- c) A estrutura disseminadora de feromônio em *Lu. migonei* são pequenas elevações cuticulares em forma de cratera com um poro central, onde está inserido um espinho, estando distribuídas pelo tergitos III ao VI dos machos desta espécie;
- d) A produção de feromônio aumenta gradualmente com a maturação das células glandulares de acordo com a evolução da glândula de feromônio;
- e) Fêmeas de *Lu. migonei* são atraídas a pequenos e grandes grupos de machos conespecíficos na presença de odor do hospedeiro (camundongo) em laboratório.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO. Perfil do município de Passira. Disponível em: <http://www.atendimentoagcondepe_fidem@fisepe.pe.gov.br>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548>>. Acesso em: 10 ago.2016.
- ARAKI, A. S. et al. Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Plos Neglect Tropical Disease, San Francisco, v. 3, n. 1, p. e.365, 2009.
- ARRIVALAGA, J. C.; FELICIANGELI, M. D. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within longipalpis (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v.38, p.783-790, 2001.
- AVISE, J. C. Molecular markers, Natural History and Evolution. New York: Chapman & Hall, 1994.
- AZPURUA, J. et al., *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and na exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. Plos Neglect Tropical Disease, San Francisco, v. 4, p. e.627, 2010.
- AYASSE, M. ET AL. Mating Behavior and Chemical Communication in the order Hymenoptera. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 46, p. 39-78, 2001.
- BAKER, T. C. Sex pheromone in Lepidoptera: new research proress. Experientia, Basel, v. 45, p. 248-262, 1990.
- BAUZER, L. G. C. R. et al. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complexo r a single species? A mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, p. 1-12, 2007.
- BAUZER, L. G. C. R. et al. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 734-9, 2010.
- BELLÉS, X. et al. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 50, p.181-199, 2005.
- BENTO, J. M. S. Fundamentos do monitoramento da coleta massal e do confundimento de insetos praga. In: VILELA E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. 2. ed. Ribeira Preto: Holoseditora, 2001. p.135-144.
- BOLSSET, W.; WILSON, E. The Analysis of Olfactory Communication Among Animals. Journal of Theoretical Biology, London, v.5, p. 443-469, 1963.

BORDEN, J. H. et al. *Gnathotrichus sulcatus*: Synergistic response to enantiomers of the aggregation pheromone sulcatol. Science, Washington, v. 192, p. 894-896, 1976.

BOTTON, M. Monitoramento da mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) na cultura do pessegueiro. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2001.

BOUFANA, B. et al. Development of tergal pheromone glands in male *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 80, p. 333-334, 1986.

BRAZIL, R. P. et al. The colonization and biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil, Jaboticabal, v. 26, p. 191-193, 1997.

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 9, n. 1, 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/publicações>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

BRAZIL, R. P. et al. Sand Fly vectors of *Leishmania* in the Americas – A Mini Review. Entomology, Ornithology & Herpetology, [S.l.], v. 4, n. 2, p.1-4, 2015.

BRAY, D. P.; HAMILTON, J. G. Courtship behaviour in the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, the New World vector of visceral leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 21, n. 4, p. 332-338, 2007.

BRAY, D. P. et al. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 46, n. 3, p. 428-434, 2009.

BRAY, D. P. et al. Research Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. Parasites & Vectors, London, v. 10, p. 1-11, 2010.

BRAY, D. P. et al. Synthetic Sex Pheromone in a Long-Lasting Lure Attracts the Visceral Leishmaniasis Vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 Weeks in Brazil. Plos Neglected Tropical Disease, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 1-9, 2014.

CANE, D.E. Isoprenoid Biosynthesis: Overview. In: Sir Derek Barton, Koji Nakanishi, Otto Meth-Cohn. Comprehensive Natural Products Chemistry. Oxford: Pergamon Press, 1999. v.2, p.1-13.

CARDE, R. T.; MINKS, A. K. Insect Pheromone Research: New Directions. New York: Chapman and Hall, 1997.

CARVALHO, M. R. et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n.5, p. 1227-1232, 2007.

CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica, Basel, v.116, n.1, p. 108-110, maio. 2010.

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. 5. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2012.

CHELBI, I.; BRAY, D. P.; HAMILTON, J. G. C. Courtship behaviour of *Phlebotomus papatasi* the sand fly vector of cutaneous leishmaniasis. Parasites & Vectors, London, v. 5, 2012. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-179>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

COUTINHO-ABREU, I. V. et al. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. Parasites & Vectors, London, v. 1, n. 16, p. 1-11, 2008.

DALY, H. V. et al. Introduction to insect biology and diversity. Oxford: Oxford University Press, 1998.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.43, n.6, p. 733-736, 2010.

DE LA HERRAN, R. et al. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. Heredity, Edinburg, v. 87, n. 6, p. 691-697, 2001.

DE LA RIVA, J. F. et al. Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p.1089-1094, 2001.

DEPAQUIT, J. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 28, p. 744-756, 2014.

DE SOUZA FREITAS, M. T. et al. Phenotypic and genotypic variation among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. Parasites & Vectors, London, v.8, p.448, 2015.

DE SOUZA FREITAS, M. T. et al. Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the period clock gene. Acta Tropica, Basel, v. 154, p. 149-154, 2016.

DE VRIES, H. J. C. et al. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. American Journal of Clinical Dermatology, Auckland, v.16, n.16, p. 99–109, 2015.

DUJARDIN, J. C. et al. Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 11, n. 4, p. 394-400., 1997.

DUJARDIN, J. C. et al. Cryptic speciation suspected by morphometry in sand fly (Diptera: Phlebotominae). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Life Science, v. 322, p. 375-382, 1999a.

DUJARDIN, J. C. et al. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 36, p.653-659, 1999b.

DUJARDIN, J. C. et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. Emerging Infectious Disease Journal, Atlanta, v.14, p. 1013-1018, 2008.

EIRAS, E. A. Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos vetores de doenças médico-veterinárias. In : VILELA E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. 2. ed. Ribeirão Preto: Holoseditora, 2001. p. 99-112.

EISENREICH, W. et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. Cellular and Molecular Life Science, Basel, v. 61, n.12, p.1401-1426, 2004.

EL NAIEM, D. E.; WARD, R. D. Na oviposition pheromone on the eggs of sandflies (Diptera: Psychodidae). Journal of Chemical Ecology, New York, v.18, p. 1165-1175, 1990.

EL NAIEM, D. E.; WARD, R. D. Response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to na oviposition pheromone associated with conspecific eggs. Medical Veterinary Entomology, Oxford, v.5, n.1, p.87-91, 1991.

ELNAIEM, D. E.; WARD, R. D. The thigmotropic oviposition response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Annals Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v.86, n.4, p.425-430, 1992.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology, Oxford. v.18, p. 7061-1067, 2004.

FELICIANGELI, M. D. et al. Molecular epidemiology reveals that *Lutzomyia migonei* and dogs (*Canis familiaris*) maintain at least two transmission cycles of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. Females in the Verrucarum group are also involved in the CL transmission in the study area. In: Turkish Journal of Parasitology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHLEBOTOMINE SANDFLIES, 7., 2011, Kusadasi. Abstract book. Kusadasi: Turkish Journal of Parasitology, 2011. p. 74-75.

FERVEUR, J. F. et al. Genetic Feminization of pheromones and its behavioral consequences in *Drosophila* males. Science, Washington, v. 276, p. 1555-1558, 1997.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, Cambridge, v. 3, p. 294-299, 1994.

- FORATTINI, O. P. Phlebotominae – Leishmanioses – Bartonelose. In: _____. Entomologia Médica. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. v. 4, p. 87-122.
- GALATI, E. A. B. Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, psychodidae). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014.
- GLINWOOD, R. T. et al. Responses to aphid sex pheromones by the peã aphid parasitoids *Aphidius ervi* and *Aphidius eady*. Entomologia Experimentalis et Applicata, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 227-232, 1999.
- GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. Nature, London, v.343, n.6257, p.425, 1990.
- GOMEZ, E.A. et al. Distribution of *Lutzomyia ayacuchensis*, the vector of Andean n-type cutaneous leishmaniasis at different altitudes on the Andean slope of Ecuador. Acta Tropica, Basel, v.137, p.118-122, 2014.
- GONZÁLEZ-CABALLERO, N. et al. Transcriptome exploration of the sex pheromone gland of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Parasites & Vectors, London, v. 6, n. 56, p. 3-16, 2013.
- GUIMARÃES, C. F. V. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Ferrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in Pernambuco, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 45, n. 1, p. 66-70, 2012.
- GUIMARÃES, C. F. V. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. Parasites & Vectors, London, v. 9, p.159, 2016.
- GUTIERREZ, M. A. C. et al. DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia, Plos One, San Francisco, v. 9, n. 1, p.1-10, 2014.
- HAMILTON, J. G. C. et al. 9-Methyl-germacrene B, a novel hemosesquiterpene from sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. Journal of Chemical Ecology, Oxford, v. 22, p. 1477-1491, 1996.
- HAMILTON, J. G. C. et al. 3-methyl- α -himachalene confirmed and the relative stereochemistry defined by synthesis as the pheromone of sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. Chemical Communication, Cambridge, n.24, p.355-356, 1999a.
- HAMILTON, J. G. C. et al. 9-Methyl-germacrene B is confirmed as the sex pheromone of the *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry is defined as S. Chemical Communications, Cambridge, n.24, p. 355-356, 1999b.
- HAMILTON, J. G. C.; BANDI, K. K. Mistura racêmica, compost, uso de uma mistura racêmica ou de seu isomer constituinte, métodos de controle ou monitoramento de mosquitos-pólvora, de prevenção de infecção e de sintetização de (\pm)-9-metilgermacreno, e, coleira de animal. BR n. P10500799, 2004.

- HAMILTON, J. G. C. et al. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. Medical Veterinary Entomology, Oxford, v. 19, p. 480-488, 2005.
- HAMILTON, J. G. Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. Parasite, Paris, v. 23, p.252-256, 2008.
- HANEL, R.; STURMBAUER, C. Multiple recurrent evolution of trophic types in northeastern Atlantic and Mediterranean seabreams (Sparidae, Percoidei). Journal of Molecular Evolution, New York, v. 50, n. 3, p. 276-283, 2000.
- HARDIN, P. E. et al. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature, London, v. 343, n.6258, p. 536-540, 1990.
- HERBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA. Proceeding of the Royal Society of London B Biological Science, London, v.270, p.313-321, 2003.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavior, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. Annals Review of Entomology, Palo Alto, v. 50, p.371-393, 2005.
- HOWSE, P. E. et al. Insect pheromones and their use in pest management. 1. ed. London: Chapman and Hall, 1998.
- IBGE. Ceará. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 25 jan. 2016
- IBGE. Pernambuco. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 25 jan. 2016
- IBGE. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 25 jan. 2016
- JOHANSSON, B. G.; JONES, T. M. The role of chemical communication in mate choice. Biological Reviews, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 265-281, 2007.
- JONES, T. M.; HAMILTON, J. V. C. A role of pheromones in mate choice in a lekking sandfly. Animal Behaviour, London, v. 56, p. 891-898, 1998.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolutionary, Berlin, v.16, p.11-120, 1980.
- KOVALESKI, A.; RIBEIRO, L. G. Manejo de pragas na produção integrada de maçãs. Bento Gonçalves: Embrapa, 2002. (Embrapa CNPUV. Circular Técnica, n. 34).
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eo-epidemiology of American visceral leishmaniasis with particular reference to Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n.8, p.811-827, 2005.

- LANE, R. P.; WARD, R. D. The morphology and possible function of abdominal patches in male of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Cahiers Orstom: Serie Entomologie Medicale et Parasitologie, Bondy, v. 22, p. 245-249, 1984.
- LANE, R. P.; READY, P. D. Multivariate discrimination between *Lutzomyia wellcomei*, a vector of mucocutaneous leishmaniasis and *Lu. Complexus* (Diptera: Phlebotominae). Annals Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 79, p. 469-472, 1985.
- LANE, R. P. et al. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 79, n. 2, p. 225-229, 1985.
- LANE, R. P.; BERNARDES, D. D. Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 84, n.1, p.53-61, 1990.
- LANZARO, G. C.; WARBURG, A. Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implications for leishmaniasis epidemiology. Parasitology Today, Cambridge, v. 11, p. 151-154, 1995.
- LARKIN, M.A. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, Oxford, v. 23, p.2947-2948, 2007.
- LATROFA, M. S. et al. Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 184, p. 267-270, 2012.
- LENG, Y. J. A. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Schuan and Guizhou province, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 81, p. 322-317, 1987.
- LEWIS, D. J. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). Bulletin of the British Museum (Entomology), London, v. 45, p. 121-209, 1982.
- LIMA COSTA, C. R. et al. Genetic structure and fixed polymorphism in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. Parasites & Vectors, London, v. 8, p.193, 2015.
- LINS, R. M. M. A. et al. Fixed Differences in the paralytic Gene Define Two Lineages within the *Lutzomyia longipalpis* Complex Producing Different Types of Courtship Songs. Plos One, San Francisco, v. 7, n. 9, p. 1-8, 2012.
- LOAIZA, J. R. et al. Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). Infection, Genetic and Evolution, Amsterdam v. 12, p. 1-12, 2012.
- MACNEIL, J. N.; MILLAR, J. G. Chemical communication: pheromone and allelochemical. In: CHAPMAN, R. F. The insects structure and function. 5. ed. New York: Cambridge University Press, 2012. p. 857-897.

MAZZONI, C. J. et al. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of Leishmaniasis. BMC Evolutionary Biology, London, v. 8, p.141, 2008.

MAHAMAT, H.; HASSANALI, A. Cuticular hydrocarbon composition analysis for taxonomic differentiation of phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Kenya. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 35, p. 778-781, 1998.

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

MAROLI, M. ET AL. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 27, p. 123-147, 2013.

MARCONDES, C. B. et al. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian State of Santa Catarina: preliminary results (Diptera: Psychodidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 38, n. 4, p.353-355, 2005.

MCLURE, M. et al. Courtship behavior in relation to the female sex pheromone in the parasitoid, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). Journal of Chemical Ecology, New York, v. 33, n.10, p. 1946-1959, 2007.

MCNEIL, J.; BRODEUR, J. Pheromone mediated mating in the aphid parasitoid, *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphididae). Journal of Chemical Ecology, New York, v. 21, n. 7, p. 959-972, 1995.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 41, n.4, p. 365-368, 2008.

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 44, n.1, p. 76-78, 2011.

MONTEIRO, F. A. et al. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma braziliensis* in Northeastern Brazil. Molecular Phylogenetic Evolution, San Diego, v. 32, p. 46-56, 2004.

MORTON, I. E.; WARD, R. D. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. Medical Veterinary Entomology, Oxford, v.3, p.219-223, 1989.

NARDI, J. B. et al. Fine structure of cells specialized for secretion of aggregation pheromone in nitidulid beetle *Carpophilus freeman* (Coleoptera: Nitidulidae). Tissue and Cell, Edinburgh, v. 28, p. 43-52, 1996.

NIEVES, E. et al. Physical Factors Influencing the Oviposition of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) in Laboratory conditions. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, n.6, p:733-737, 1997.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. Annual Review Entomology, Palo Alto, v. 19, p. 61-80, 1974.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Glands, Gland Cells, Glandular Units: some comments on Terminology and Classification. Annales de la Société Entomologique de France, Paris, v.27, p.123-128, 1991.

NZELU, C. O. et al. DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis endemic areas of Peru. Acta Tropica, Basel, v.145, p. 45-51, 2015).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

PERCY-CUNNINGHAM, J. E.; MACDONALD, J. A. Biology and ultrastructure of sex pheromone producing glands. In: PRESTWICH, G. D.; BLOMQUIST, G. J. (Ed.). Pheromone Biochemistry. Florida: Academic Press, 1987. p. 27-75.

PHILIPS, A. et al. Chemical analysis of compounds extracted from the tergal “spots” of *Lutzomyia longipalpis* from Brazil. Acta Tropica, Basel, v.43, n.3, p.271-276, 1986.

PHILIPS, A. et al. Intraspecific variation in the cuticular hydrocarbons of the sandfly *Phlebotomus perfiliewi* from Italy, Medical Veterinary Entomology, Oxford, v. 4, p. 451-457, 1990.

PIERRE, D. et al. Location and ultrastructure of sex pheromone glands in female *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology, Oxford, v. 25, p. 391-404, 1997.

PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *L. cruzi* and *L. forattini* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using PCR multiplex assay. Acta Tropica, Basel, v. 107, p. 66-69, 2008.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 80, n. 4, p. 593-595, 2009.

PITA-PEREIRA, D. et al. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. Acta Tropica, Basel, v. 120, n.3, p.273-275, 2011.

PLETTNER, E. Insect pheromone olfaction: new targets for the design of species-selective pest control agents. Current Medicinal Chemistry, Schiphol, v.9, n.10, p.1075-1085, 2002.

PRAMUAL, P. et al. Phylogeography of the Black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. Molecular Ecology, Oxford, v.14, p. 3989-4001, 2005.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.104, n. 7, p. 937-954, 2009.

REGNIER, F. E.; LAW, J. H. Insect Pheromones. The Journal of Lipid Research, Chicago, v.9, n. 5, p. 541-551, 1968.

RÊGO, F. D. et al. Molecular Detection of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniasis Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. Plos One, San Francisco, v. 10, n.4, p. e0122038, 2015.

RINGENBERG, R. Biologia comparada em dieta artificial, exigências térmicas e avaliação do feromônio sexual sintético de *Cryptoblabes gnidiella* (Millière, 1867) (Lepidoptera: Pyralidae) na cultura da videira. 2004. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

ROELOFS, W. L.; WOLF, W. A. Pheromone biosynthesis in Lepdoptera. Journal of Chemical Ecology, New York, v. 14, n. 11, p. 2019-2031, 1988.

SÁLOMON, O. D. et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. Acta Tropica, Cambridge, v. 113, p. 84-87, 2010.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology, St Albans, v.12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SANTOS, M. F. C. et al. Genetic Structure of *Lutzomyia longipalpis* in Mato Grosso do Sul, Brazil, Based on Microsatellite Markers. Plos One, San Francisco, v. 8, n. 9, p. 1-7, 2013.

SANTOS, M. F. C. et al. Morphometric analysis of *Longiplapis* (Diptera: Psychodidae) complex populations in Mato Grosso do Sul, Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 52, n. 3, p. 359-367, 2015.

SARAIVA, L. et al. . Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of the Velhas River in the state of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, p. 843–846, 2008.

SAWYER, L. A. The period gene Thr-Gly polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: implications for selection. Genetics, Austin, v. 174, n. 1, p. 465-481, 2006.

SCARPASSA, V. M. et al. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 78, p. 895-903, 2008.

SCARPASSA, V. M.; CONN, J. E. Mitochondrial DNA detects a complex evolutionary history with Pleistocene epoch divergence for the neotropical malaria vector *Anopheles*

nuneztovari sensu lato. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.85, p. 865-867, 2011.

SCARPASSA, V. M.; ALENCAR, R. B. *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of *Leishmania guyanensis*, Represents a novel species complex? Plos One, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e37341, 2012.

SCARPASSA, V. M. et al. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. Parasites & Vectors, London, v. 6, p.258, 2013.

SCARPASSA, V. M. et al. Genetic diversity and population structure in the *Leishmania guyanensis* vector *Lutzomyia anduzei* (Diptera, Psychodidae) from the Brazilian. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 31, p.312-320, 2015.

SCHAL, C. et al. Neural and endocrine control of pheromone production and release in cockroaches. In: CARDE, R. T.; MINKS, A. K. (Ed.). Insect Pheromone Research: New Directions. New York: Chapman and Hall, 1997. p. 3-20.

SILVA, M. H. et al. Genetic differentiation in natural populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) with different phenotypic spot patterns on tergites in males. Neotropical Entomology, Londrina, v. 50, p. 501-506, 2011.

SOARES, R. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 75, p.301-370, 2003.

SOUZA, N. A. et al. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 41, p. 906-913, 2004.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. New York: W. H. Freeman and Company, 1995.

SPIEGEL, C. N. et al. Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) sandfly species. Arthropod Structure & Development, Oxford, v. 30, p. 159-250, 2002.

SPIEGEL, C. N. et al. Ultrastructural cytochemistry of the sex pheromone glands of *Lutzomyia cruzi* male sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Arthropod Structure & Development, Oxford v. 33, p. 399-404, 2004.

SPIEGEL, C. N. et al. (1S, 3S, 7R) -3-methyl-alpha-himachalene from the male sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) induces neurophysiological responses and attracts both males and females. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 51, p. 1366-1375, 2005.

SPIEGEL, C. N. et al. Pheromone Gland Development and Pheromone Production in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 48, n.3, p.489-495, 2011.

TAMURA, K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology Evolutionary, Hoboken, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

TILLMAN, J. A. et al. Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. Insect Biochemistry Molecular Biology, Oxford, v. 29, n. 6, p. 481-514, 1999.

VIGODER, F. et al. Copulatory courtship song in *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 1065-1067, 2010.

VILELLA, E. F.; DELLA-LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: VILELLA, E. F.; DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed.). Feromônio de Insetos: Biologia, Química e Aplicação. 2. ed. Ribeirão Preto: Holoseditora, 2001. p. 9-12.

WARD, R. D. et al. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: SERVICE, M.W. (Ed.). Biosystematics of haematophagous insects. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 1983. p. 258-269.

WARD, R. D. et al. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: SERVICE M. W. (Ed.). Biosystematics of haematophagous insects. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 1988. p. 257-269.

WARD, R. D. et al. biosaay as an indicator of pheromone communication in *Lutzomyis longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Nato Asis series in Leishmaniasis, Zakynthos, v. 163, p. 239-247, 1988.

WARD, R. D. et al. Pheromones in Old and New World sandflies (Diptera: Psychodidae). Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 85, n. 6, p. 667-668, 1991.

WATTS, P. C. et al. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. American of Journal Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 73, n.4, p. 734-743, 2005.

WICKER-THOMAS, C. Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 53, p. 1089-1100, 2007.

WILLIAMS, P. Phlebotomida. In: NEVES D. (Ed.). Parasitologia Humana. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 370-382.

WILLIAMS, P. Psychodidae. In: NEVES D. (Ed.). Parasitologia Humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 311-319.

WRIGHT, R. H. Insect control by nontoxic means. Science, Washington, v. 144, p. 487, 1964a.

WRIGHT, R. H. After pesticides – what? Nature, London, v. 204, p.123-124, 1964b.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville: Memoirs of the American Entomological Institute, 1994. v. 54, p. 887.