

Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

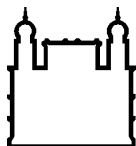
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Análise dos sinais acústicos de diferentes populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* e de *Lutzomyia cruzi*.**

**Felipe de Mello Vigoder**

**Orientador:** Dr. Alexandre Afranio Peixoto.

**RIO DE JANEIRO**  
Fevereiro 2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Análise dos sinais acústicos de diferentes populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* e de *Lutzomyia cruzi*.**

**Felipe de Mello Vigoder**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestrado em Biologia Parasitária.

**Orientador:** Dr. Alexandre Afranio Peixoto.

**RIO DE JANEIRO**

Fevereiro 2007

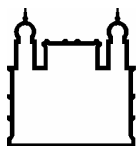
Vigoder, Felipe de Mello

**Análise dos sinais acústicos de diferentes populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* e de *Lutzomyia cruzi*.**

Tese de Mestrado em Biologia Parasitária apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, 2007.

1. Som de cópula 2. *Lutzomyia* 3. comportamento sexual 4. complexo de espécies 5. Leishmaniose

Número de Páginas: 69



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Oswaldo Cruz  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

## **Análise dos sinais acústicos de diferentes populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* e de *Lutzomyia cruzi*.**

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária, área de concentração: **Biologia.**

### **Banca Examinadora:**

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil – Revisor do texto e Presidente da banca examinadora  
**FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**

Dra. Blanche Christine Bitner-Mathé

**Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biologia / Departamento de Genética**

Dra. Carolina Nascimento Spiegel

**Universidade Federal Fluminense / Instituto de Biologia / Departamento de Biologia Molecular e Celular**

Dr Marcelo Gonzalez

**Universidade Federal Fluminense / Instituto de Biologia / Departamento de Biologia Molecular e Celular**

Dr Cícero brasileiro de Mello Neto

**Universidade Federal Fluminense / Instituto de Biologia / Departamento de Biologia Molecular e Celular**

**Trabalho realizado no laboratório de Biologia Molecular de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, sob a orientação do Dr. Alexandre Afranio Peixoto.**

## **Agradecimentos:**

Ao Dr Alexandre Peixoto pela oportunidade de realizar esse trabalho. Pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Por todos os ensinamentos, pela paciência e horas gastas auxiliando este trabalho. Pela amizade e pela honra de me aceitar como parte de sua família.

À minha mulher Hilana Ceotto pelo carinho e amor. Pela compreensão durante o processo de preparação desta dissertação e pela ajuda sem a qual esse trabalho não seria completado.

Aos meus pais, Mauricio e Solange, pela minha criação e pelas oportunidades dadas a mim. As minhas irmãs, avós e padrinhos pelo carinho, compreensão e incentivo.

Ao amigo Dr Reginaldo Brazil pela revisão dessa dissertação. Pelas sugestões e idéias dadas para a melhora deste trabalho.

À amiga Dra Nataly Araujo de Souza pela confiança e oportunidade para que eu desse prosseguimento a este trabalho.

A Fiocruz e ao curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária pelo apoio e oportunidade de desenvolvimento desta dissertação e pelo privilégio de portar o nome da instituição na minha carreira profissional.

A toda a banca examinadora pela ajuda e contribuição para a melhora desta dissertação.

A todos os meus amigos de laboratório atuais e aos que apesar de estarem longe tornaram a elaboração deste trabalho ainda mais agradável: Ademir, Almina, Antônio, Camila, Carla, Denise, Gabriel, Gustavo Resende, Gustavo Rivas, Ingrid, João, Jutta, Kiko, Luisa, Patrícia, Rachel Lins, Rachel Canto, Rafaela, Renata,

Ricardo, Sabrina, Saori, Tâmara, Wanda. Um agradecimento especial ao Robson, o Paulo e Lourdes pela disposição e soluções inovadoras que tanto enriqueceram nossa pesquisa.

Aos meus companheiros de mestrado que se tornaram grandes amigos e ajudaram a tornar todo o processo desse mestrado, inclusive as aulas cansativas de depois do almoço, em uma experiência extremamente prazerosa. Um agradecimento especial aos pais de Cíntia Caramelo por inúmeras vezes ceder sua casa para todas as nossas confraternizações.

Aos meus amigos, muitos já mencionados, pela presença e pelo incentivo constante sempre que necessário.

Ao CNPQ pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Ao HHMI, CNPQ e Fiocruz pelo apoio financeiro ao projeto.

## Índice:

Resumo.....	
..i	
Abstract.....	
..ii	
1	–
Introdução.....	1
1.1	–
Sinais acústicos em	
Drosophila.....	1
1.2	–
Sinais Acústicos em Insetos	
Vetores.....	4
1.3	–
Sinais Acústicos e o Complexo <i>Lutzomyia</i>	
<i>longipalpis</i> .....	9
2	–
Objetivos.....	13
3	–
Material	e
Métodos.....	14
3.1	–
Insetos.....	14
3.2	–
Gravação do	
som.....	15
4	–
Resultados.....	20
4.1	–
Populações	
naturais.....	23
4.1.1	–
Padrão	
pulsado.....	23
4.1.2	–
Padrão	
“burst”.....	31
4.1.3	–
Padrão	
misto.....	39
4.1.4	–
Comparação dos diferentes padrões de	
som.....	43



4.2	Análise do som de machos de colônias antigas.....	48
5		–
	Discussão.....	51
6		–
	Conclusão.....	57
7		–
	Bibliografia.....	58

## Índice de figuras e tabelas:

Figuras:	Tabelas:
1.1 .....2	4.1 .....27
1.2 .....4	4.2 .....28
1.3 .....5	4.3 .....29
1.4 .....8	4.4 .....30
1.5 .....11	4.5 .....35
1.6 .....12	4.6 .....36
3.1 .....17	4.7 .....37
3.2 .....18	4.8 .....38
3.3 .....18	4.9 .....41
3.4 .....19	4.10.....42
3.5 .....19	4.11.....50
4.1 .....21	
4.2 .....22	
4.3A.....25	
4.3B.....26	
4.4A.....32	
4.4B.....33	
4.5 .....34	
4.6 .....40	
4.7 .....44	
4.8 .....45	
4.9 .....46	
4.10.....47	
4.10.....49	

## **I. Resumo:**

Sinais acústicos são importantes na corte de diversos insetos. Esse som é geralmente espécie-específico sendo importante para o isolamento reprodutivo de espécies próximas. Machos de *Lutzomyia longipalpis* produzem sinais acústicos durante a cópula. Existem fortes evidências de que esta taxa constitui um complexo de espécies. *Lutzomyia cruzi* é uma espécie próxima a *L. longipalpis* que possivelmente também faz parte deste complexo.

Em nosso trabalho, foram analisados detalhadamente os sons de cópula de machos de 14 populações brasileiras de *L. longipalpis*, sendo seis destas provenientes de três localidades (Sobral, Estrela de Alagoas e Jaíba) onde análises prévias indicavam a ocorrência de espécies simpátricas cujos machos diferem no número de pintas abdominais (uma ou duas pintas, chamados respectivamente de 1P e 2P). Foi analisado também o som de machos de *L. cruzi*.

A análise mostrou que o som produzido durante a cópula, tanto por machos de diferentes populações de *L. longipalpis* quanto de *L. cruzi*, é composto por um som primário mais rápido e um secundário mais lento. O som secundário é semelhante em todas as populações estudadas, enquanto que, o primário apresenta variação significativa tendo sido encontrados três tipos diferentes: o som pulsado, o de “burst” e o misto.

O tipo pulsado é diversificado e foi encontrado nas populações de Jacobina, Lapinha, Sobral 1P, Teresina, Jaíba 1P e Estrela 1P. Cinco padrões diferentes foram observados entre estas populações. Estes padrões diferem significativamente em todos os parâmetros analisados (intervalo entre pulsos, número de pulsos, tamanho do trem, frequência e ciclos por pulso). As populações de Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porteira produzem som do tipo “burst”. A comparação destas populações mostrou diferenças significativas apenas no intervalo entre “bursts”. Além disso, o padrão em si não é diferente entre elas. Esse tipo de som foi observado também em *L. cruzi*. O padrão misto foi observado apenas em machos de Mesquita. Este padrão apresenta características dos outros dois padrões apesar de mostrar diferenças significativas em todos os parâmetros quando comparados com os outros dois.

Neste trabalho foi analisado também o som de machos de duas colônias de *L. longipalpis* (Jacobina e Marajó) mantidas há muitos anos no laboratório. Constatou-se que apesar de serem observadas diferenças significativas em alguns parâmetros, o padrão se mantém inalterado.

Os resultados encontrados confirmam a hipótese da existência de um complexo longipalpis no Brasil e evidenciam o som de cópula como uma boa ferramenta para identificar as espécies crípticas deste complexo.

## **II. Abstract**

Acoustic signals are important in the courtship of many insects. This song is usually species-specific and is important in the reproductive isolation of closely related species. *Lutzomyia longipalpis* males produce acoustic signals during copulation. There are strong evidences that this taxon represents a species complex. *Lutzomyia cruzi* is closely related to *L. longipalpis* and is probably part of this complex.

We analyzed de copulation songs of 14 Brazilian populations of *L. longipalpis*, six of them from three localities (Sobral, Estrela de Alagoas e Jaíba) where previous analyzes indicated the occurrence of sympatric species, which the males differ in the number of abdominal tergal spots (one and two spots, called respectively 1P and 2P). We also analyzed the copulation song of *L. cruzi*.

This analysis showed that the song produced during copulation by males of both *L. longipalpis* and *L. cruzi* has two different components: a faster primary song and a slower secondary song. The latter is similar in all studied population, whereas the primary song has significant variation with three different types been found: pulse type, burst type and intermediary type songs.

The pulse type is diversified and was found in the populations of Jacobina, Lapinha, Sobral 1P, Teresina, Jaiba 1P e Estrela 1P. Five different patterns were observed among these populations. These patterns are significantly different in all parameters analyzed (inter pulse interval, pulse number, train size, frequency and cycles per pulse). The populations of Sobral 2P, Jaiba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porteira produce the burst type song. The comparison of these populations showed significant differences only in the inter burst interval. In addition, the pattern itself is similar between them. This type of song was also found in *L. cruzi*. The intermediary type song was observed only in males from Mesquita. This type presents characteristics of both pulse and burst type songs even though it shows significant differences in all parameters when compared to the other two types.

We also analyzed the songs of males from two colonies of *L. longipalpis* (Jacobina and Marajó) kept in laboratory for many years. We observed that although significant differences are found in some parameters, the pattern itself does not change.

Our results confirm the hypothesis of the existence of a longipalpis complex in Brazil and show the copulation song as a good tool to identify cryptic species in this complex.

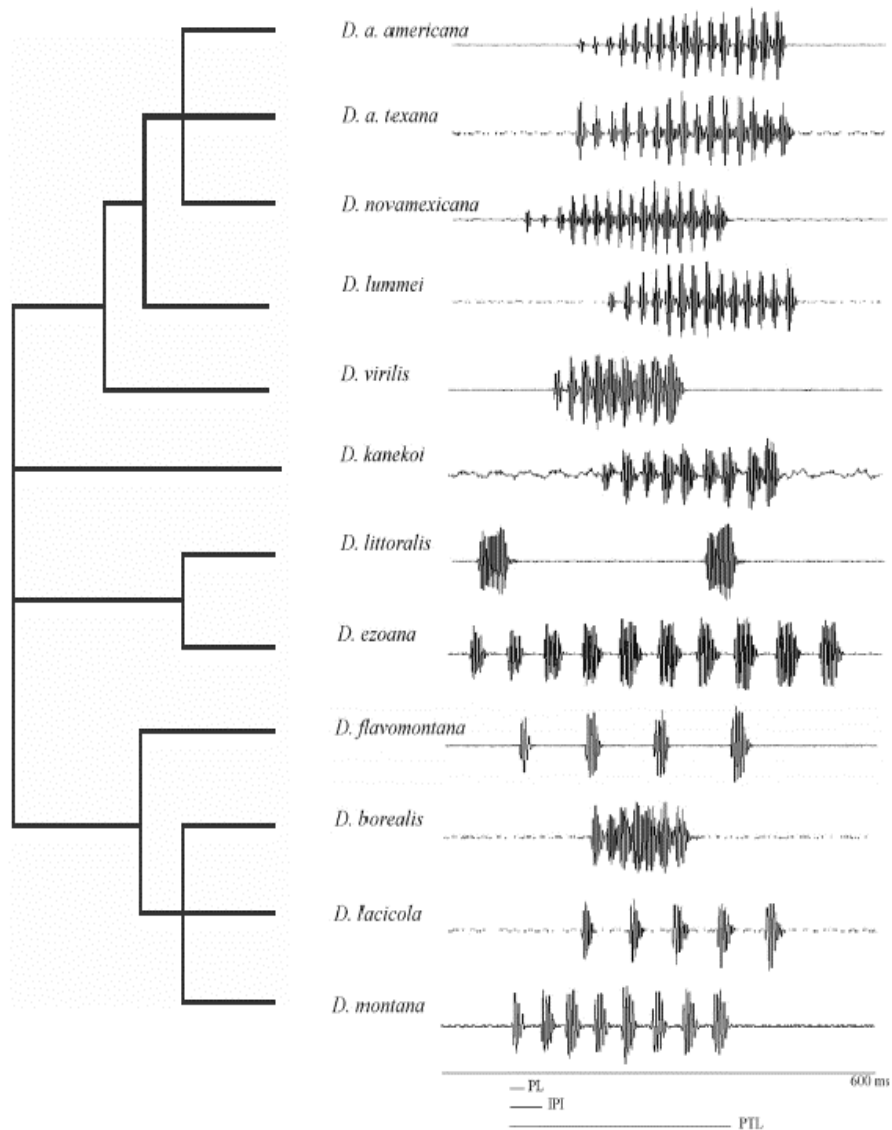
## **1. Introdução:**

Os insetos possuem diversas formas de comunicação. Uma delas é por meio de sinais acústicos que são produzidos basicamente de cinco maneiras: por vibração das asas ou de apêndices (e.g. *Drosophila melanogaster*); por estridulação, produzida pela fricção de duas estruturas corporais (e.g. *Triatoma infestans*); por percussão, mecanismo no qual o inseto bate duas partes de seu corpo (e.g. *Hecatesia exultans*); por expulsão do ar através de um tubo (e.g. *Brachinus brachinus*); ou por um mecanismo timbal (e.g. *Cystosoma saundersii*) (Ewing, 1989). Os sons emitidos pelos insetos, independente da forma como são produzidos, possuem essencialmente a função de comunicação tanto intra quanto interespecífica. Esses sinais podem servir como um mecanismo de defesa (Masters, 1979) ou para o reconhecimento espécie-específico entre machos e fêmeas durante a corte (Kyriacou & Hall, 1986). A geração de som pode ainda estar relacionada a outras atividades como o controle da temperatura interna em tsé-tsé (Howe & Lehane, 1986).

### **1.1 Sinais acústicos em *Drosophila***

Muitos estudos de comunicação sonora em insetos foram feitos com moscas do gênero *Drosophila*. Mais de cem espécies deste gênero já tiveram seus sinais acústicos caracterizados (Ewing, 1989; Tauber & Eberl, 2003) e a grande maioria das espécies estudadas produzem um ou dois tipos de som (Hoikkala, 1985) (Fig. 1.1). Por exemplo, espécies do subgrupo *Drosophila affinis* produzem um som no início e outro na parte final da corte (Chang & Miller, 1978). Já *Drosophila melanogaster* emite um som de baixa frequência tipo senóide que serve para estimular a fêmea (von Schilcher, 1976), e também um som pulsado que parece servir, também, para o reconhecimento da espécie (Ewing & Bennet-Clark, 1968).

O primeiro sinal acústico deste gênero a ser caracterizado foi o de *D. melanogaster*, gravado por Shorey (1962), que verificou que o som emitido pela vibração da asa do macho durante a corte era constituído por pulsos descontínuos, com cerca de 30 pulsos por segundo, e que esta frequência variava com a temperatura.



**Figura 1.1:** Exemplos de sons de corte de algumas espécies do gênero *Drosophila*.

Posteriormente, Ewing & Bennet-Clark (1968) analisaram o som de machos de espécies diferentes do grupo *melanogaster* e do grupo *obscura* e constataram que o som devia ser espécie-específico devido à variação interespecífica existente. Eles viram ainda que, em alguns casos, as fêmeas virgens e que não estão fisiologicamente maduras para a cópula também produzem um som que faz com que os machos interrompam a corte. Este sinal acústico é semelhante entre as espécies estudadas.

Outra característica interessante do som de *Drosophila* é o ritmo no intervalo médio entre pulsos (IPI) que é uma característica do som que também é espécie-específica (Kyriacou & Hall, 1980; Kyriacou & Hall, 1982). Um dado interessante do

trabalho de Kyriacou & Hall (1980) foi a constatação de que a periodicidade do som estava sendo regulada pelo gene *period* (*per*) que também atua no controle do relógio circadiano (circa = cerca, diem = dia) (Konopka & Benzer, 1971).

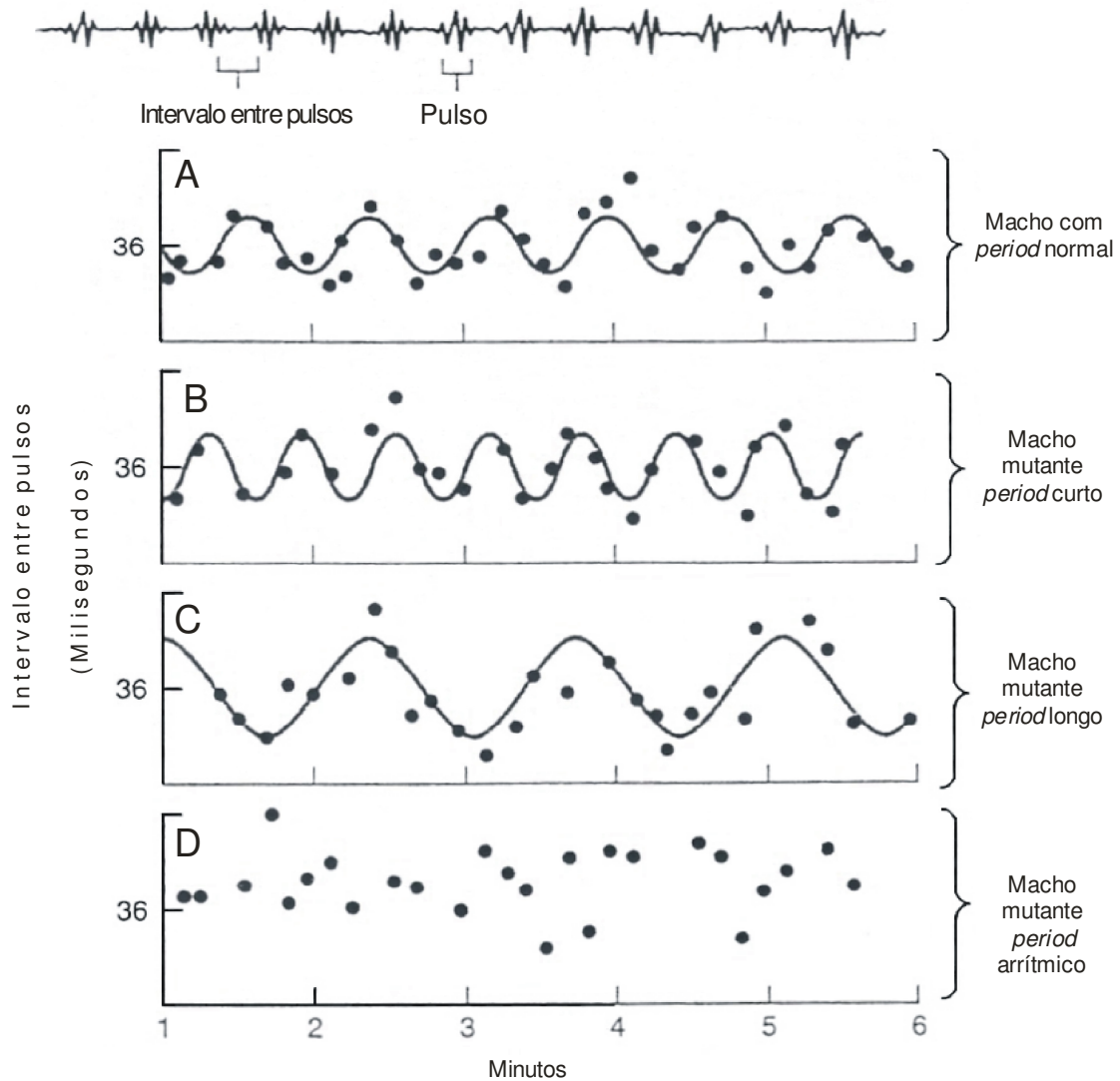
O gene *per* foi identificado a partir de três mutações induzidas quimicamente por Konopka & Benzer (1971). Eles verificaram que esses mutantes apresentavam seu ritmo circadiano de atividade locomotora alterado podendo ter tanto períodos mais curtos (mutante *per<sup>s</sup>*), como mais longos (mutante *per<sup>l</sup>*) ou ainda não ter ritmo nenhum (mutante *per<sup>01</sup>*). O que Kyriacou & Hall (1980) descobriram mais tarde é que a alteração da periodicidade do som é similar à do relógio circadiano, assim o mutante *per<sup>s</sup>* tem também um período de oscilação do IPI mais curto e assim sucessivamente (Fig. 1.2). Posteriormente os mesmos autores (Kyriacou & Hall, 1982; Kyriacou & Hall, 1986), em experimentos utilizando a técnica de 'playback', constataram que a interação desta oscilação, conhecida hoje como ciclos de "Kyriacou & Hall" (Ritchie *et al*, 1999), com o valor médio do IPI afetava a rapidez com que as fêmeas aceitavam os machos para a cópula. Além disso, outros experimentos utilizando 'playback' mostraram que não é a mera variação do IPI que estimula a cópula, mas sim, a presença dos ciclos de "Kyriacou & Hall" (Ritchie *et al*, 1999). Esse tipo de ensaio já comprovou também o potencial do som para influenciar o isolamento sexual entre espécies (Kyriacou & Hall, 1986; Ritchie *et al*, 1998; Ritchie *et al*, 1999; Isoherranen *et al*, 1999).

Outros genes que afetam o som já foram identificados em *Drosophila* como *cacophony* (*cac*) e *no-on-transient A* (*nonA*), entre outros (Kulkarni *et al*, 1988; Rendal *et al*, 1992; Smith *et al*, 1996; Yamamoto *et al*, 1997; Peixoto & Hall, 1998; Gleason 2005). Além de genes que afetam o som, já foi iniciada também a identificação de loci controlando a escolha das fêmeas pelo som do macho da mesma espécie como, por exemplo, nas duas espécies irmãs *Drosophila ananassae* e *Drosophila pallidosa* (Doi *et al*, 2001).

Como mencionado acima, em muitas espécies de *Drosophila* as fêmeas também produzem som (Hoikkala, 1993), como é o caso de todas as espécies do grupo *Drosophila virilis* (Satokangas *et al*, 1994). Em algumas destas espécies, *Drosophila borealis*, *Drosophila flavomontana*, *Drosophila lacicola*, *Drosophila montana* e *Drosophila kanekoi*, esse som é espécie-específico podendo portanto apresentar um papel importante no isolamento reprodutivo.

Outro aspecto importante nesta comunicação acústica é a recepção do som por parte da fêmea. O som produzido pelo macho faz com que a antena da fêmea

vibre e transmita a “mensagem” para o órgão de Johnston localizado na região do pedicelo da antena (Gopfert & Robert, 2002).



**Figura 1.2:** Ritmo do intervalo entre pulsos no som dos machos de *Drosophila melanogaster* selvagens e de moscas mutantes do gene *period*. **A.** Macho selvagem. **B.** Mutante com o período curto (*per<sup>s</sup>*). **C.** Mutante com o período longo (*per<sup>l</sup>*). **D.** Mutante arrítmico (*per<sup>0</sup>*). (modificado de Greenspan, 1995).

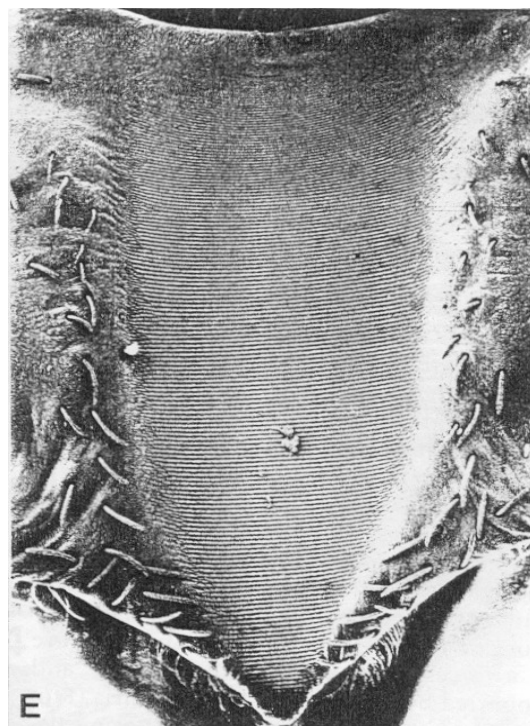
## 1.2 Sinais Acústicos em Insetos Vetores.

Alguns insetos vetores também produzem som. Os triatomíneos (Hemíptera: Reduviidae), vetores da doença de Chagas, são um deles. Apesar de nem todas as espécies dessa sub-família estridularem, os que estridulam, como *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, o fazem ao esfregarem a ponta da probóscida no órgão



estridulatório (Schofield, 1977). Essa estridulação parece ser transmitida, para outros triatomíneos, por vibrações através do substrato e deve ser captada por órgãos presentes na tíbia, já que estes insetos parecem não apresentar um órgão de captação do som transmitido pelo ar (Manrique & Schilman, 2000).

O órgão estridulatório (Fig. 1.3), responsável pela produção do sinal acústico, é constituído por uma série de ranhuras longitudinais na cutícula e está presente em todos os estágios de *T. infestans*. No primeiro estágio de ninfa ele é pouco desenvolvido, já a partir do segundo estágio, este órgão passa a ser claramente definido e as estrias passam a ser paralelas. À medida que o inseto se desenvolve e muda de um estágio de ninfa para outro, até chegar o adulto, o órgão estridulatório aumenta em comprimento e largura e, no espaço entre as estrias. No entanto, o número de estrias não varia de forma regular. Essas diferenças de caracteres fazem com que a estridulação seja diferente nos diferentes estágios de vida (Di Luciano, 1981).



**Figura 1.3:** Órgão estridulatório de *T. infestans* (retirado de Di Luciano, 1981).

A estridulação é constituída de duas séries de movimentos um no sentido ântero-posterior e um mais intenso no sentido pósterio-anterior (Roces & Manrique, 1996). Cada uma dessas séries é composta por um conjunto de sílabas sendo que cada sílaba contém um grupo de picos intra-silábicos. A distância entre os picos é pequena inicialmente, mas aumenta à medida que a sílaba vai chegando ao fim (Schofield, 1977).

Os sinais acústicos são emitidos pelos triatomíneos em pelo menos duas ocasiões: ao ser preso, impossibilitando o movimento livre causando o que foi chamado de som ou vibração de distúrbio (Schofield, 1977; Roces & Manrique, 1996), e um som ou vibração produzido pela fêmea durante a corte para rejeitar a cópula (Manrique & Lazzari, 1994).

O som ou vibração de distúrbio aparenta ter a função de defesa (Leston, 1957). Já foi visto que a estridulação pode desempenhar este papel em outros insetos (Masters, 1976). Schilman e colaboradores (2001) consideraram que, se a hipótese da função defensiva fosse verdadeira, o som de distúrbio poderia ser generalizado em triatomíneos. No intuito de verificar esta hipótese, foi analisado o som de machos e fêmeas de *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana*, *Rhodnius prolixus* e *Dipetalogaster maxima*. Os autores verificaram que, apesar das diferenças físicas do órgão estridulatório, a frequência era semelhante, em torno de 2000 Hz, assim como o número de repetições, cerca de oito sílabas por segundo. Com base nisso, eles teorizaram a existência de algum tipo de mecanismo compensatório como a alteração na velocidade de atrito para manter estes padrões semelhantes.

O som ou vibração de rejeição é produzido pela fêmea durante a corte após o macho subir em seu dorso, tanto em *T. infestans* quanto em *R. prolixus*, até que ele desista de realizar a cópula (Manrique & Lazzari, 1994; Manrique & Schilman, 2000). O sinal de rejeição em *T. infestans* é mais rápido que o de distúrbio, sendo repetido a uma taxa de 23,8 sílabas/s. A frequência também é significativamente diferente neste tipo de ruído ficando na faixa de 700-800 Hz. Em *R. prolixus*, a vibração é repetida numa velocidade de aproximadamente 35,6 sílabas/s e possui uma frequência de cerca 1500 Hz. Outra diferença entre as duas espécies é que as sílabas na segunda são mais curtas que na primeira (Manrique & Lazzari, 1994; Manrique & Schilman, 2000).

Outro vetor capaz de emitir sinais acústicos é a mosca tsé-tsé, *Glossina spp* (Diptera: Muscidae), que transmite a doença do sono. Os sons são produzidos pela vibração das asas e têm origem na rápida contração dos músculos de vôo do pterotórax (Popham *et al*, 1977). Esses insetos emitem uma diversidade de sons, dentre eles estão os relacionados com a alimentação e com a corte (Popham *et al*, 1977). A atividade de canto se concentra na parte da manhã como todas as outras atividades de *Glossina* (Saini, 1981).

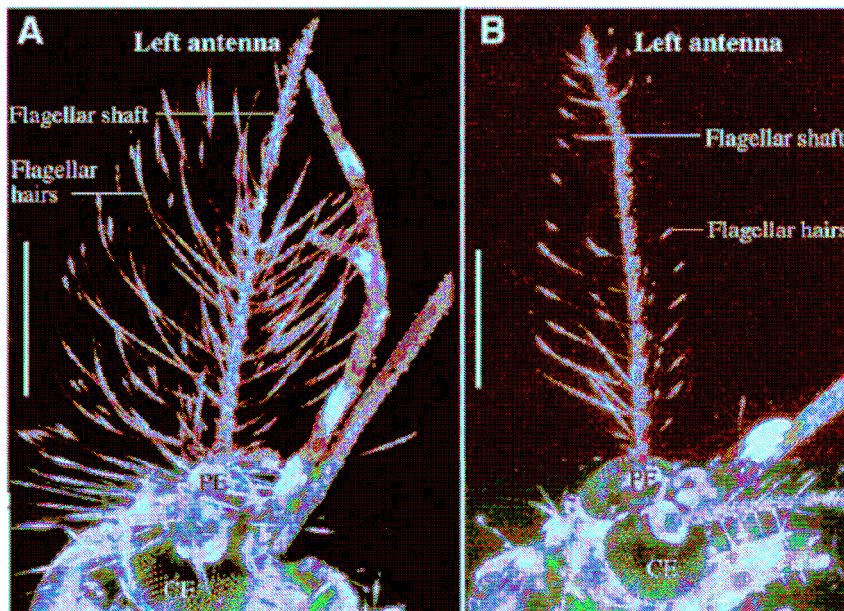
O som de alimentação ser produzido antes e/ou depois do repasto sanguíneo propriamente dito. O ruído pré-alimentação é raro em machos e em fêmeas virgens, mas é relativamente comum em fêmeas inseminadas, 20% deste grupo gera este tipo de som. O som pós-alimentação é mais comum, sendo produzido principalmente por fêmeas inseminadas (Saini, 1983). Este som é espécie-específico e Popham e colaboradores (1977) mostraram que as moscas são capazes de responder ao som de sua espécie, mas não ao de outras. Essa resposta ao som é caracterizada pelo aumento da atividade e pela extensão de sua probóscida.

Tanto Saini (1983) quanto Popham e colaboradores (1977) sugeriram que o som de pós-alimentação teria a função de atrair outros indivíduos da mesma espécie para um local adequado com alimento disponível. No entanto, Howe & Lehane (1986), apesar de não descartarem esta hipótese, verificaram que a contração muscular feita para gerar o som produzia também calor aumentando a temperatura torácica. Além disso, eles verificaram que o tempo de som produzido pela mosca após a alimentação estava relacionado à temperatura torácica inicial. Assim este zumbido exerceria um papel na termo-regulação da mosca, e mais que isso, talvez fosse para otimizar a “decolagem” que seria mais difícil devido ao ganho de peso.

As fêmeas de *Glossina morsitans* produzem ainda um som após colocar os ovos, que é bem diferente dos outros sendo bem mais longo. Enquanto, os outros duram segundos, este se prolonga por aproximadamente de 6 minutos (Denlinger *et al*, 1983).

Outros dípteros vetores capazes de produzir sinais acústicos são os mosquitos (Diptera: Culicidae). Esse grupo foi o primeiro a ter seu som comentado por Christopher Johnston (1855) (citado em Belton, 1994). Nestes insetos, que são vetores de diversas doenças como a dengue e a malária, o som de vôo desempenha papel importante no comportamento sexual (Belton, 1994).

Em alguns gêneros da família Culicidae, os machos possuem olhos pouco desenvolvidos, no entanto o órgão de Johnston, responsável pela captação do som, é muito desenvolvido (Clementes, 1999) (Fig. 1.4).



**Figura 1.4:** Antena de machos (A) e fêmeas (B) de *Aedes aegypti* (retirado de Gopfert & Robert, 2001).

É interessante notar que diferentes espécies reagem de forma distinta ao som. Duhrkopf & Hartberg (1992) verificaram que os machos de *Aedes albopictus* não respondem ao som de vôo das fêmeas e que estas produzem um som mais fraco e variável do que as fêmeas de *Aedes aegypti*. Ao contrário de *Ae. albopictus*, os machos de *Ae. aegypti* são atraídos pelo som de vôo das fêmeas principalmente na frequência de 465 Hz. Nesse trabalho, os autores não encontraram diferença significativa na frequência do som de vôo dessas duas espécies. Posteriormente, entretanto, foi visto que esta similaridade era devido à baixa taxa de amostragem utilizada na gravação feita por Duhrkopf & Hartberg (1992) (Brogdon, 1994).

Em anofelinos também é possível observar diferenças no som de vôo tanto de machos quanto de fêmeas. A comparação de colônias de laboratório de espécies do complexo *Anopheles gambiae* (*Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles merus* e *Anopheles melas*) mostrou diferenças significativas entre algumas destas espécies. Apenas as espécies *An. melas* e *An. merus*, que não se encontram espacialmente em nenhuma localidade, não apresentam diferenças na frequência do som de vôo, sugerindo que este pode ser um fator no isolamento reprodutivo entre as espécies simpátricas do complexo (Brogdon, 1998).

Experimentos utilizando a F1 de indivíduos selvagens de *An. gambiae* e *An. arabiensis* mostraram que os sons são significativamente diferentes com frequências médias semelhantes as encontradas por Brogdon (1998), mas a distribuição apresenta uma sobreposição maior do que no estudo com insetos da colônia

(Wekesa *et al*, 1998). Eles viram ainda que o som das fêmeas varia menos que o dos machos, o que é consistente com a hipótese de que são estes últimos que usam a informação acústica para identificar as fêmeas da própria espécie.

O som pode ser utilizado em armadilhas específicas para atrair determinadas espécies de mosquito. De fato este método vem sendo usado desde Kahn & Offenhauser (1949). Apesar do sucesso limitado até o momento, os testes vêm melhorando ao longo dos anos com o desenvolvimento de novas tecnologias nos equipamentos de som, o que deve aprimorar a performance deste tipo de armadilha segundo Belton (1994).

### **1.3 Sinais Acústicos e o Complexo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)**

Os insetos do gênero *Lutzomyia* estão incluídos na ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae. Várias espécies deste grupo já foram incriminadas como vetores de *Leishmania* nas Américas (Young & Duncan, 1994).

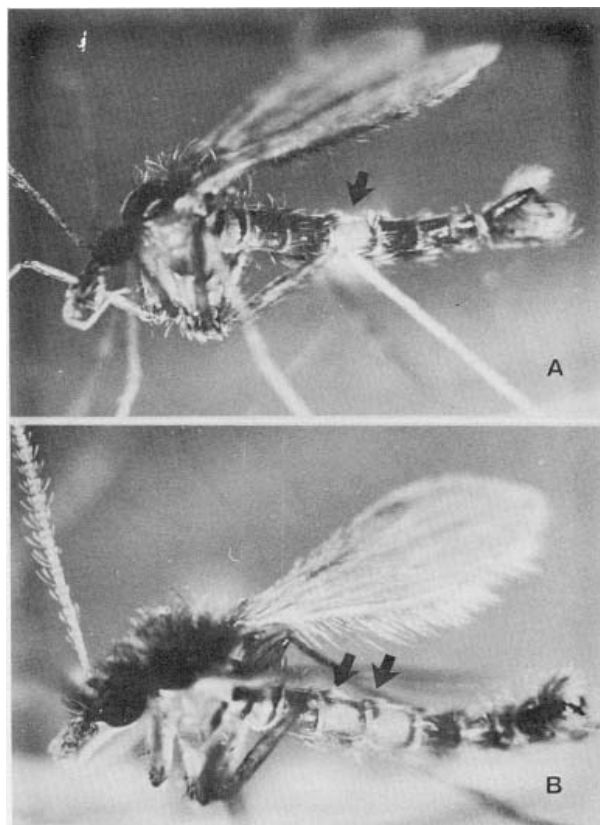
Esta espécie é o principal vetor da leishmaniose visceral americana (Young & Duncan, 1994), podendo ser encontrada desde o México até o norte da Argentina (Young & Duncan, 1994). Esta doença tem como agente etiológico a *Leishmania chagasi* e se estima que ocorra cerca de meio milhão de novos casos no mundo por ano ([www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht\\_leishmania.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm)). Várias evidências sugerem que este táxon representa um complexo de espécies no Brasil (revisado por Uribe, 1999; Bauzer *et al*, 2007). Uma das espécies que parece fazer parte deste complexo é *Lutzomyia cruzi*, que também é vetor da leishmaniose visceral americana (Santos *et al*, 1998; Brazil & Hamilton, 2002). As fêmeas de *L. cruzi* são indistinguíveis das de *L. longipalpis*, e os machos são separados por características das cerdas da genitália.

A hipótese de um complexo longipalpis no Brasil começou com Mangabeira (1969) que relatou diferenças morfológicas entre os machos das populações de *L. longipalpis* provenientes do Pará e do Ceará. Ele observou que os machos desta espécie podiam ter um ou dois pares de pintas no 4º tergito ou no 3º e 4º tergitos, respectivamente. O fenótipo de um par de pintas é encontrado desde o México até o sul do Brasil enquanto o de dois pares de pintas encontra-se principalmente no nordeste brasileiro (Fig. 1.5).

Além dos morfotipos de pintas abdominais encontrados por Mangabeira (1969), foram encontrados posteriormente, por Ward e colaboradores (1983; 1988), indivíduos com fenótipo intermediário de uma pinta e meia (isto é, com a pinta do 3º tergito de tamanho menor que a do quarto) em algumas populações naturais. Neste mesmo trabalho foram realizados também experimentos de cruzamento entre populações de indivíduos com o mesmo fenótipo e com fenótipos diferentes. Os resultados mostraram que as pintas não podiam ser utilizadas como caráter taxonômico. Por exemplo, em alguns cruzamentos entre populações de uma pinta com populações de duas pintas, a maior parte da prole apresentava o fenótipo intermediário e os híbridos eram férteis e viáveis. Contudo em alguns cruzamentos entre populações com o mesmo fenótipo, eles encontraram isolamento reprodutivo causado por taxa de inseminação muito baixa. As pintas, no entanto, podem servir de marcador morfológico para separar espécies simpátricas do complexo *longipalpis* em algumas localidades. Por exemplo, foi visto isolamento reprodutivo entre duas populações simpátricas em Sobral (CE). Nessa localidade foi constatado que a população cujos machos possuíam um par de pintas abdominais estavam isolados reprodutivamente da população cujos machos tinham dois pares de pintas (Ward *et al*, 1983; 1988).

Os resultados destes experimentos com cruzamentos mostraram que o isolamento reprodutivo não estava relacionado ao fenótipo de pintas e sim ao tipo de feromônio produzido pela população. Esse feromônio sexual é produzido por glândulas presentes nas pintas dos machos (Lane *et al*, 1985; Ward *et al*, 1988). Até o momento foram identificados quatro tipos diferentes de feromônios. São eles: (S)-9-metilgermacreno-B (9MGB), encontrado, por exemplo, na população da gruta da Lapinha (MG); 3-metil- $\alpha$ -himacaleno (3M $\alpha$ H) encontrado na população de Jacobina (BA); cembreno-1 encontrado, por exemplo, nos machos de Sobral (CE) com 2 pares de pintas abdominais e o cembreno-2 encontrado em indivíduos com 1 par de pintas na população de Jaíba (MG) (Ward *et al*, 1988; Hamilton *et al*, 1996a; 1996b; 2004; 2005). Além disso, Os machos de *L. cruzi*, provável membro do complexo *longipalpis*, também apresentam pintas abdominais com glândulas de feromônio (Spiegel *et al*, 1998). Esses machos produzem o feromônio sexual (S)-9-metilgermacreno-B (9MGB), o mesmo encontrado na população de *L. longipalpis* da gruta da Lapinha (Brazil & Hamilton, 2002).

**Figura 1.5:** Machos de *Lutzomyia longipalpis* com uma (A) e duas pintas abdominais (B) (retirado de Ward *et al*, 1983).



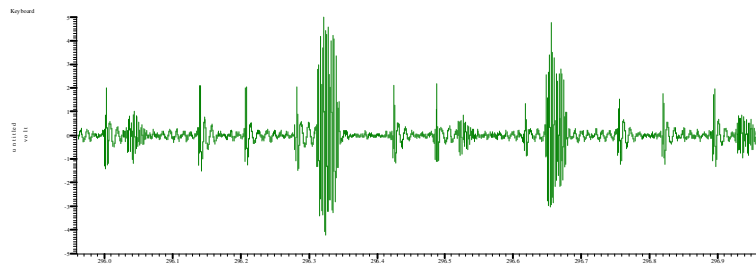
Análises moleculares do gene *period* de *L. longipalpis* também encontrou diferenças significativas entre diferentes regiões brasileiras, inclusive entre as populações simpátricas de Sobral (Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Araki 2005; Araki & Peixoto, dados não publicados) sustentando a hipótese do complexo. Dados semelhantes a esses foram encontrados com microsátélites e com outros genes que afetam o comportamento sexual de *Drosophila* (Maingon *et al*, 2003; Bottecchia *et al*, 2004; Watts *et al*, 2005; Lins, 2006; Lins & Peixoto, dados não publicados).

Apesar dessas evidências que mostram grandes diferenças entre as populações brasileiras de *L. longipalpis*, análises utilizando como marcadores isoenzimas, genes mitocondriais e RAPDs não encontraram diferenças suficientes, segundo seus autores, para indicar a existência de espécies crípticas no Brasil (Mukhopadhyay *et al*, 1998a; Mutebi *et al*, 1999; Azevedo *et al*, 2000; Arrivillaga *et al*, 2002; 2003; Hodgkinson *et al*, 2003; Balbino *et al*, 2006; contudo veja Soto *et al*, 2001). Entretanto, a baixa diferenciação encontrada nesses trabalhos pode simplesmente refletir um processo de especiação recente ou ainda ser resultado de introgressão, pois o isolamento reprodutivo não é completo (Ward *et al*, 1988). Além disso, numa análise detalhada destes trabalhos verificamos que os autores sugerem a existência de uma estruturação nas populações brasileiras que se assemelha às espécies sugeridas em trabalhos favoráveis à existência do complexo *longipalpis* no Brasil (Ward *et al*, 1988; Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Bottecchia *et al*, 2004; Hamilton

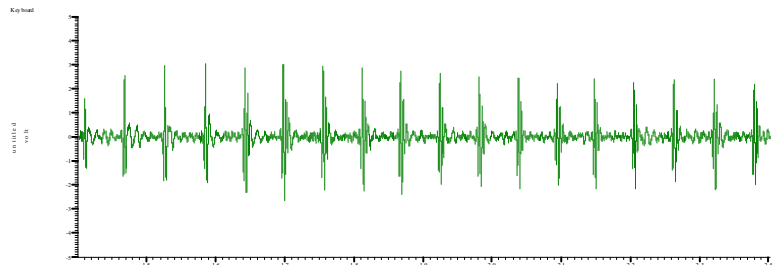
*et al*, 2005; Watts *et al*, 2005; Araki 2005; Araki & Peixoto, dados não publicados; Lins 2006; Lins & Peixoto, dados não publicados;).

Contudo, embora hoje as evidências da existência de um complexo *longipalpis* no Brasil sejam muito grandes, ainda não sabemos por quantas espécies crípticas ele é constituído. Assim como *Drosophila*, *L. longipalpis* também produz sinais acústicos durante a corte (Ward *et al*, 1988) e já foi visto a existência de diferentes padrões de som de cópula produzidos por machos de diferentes populações (Souza *et al*, 2002) (Fig. 1.6). Como mencionado acima, o som de corte dos machos de *Drosophila* está implicado no isolamento reprodutivo e é um bom marcador para diferenciar espécies próximas. Sendo assim, uma análise mais detalhada do som de cópula *L. longipalpis* pode trazer informações valiosas a respeito do complexo.

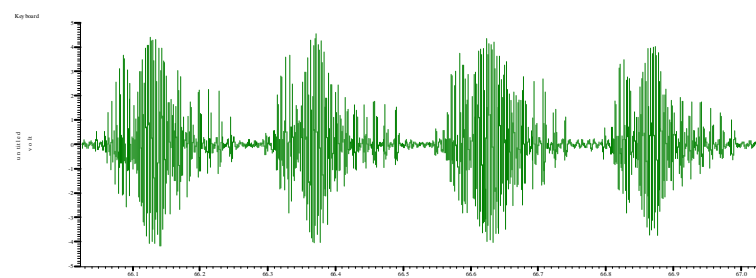
**Lapinha**



**Jacobina**



**Natal**



**Figura 1.6:** Som de cópula de três diferentes populações de *L. longipalpis* (retirado de Souza *et al*, 2002).



## **2. Objetivos:**

### **Objetivo Geral:**

Estudar os sinais acústicos de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* e contribuir para a elucidação do número de espécies que compõe o complexo longipalpis no Brasil.

### **Objetivos Específicos:**

- Analisar detalhadamente o som de cópula produzido por machos de diferentes populações brasileiras de *L. longipalpis*.
- Analisar o som de cópula de machos de *L. cruzi* e compara-lo com o som de *L. longipalpis*.
- Verificar o efeito da colonização no som produzido pelos machos de *L. longipalpis*.

### **3. Material e Métodos:**

#### **3.1 Insetos**

Os flebotomíneos utilizados neste estudo foram obtidos de colônias recentes ou da F1 de fêmeas coletadas de diversas localidades. Os indivíduos de *L. longipalpis* são provenientes das localidades de: Jacobina, Bahia; gruta da Lapinha, Jaíba e Nova Porterinha, Minas Gerais; Natal, Rio Grande do Norte; Salvaterra, ilha de Marajó, Pará; Pancas, Espírito Santo; Estrela de Alagoas, Alagoas; Mesquita, Rio de Janeiro, Teresina, Piauí; e Sobral, no Ceará (Fig. 3.1). Os machos das localidades de Estrela, Jaíba e Sobral foram separados em dois grupos de acordo com o fenótipo de pintas abdominais em: uma pinta (1P) e duas pintas (2P). Essa separação foi feita, pois nestas localidades parece que as pintas estão, por acaso, servindo como marcador de duas espécies diferentes (Ward *et al*, 1988; Hamilton *et al*, 2004, 2005; Souza *et al*, 2004; Araki & Peixoto, dados não publicados). Em Teresina machos com duas pintas e fenótipos intermediários também são encontrados, no entanto, apenas indivíduos de 1 pinta, que constituem a grande maioria, foram gravados. Em Natal, a maioria dos machos possui a forma intermediária e não houve separação entre os diferentes fenótipos durante as gravações. Sabe-se que nesta localidade o polimorfismo de manchas não tem associação com a ocorrência de espécies simpátricas (Mukhopadhyay *et al*, 1998b). Em Jacobina, Nova Porterinha e Mesquita os machos possuem duas pintas, enquanto em Lapinha, Marajó e Pancas os machos possuem uma pinta,

Além de diversas populações de *L. longipalpis* foi analisado ainda o som de indivíduos de *L. cruzi*, provável integrante do complexo longipalpis, provenientes de Corumbá, Mato Grosso do Sul. A maioria dos insetos utilizados nesta parte do trabalho foram cedidos pela Dra Nataly Araújo de Souza do Departamento de Entomologia, e pelo Dr Reginaldo Peçanha Brazil do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos do Instituto Oswaldo Cruz.

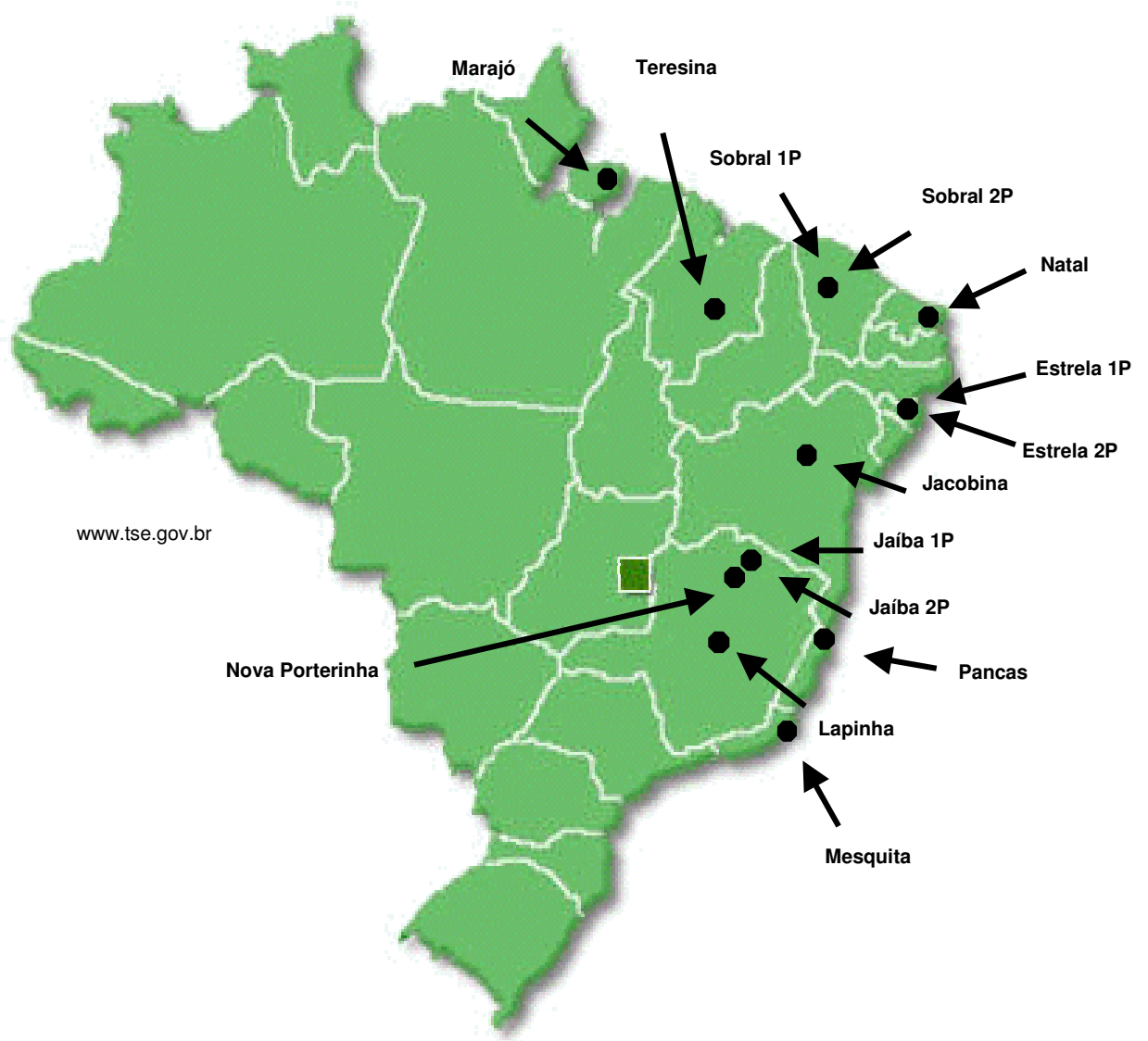
Foi feita também uma análise de gravações de *L. longipalpis* de colônias antigas, mantidas há muitos anos pelo Professor Richard Ward (Universidade de Keele, Reino Unido) que foram iniciadas com indivíduos das populações de Jacobina e de Marajó. Estas colônias tinham cerca de 15 e quatro anos, respectivamente, quando as gravações foram realizadas.

## 3.2 Gravação do som

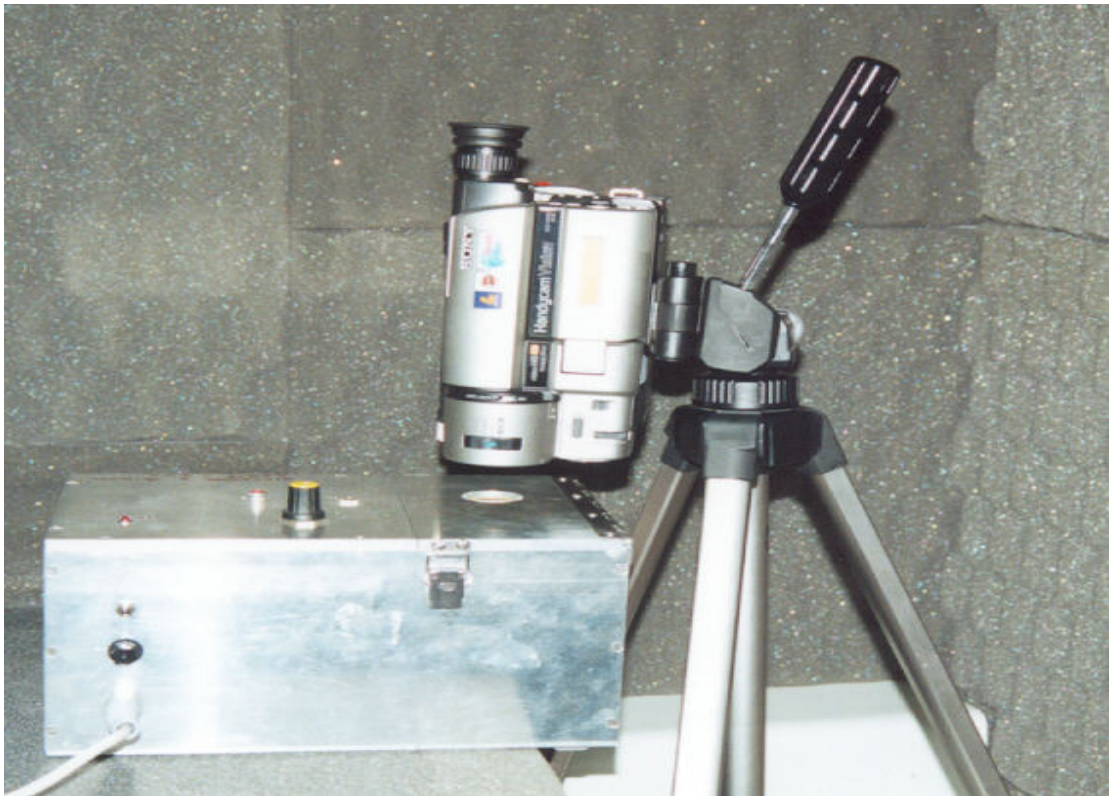
A gravação do som foi realizada de acordo com os métodos desenvolvidos para *Drosophila* (e.g. Peixoto & Hall, 1998). Esse método consiste em colocar um macho e uma fêmea virgens, geralmente por cerca de cinco minutos, no Insectavox (Gorczyca & Hall, 1987), que é um microfone especial desenvolvido para a gravação do som de *Drosophila* (Fig. 3.2). Este consiste de uma caixa de metal, onde se encontra o microfone propriamente dito. Em cima deste microfone é colocada uma pequena caixa de acrílico, com fundo de filó, contendo um casal de flebotomíneos (Fig. 3.3). Nas gravações foi utilizada também uma câmera de vídeo Sony Hi8 CCD-TRV65, além de um vídeo-cassete Sony SLV-77HFBR, para que fosse possível, posteriormente, associar o som emitido com o comportamento dos insetos. Os sons de parte dos indivíduos da população de Jaíba foram gravados em DVD utilizando o gravador de DVD Panasonic DMR-ES10. As gravações de flebotomíneos de colônias antigas mantidas pelo Prof Ward foram realizadas pelo Dr Alexandre A. Peixoto no Reino Unido em 2000. As demais gravações foram feitas a partir de 1999 e cerca de metade delas também foram realizadas pelo Dr Peixoto com a ajuda da Dra. Nataly de Souza.

Esses estudos foram realizados com indivíduos adultos, de poucas gerações no laboratório (em geral F1 e F2) com idades entre dois e oito dias após a emergência alimentados com solução de sacarose saturada, com temperatura controlada,  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizados insetos também coletados diretamente no campo. O som gravado em VHS foi, então, digitalizado a uma taxa amostral de 20 kHz com o uso do CED 1401 e o programa Spike2, versão 4.08 ambos da Cambridge Electronic Design. Todas as gravações foram analisadas com o programa Spike2 e os seguintes parâmetros do som foram estudados: (1) intervalo entre pulsos (IPI) ou intervalo entre “bursts” (IBI) dependendo do tipo de padrão do som (ver adiante) (Fig. 3.4). O IPI foi calculado pela média do tamanho do trem, que é o tempo em que o som é produzido, dividido pelo número de pulsos menos um. Já o IBI foi calculado a partir do tempo entre metade do primeiro “burst” até a metade do último “burst” dividido pelo número de “bursts” menos um. (2) tamanho do trem (segmento de som contendo uma seqüência de pulsos ou “bursts”), medido a partir do início do primeiro pulso ou “burst” até o final do último pulso ou “burst” (Fig. 3.5). (3) número de pulsos ou “bursts” produzidos pelo macho em cada trem (Fig. 3.4). (4) freqüência do trem medida por FFT (“Fast Fourier transform”). (5) ciclos por pulso (apenas nas populações com som do tipo pulsado, ver adiante). Esse parâmetro foi medido

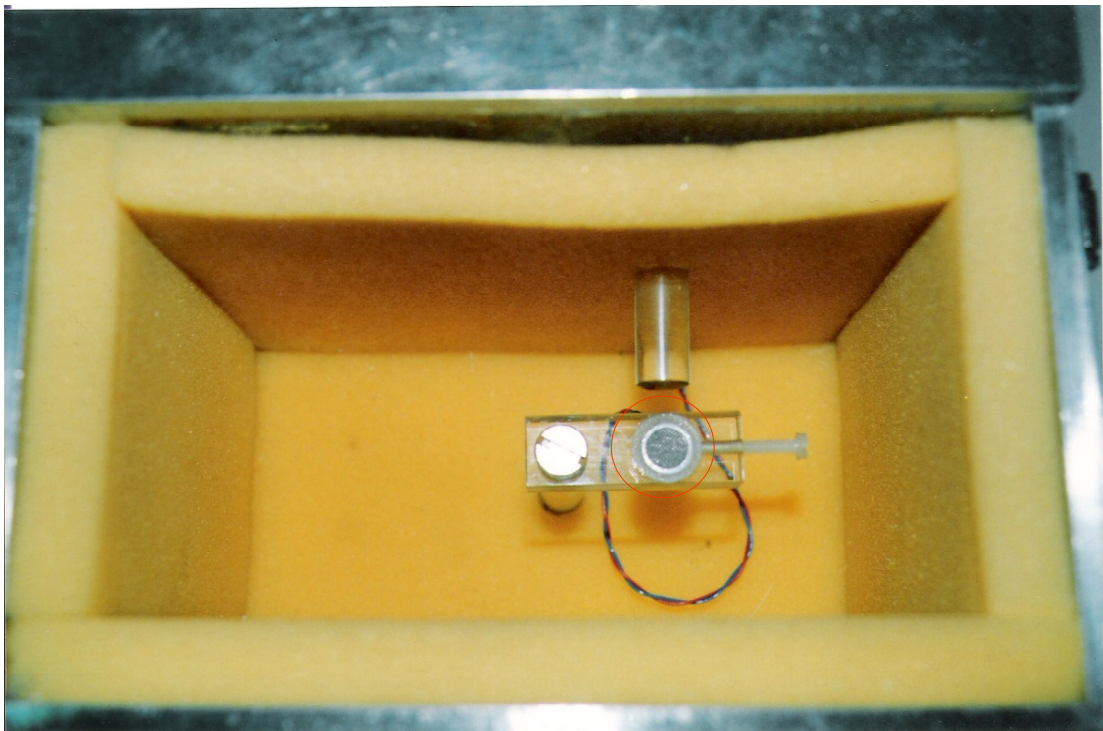
calculando o número total de ciclos no trem dividido pelo número de pulsos. Nas populações de Sobral 1P, Teresina e Jaíba 1P foi feita também uma medição da proporção de pulsos que estão intercalados por dois pulsos de amplitude maior (ou menor), ou seja, um pulso de alta amplitude onde os pulsos anterior e posterior possuem amplitude mais baixa e vice-versa (ver resultados). Alguns indivíduos produziram mais de um trem, nestes casos, foi feita a média dos parâmetros dos diferentes trens para que fosse feita a comparação entre indivíduos e entre populações. Foram feitas análises de variância e realizado testes *Post-Hoc* LSD com os dados obtidos.



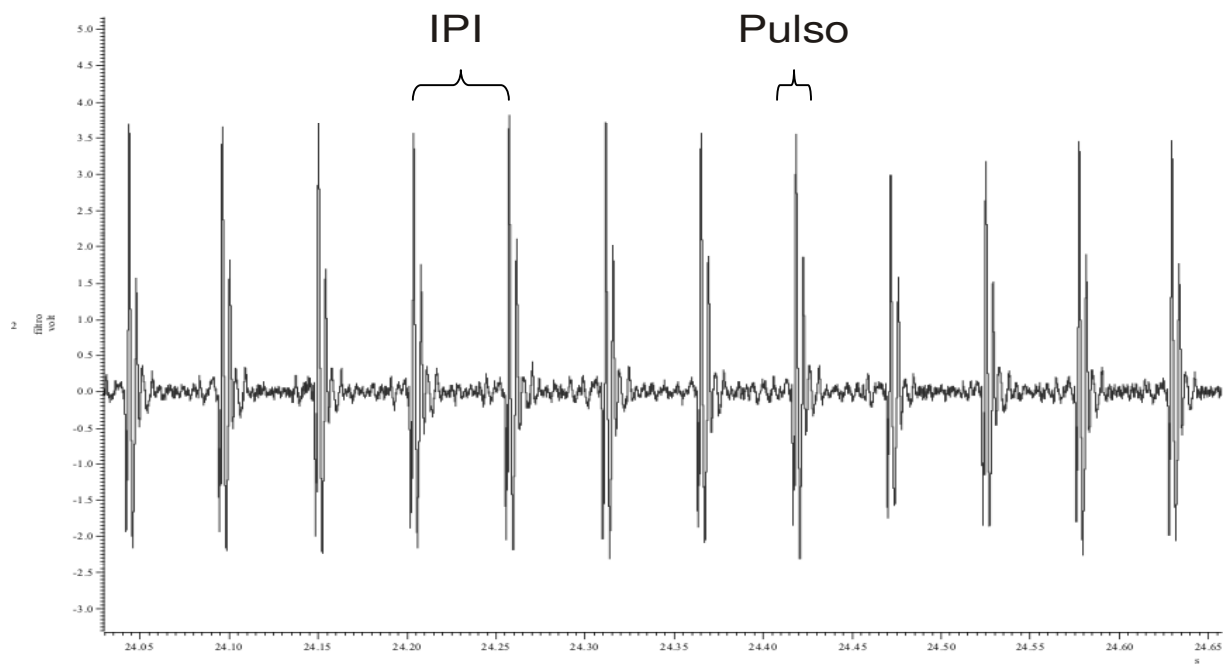
**Figura 3.1:** Mapa do Brasil indicando as diferentes populações de *L. longipalpis* estudadas.



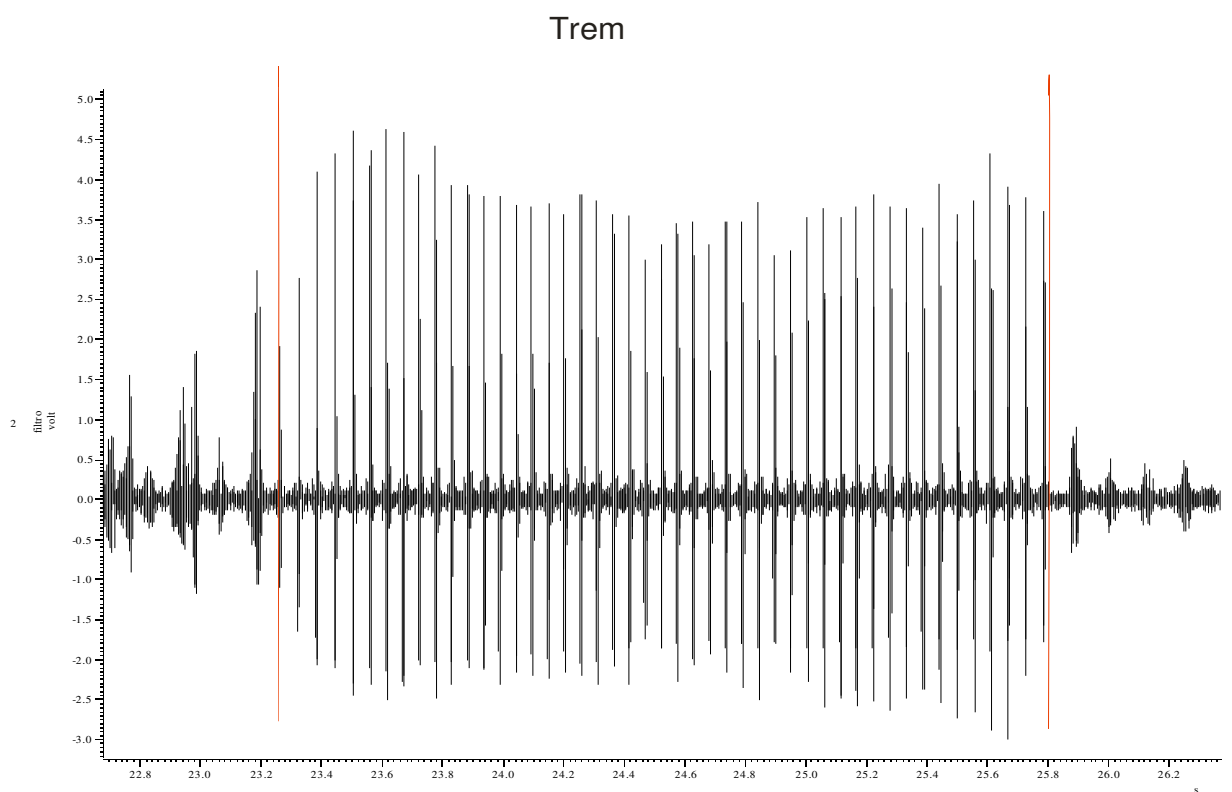
**Figura 3.2:** Insectavox (caixa de metal) e a câmera de vídeo pronta para a gravação.



**Figura 3.3:** Parte interna do Insectavox. O círculo vermelho evidencia o microfone propriamente dito. Este é o local onde a caixa de acrílico com o casal é colocada.



**Figura 3.4:** Trecho do som de um macho de *L. longipalpis* para exemplificar o intervalo entre pulsos (IPI) e o pulso.



**Figura 3.5:** Trem primário (ver resultados) de um macho da população de Jacobina. As linhas vermelhas sinalizam aproximadamente o início e o final do trem.

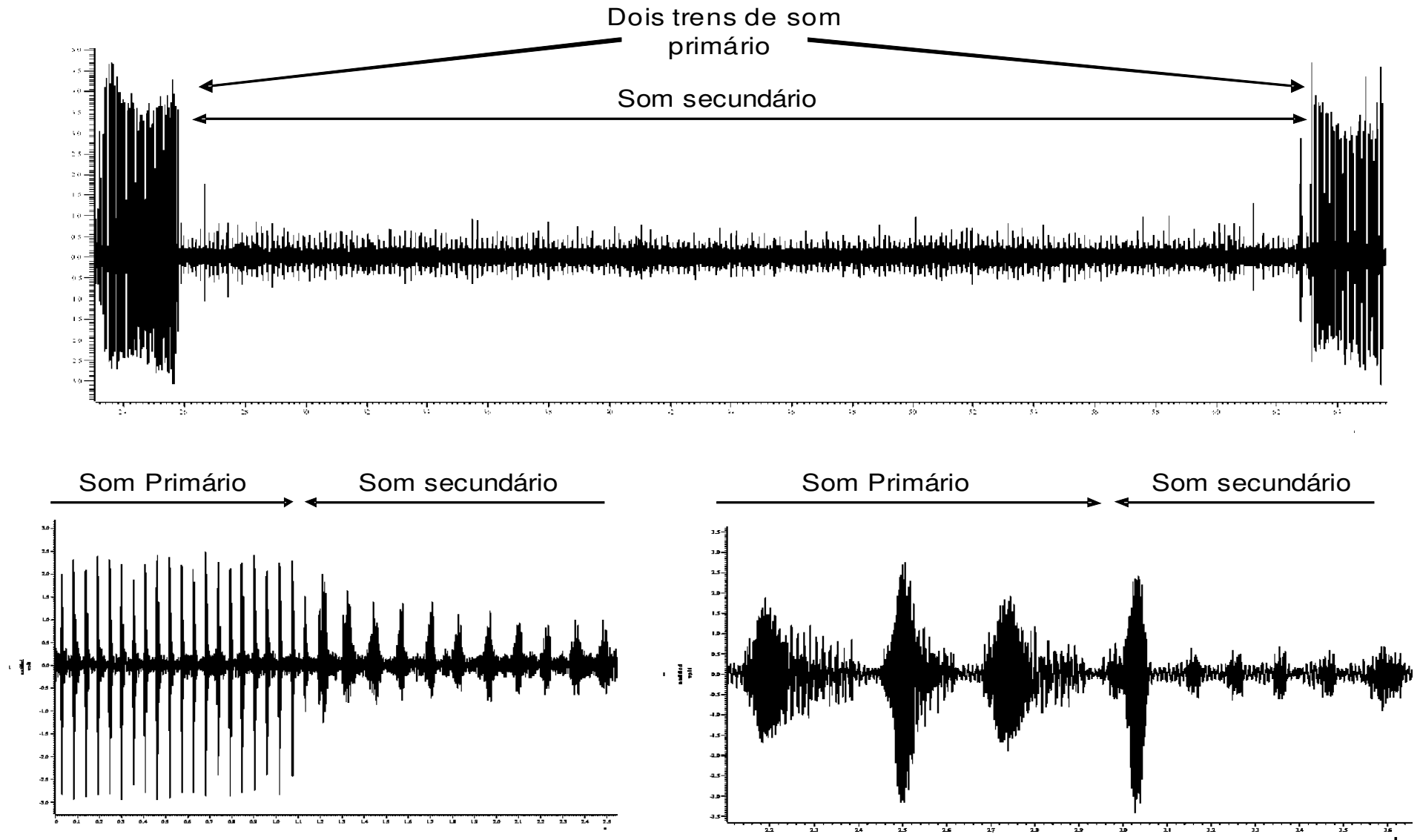
## **4. Resultados:**

O som produzido durante a cópula por machos de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* é composto por um som primário, mais rápido e muito variável entre populações (ver abaixo) e um secundário mais lento, emitido geralmente entre dois trens de som primário, sendo constituído de pulsos de baixa amplitude com grande variação no número de ciclos por pulso, além de ser superficialmente similar em todas as populações (Fig. 4.1).

O som primário de *L. longipalpis*, ao contrário do som secundário, apresenta grande variação entre as populações e pode ser facilmente separado em três tipos: o som do tipo pulsado, o som do tipo “burst” (sinal altamente policíclico sendo modulado em amplitude e frequência), encontrado também em *L. cruzi*, e um tipo misto que começa de forma semelhante ao tipo pulsado e depois fica mais parecido com o tipo “burst” (Fig 4.2). Além dos padrões serem bem diferente nesses três tipos, o modo como cada tipo é produzido também é diferente. Os machos que produzem som pulsado o fazem batendo aparentemente ambas as asas simultaneamente. Já aqueles que fazem som do tipo “burst” batem as asas alternadamente, torcendo o corpo de maneira ondular de um lado para o outro. O tipo misto também é feito de forma mesclada. A parte que parece com o som pulsado é produzida da mesma forma que o som pulsado, e a parte que se assemelha ao tipo “burst” é feita com os machos batendo as asas da mesma forma que aqueles que produzem apenas som do tipo “burst”.

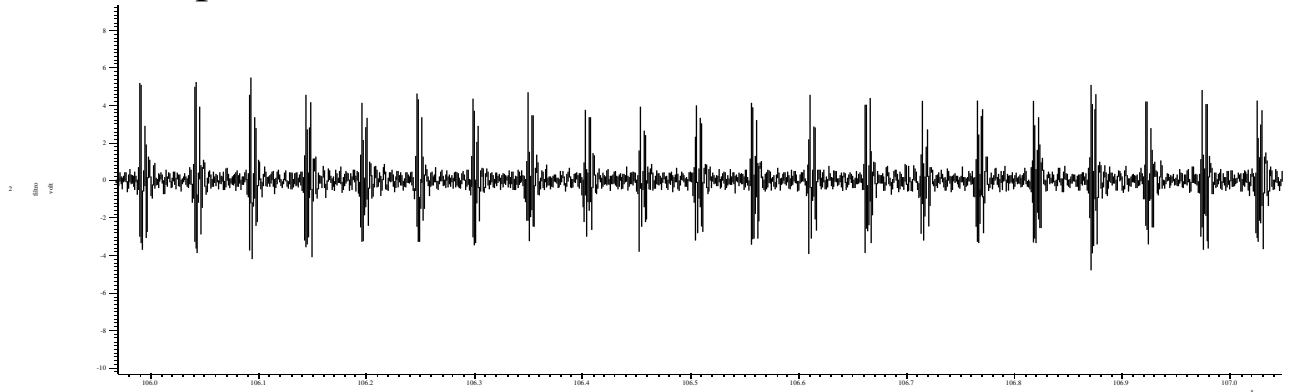
Uma análise estatística preliminar mostrou diferenças altamente significativas ( $p < 0.000001$ ) entre padrões pulsado e de “burst” (Souza *et al*, 2004). Assim as populações foram agrupadas para análise de acordo com o padrão do som produzido pelo seu macho.



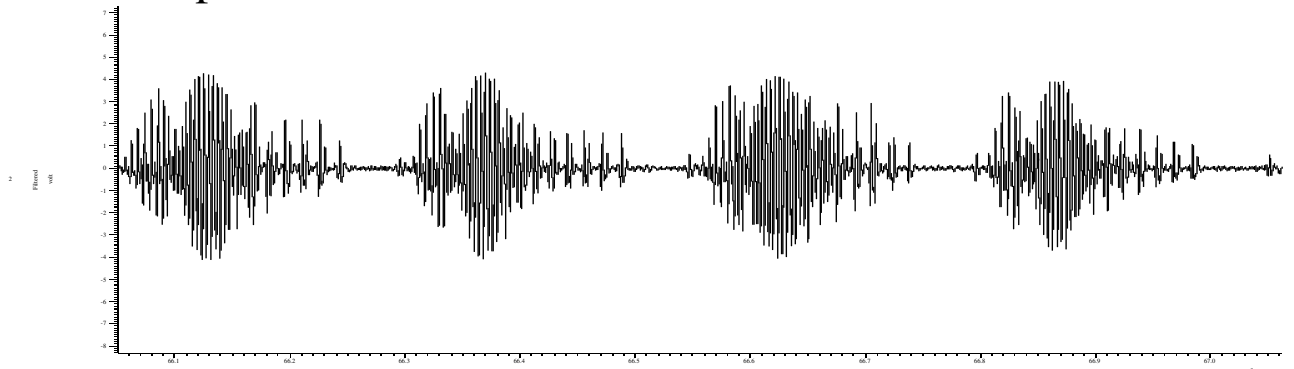


**Figura 4.1:** A. Trecho mostrando o som primário e secundário de *L. longipalpis*. B. um som primário do tipo pulsado seguido do som secundário. C. um som primário do tipo “burst” seguido de um som secundário.

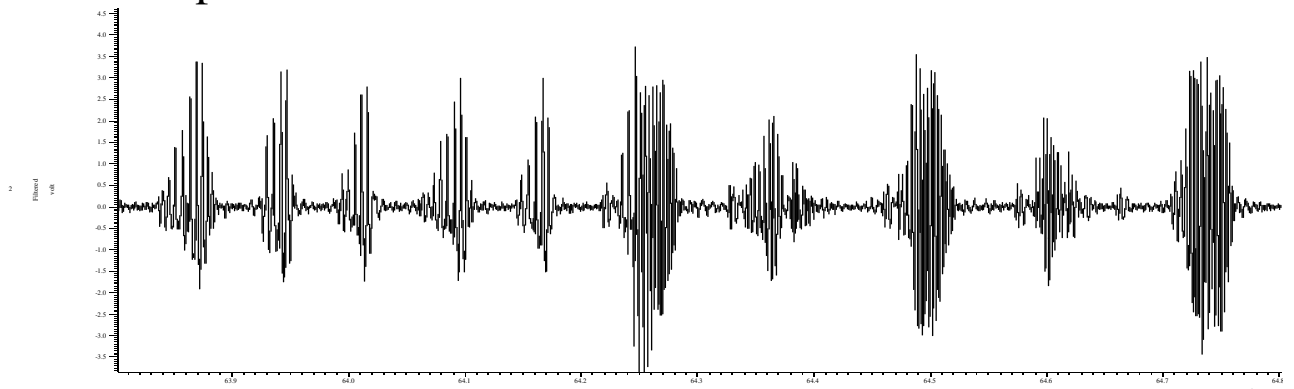
## Som do tipo Pulsado



## Som do tipo "Burst"



## Som do tipo Misto



**Figura 4.2:** Os três tipos diferentes de som primário. Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

## 4.1 Populações naturais

### 4.1.1 Padrão pulsado

Nas populações onde foi encontrado som do tipo pulsado foram analisados os parâmetros: intervalo entre pulsos (IPI), número de pulsos no trem (NP), tamanho do trem (TT), frequência (Freq) e número de ciclos por pulso (CPP). As médias e o erro padrão da média para os parâmetros nessas populações estão apresentados na tabela 4.1.

Este tipo de som foi encontrado nas populações de Jacobina, Lapinha, Sobral 1P, Teresina, Jaíba 1P e Estrela 1P. Dentre essas populações foram observados cinco diferentes padrões de som primário, cada um foi nomeado como Pulsado, e o número correspondente (Pn) (Fig 4.3 A e B).

O padrão P1, encontrado em Jacobina, se caracteriza por apresentar pulsos homogêneos ao longo do trem. Nessa localidade os machos produzem um som com cerca de 45 pulsos por trem, além de uma frequência baixa; em média 231,89 Hz (tabela 4.1).

O P2, produzido pelos machos da Lapinha, é constituído por pulsos essencialmente monocíclicos intercalados por pulsos policíclicos. Esses machos produzem sons longos com o trem de 3,28 segundos, em média. Nessa população, no caráter ciclos por pulso, foi feita uma medição separada dos pulsos policíclicos daqueles pulsos que tinha menos de cinco ciclos. A comparação com as outras populações foi feita utilizando o valor médio dos ciclos essencialmente monocíclicos (ver adiante) (tabela 4.1).

Nas populações de Sobral 1P e Teresina foi encontrado o padrão P3, que apresenta pulsos de alta amplitude alternados com pulsos de baixa amplitude. O som dessas populações apresenta as maiores frequências entre todas que produzem som pulsado, cerca de 300 Hz (tabela 4.1).

O padrão P4 foi encontrado na população de Jaíba 1P e se caracteriza por apresentar oscilação cíclica da amplitude dos pulsos. A variação cíclica deste padrão se dá em todos os pulsos com a amplitude crescendo e diminuindo gradativamente.

Já o padrão P5, observado na população de Estrela 1P, se caracteriza por ter pulsos homogêneos ao longo do trem com alguns pulsos policíclicos no final do trem. Outras características importantes desse padrão são: um intervalo entre pulsos pequeno (35,3 milissegundos) e um trem bem longo (3,57 segundos) (tabela 4.1).

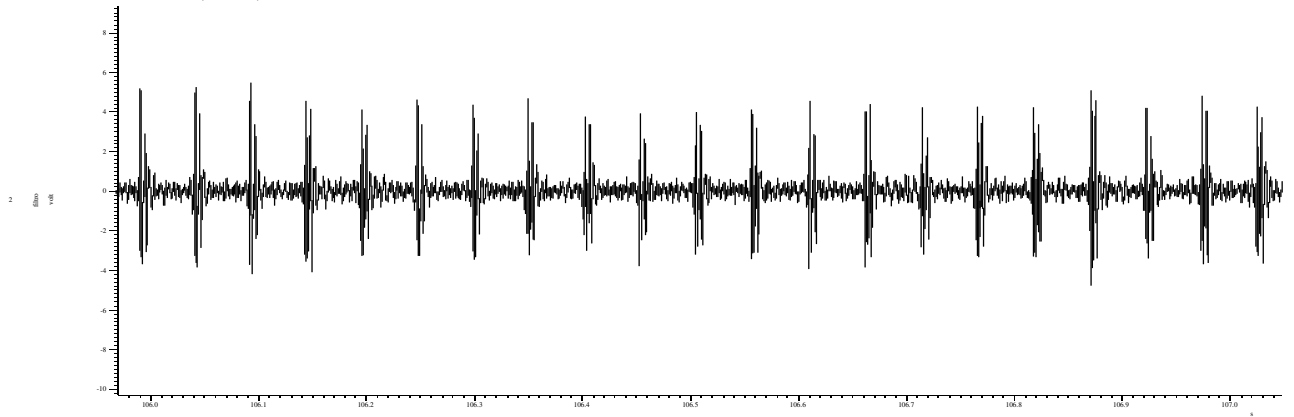
Nessa população, assim como em Lapinha, os pulsos policíclicos foram separados dos outros para a análise de ciclos por pulso.

A análise de variância (ANOVA) realizada com os dados obtidos, comparando as populações que têm som com padrões pulsados, mostrou diferenças significativas para todos os parâmetros (IPI:  $F_{[4,41]} = 20,23$ ,  $p < 0,001$ ; NP:  $F_{[4,41]} = 17,32$ ,  $p < 0,001$ ; TT:  $F_{[4,41]} = 10,63$ ,  $p < 0,001$ ; Freq:  $F_{[4,41]} = 12,07$ ,  $p < 0,001$ ; CPP:  $F_{[4,41]} = 26,87$ ,  $p < 0,001$ ).

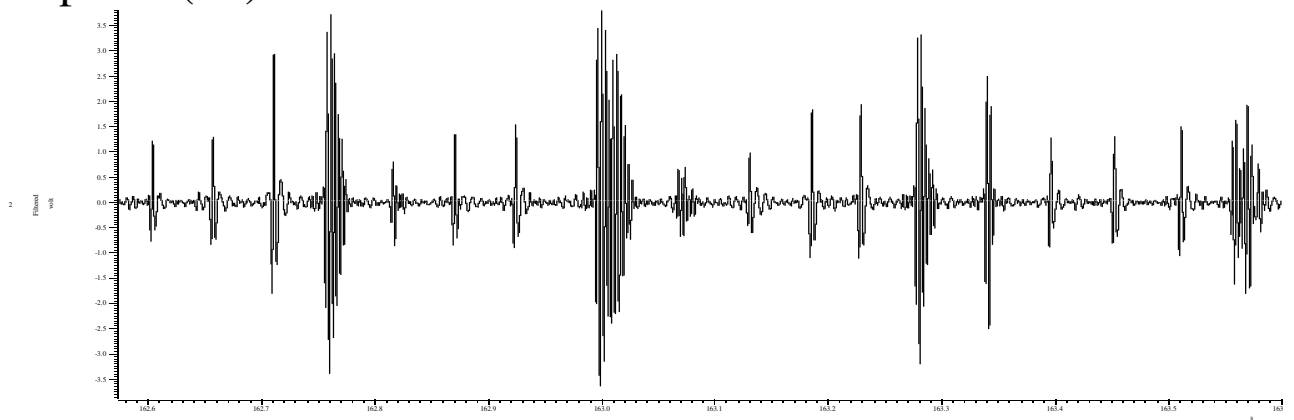
Foi realizado um teste *Post-Hoc* LSD (“Least significant difference”) comparando todas as populações par-a-par (tabelas 4.2, 4.3 e 4.4). Essa análise foi realizada excluindo-se a população de Estrela 1P, porque o som de apenas um indivíduo foi gravado desta população. Os resultados dessa análise mostram que as populações de Sobral 1P, Teresina e Jaíba 1P não apresentam diferenças significativas em nenhum dos parâmetros (tabelas 4.2, 4.3 e 4.4). No entanto, os padrões de Sobral 1P e Teresina são diferentes do padrão de Jaíba 1P. Como o P3 se caracteriza visualmente por apresentar pulsos que se alternam em amplitude, foi calculada para essas três populações a proporção de pulsos que estão intercalados por dois outros pulsos de amplitude diferente, ou seja, pulsos de baixa amplitude onde os pulsos anterior e posterior apresentam amplitude maior ou vice-versa.

O teste LSD realizado para esse parâmetro nessas três populações foi feito após a transformação angular das proporções observadas. Essa análise não mostrou diferença significativa entre os padrões de Sobral 1P e Teresina, que possuem em média mais de 85% dos pulsos apresentando alternância, mas mostrou diferença dessas duas com a população de Jaíba 1P ( $p < 0,00001$  em ambos os casos) que apresenta apenas cerca de 4% dos pulsos com amplitude intercalada (tabela 4.1 e tabela 4.4).

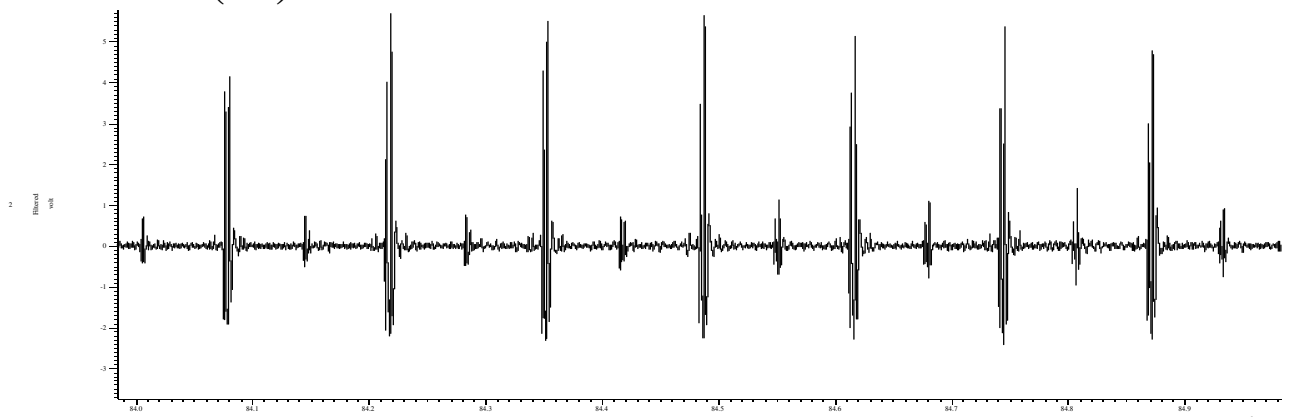
## Jacobina (P1)



## Lapinha (P2)

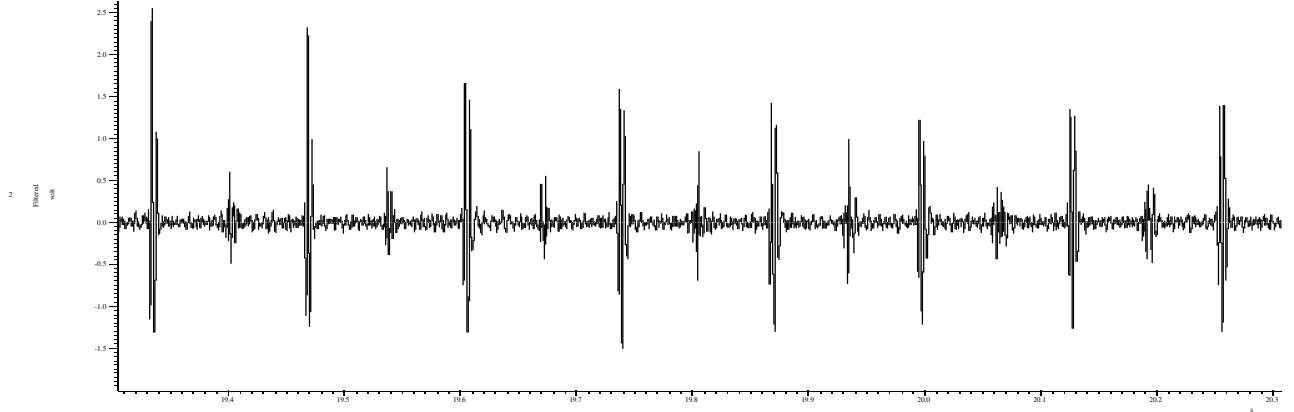


## Sobral 1P (P3)

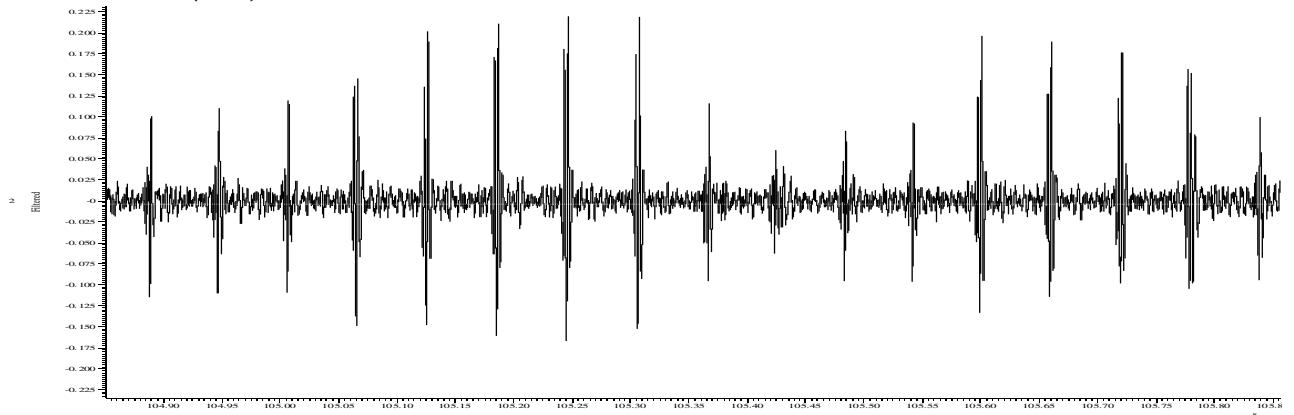


**Figura 4.3A:** Som primário das diferentes populações que apresentam som do tipo pulsado. Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

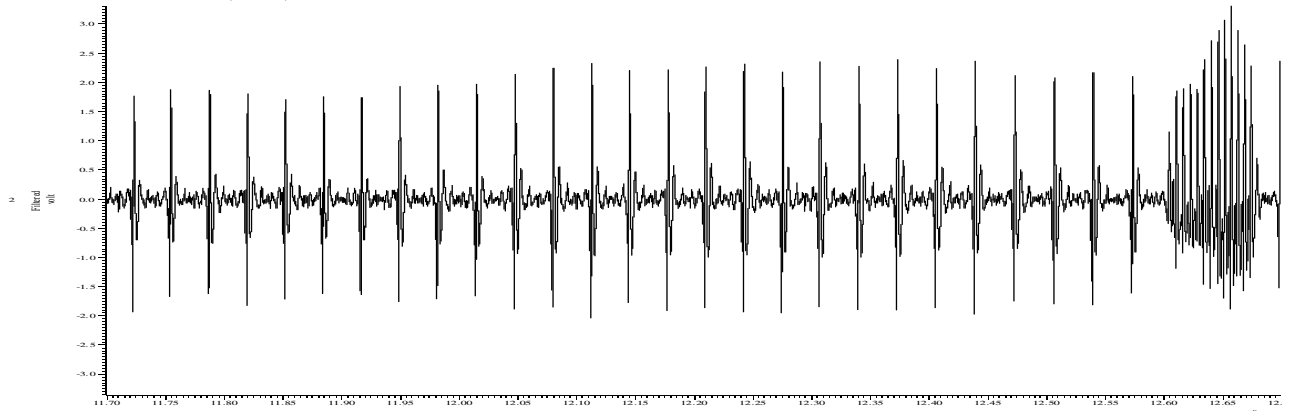
### Teresina (P3)



### Jaíba 1P (P4)



### Estrela 1P (P5)



**Figura 4.3B (continuação):** Som primário das diferentes populações que apresentam som do tipo pulsado. Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

**Tabela 4.1:** Parâmetros do som das populações que apresentam som do tipo pulsado. A tabela mostra a média ( $\pm$ erro padrão da média).

	<b>N</b>	<b>IPI (ms)</b>	<b>NP</b>	<b>TT (s)</b>	<b>Freq (Hz)</b>	<b>CPP</b>
<b><u>Jacobina</u></b>	11	51,96 $\pm$ 1,61	44,86 $\pm$ 3,02	2,30 $\pm$ 0,20	231,89 $\pm$ 11,01	2,6118 $\pm$ 0,20
<b><u>Lapinha</u></b>	15	57,59 $\pm$ 1,27	58,09 $\pm$ 2,81	3,28 $\pm$ 0,16	284,08 $\pm$ 6,92	1,44 $\pm$ 0,09* (6,21 $\pm$ 0,32**)
<b><u>Sobral 1P</u></b>	11	67,01 $\pm$ 0,93 (0,89 $\pm$ 0,03***)	32,27 $\pm$ 1,04	2,10 $\pm$ 0,08	306,52 $\pm$ 5,78	3,1296 $\pm$ 0,12
<b><u>Teresina</u></b>	7	65,50 $\pm$ 0,74 (0,86 $\pm$ 0,04***)	32,81 $\pm$ 2,75	2,08 $\pm$ 0,18	298,67 $\pm$ 9,08	3,1109 $\pm$ 0,15
<b><u>Jaíba 1P</u></b>	2	67,11 $\pm$ 6,77 (0,04 $\pm$ 0,04***)	31,50 $\pm$ 11,50	1,97 $\pm$ 0,57	292,97 $\pm$ 10,85	2,5850 $\pm$ 0,47
<b><u>Estrela 1P</u></b>	1	35,30	102,00	3,57	175,78	2,00* (8,14**)

\* Valores excluindo aos pulsos muito policíclicos.

\*\* Valores referentes aos pulsos policíclicos.

\*\*\* Valores referentes à proporção de pulsos com amplitude alternada.

N – número de indivíduos

IPI – intervalo entre pulsos

NP – número de pulsos por trem

TT – tamanho do trem

FREQ – frequência

CPP – ciclos por pulso

**Tabela 4.2:** Análise *Post-Hoc* LSD com o teste LSD comparado as populações com som pulsado. A metade superior da tabela mostra os valores de probabilidade para o IPI e a parte inferior é referente ao número de pulsos.

NP \ IPI	Jacobina	Lapinha	Sobral 1P	Teresina	Jaíba 1P
Jacobina	*****	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Lapinha	<b>0,001</b>	*****	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,008</b>
Sobral 1P	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>	*****	0,493	0,977
Teresina	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,903	*****	0,797
Jaíba 1P	0,062	<b>&lt;0,001</b>	0,912	0,858	*****

**Em negrito estão assinalados os valores significativos ao nível de 5%.**

IPI – intervalo entre pulsos

NP – número de pulsos por trem



**Tabela 4.3:** Análise *Post-Hoc* LSD com o teste LSD comparado as populações com som pulsado. A metade superior da tabela mostra os valores de probabilidade para o tamanho do trem e a parte inferior é referente à frequência.

TT Freq	Jacobina	Lapinha	Sobral 1P	Teresina	Jaíba 1P
Jacobina	*****	<b>&lt;0,001</b>	0,402	0,432	0,446
Lapinha	<b>&lt;0,001</b>	*****	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,003</b>
Sobral 1P	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,045</b>	*****	0,963	0,766
Teresina	<b>&lt;0,001</b>	0,251	0,556	*****	0,658
Jaíba 1P	<b>0,006</b>	0,669	0,523	0,796	*****

**Em negrito estão assinalados os valores significativos ao nível de 5%.**

TT – tamanho do trem

FREQ – frequência

**Tabela 4.4:** Análise *Post-Hoc* LSD com o teste LSD comparado as populações com som pulsado. A metade superior da tabela mostra os valores de probabilidade para o número de ciclos por pulso e a parte inferior é referente proporção de pulsos que alternam a amplitude.

CCP Amp	Jacobina	Lapinha	Sobral 1P	Teresina	Jaíba 1P
Jacobina	*****	<0,001	<b>0,014</b>	<b>0,034</b>	0,941
Lapinha	-	*****	<0,001	<0,001	<b>0,002</b>
Sobral 1P	-	-	*****	0,935	0,139
Teresina	-	-	0,552	*****	0,171
Jaíba 1P	-	-	<0,001	<0,001	*****

**Em negrito estão assinalados os valores significativos ao nível de 5%.**

CPP – ciclos por pulso

Amp – Proporção de pulsos com amplitude alternada

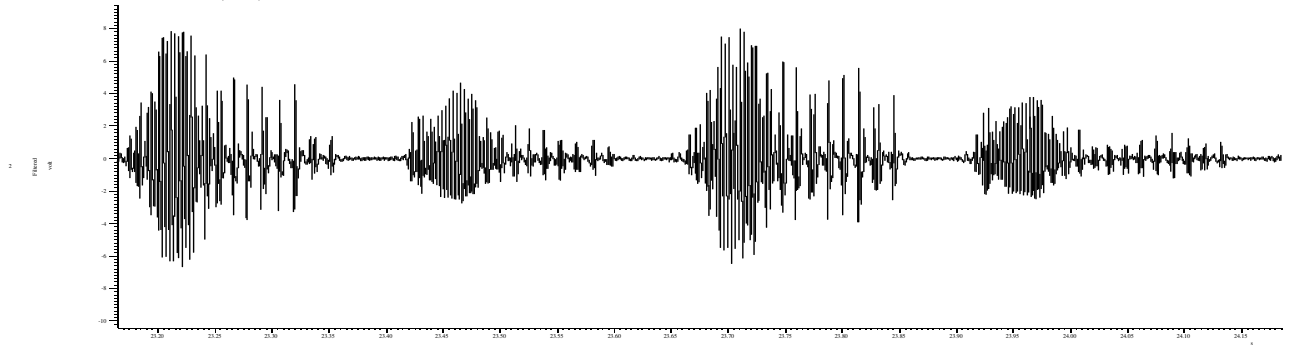
#### 4.1.2 Padrão “burst”

O outro tipo de som de cópula encontrado em machos de *L. longipalpis*, o tipo “burst”, foi observado nas populações de Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porteira (Fig. 4.4 A e B). Este tipo de som também foi encontrado em machos de *L. cruzi* (Fig. 4.5) e sendo assim esta espécie foi comparada diretamente com as mencionadas acima. Todas essas populações apresentam padrões semelhantes e tiveram os seguintes parâmetros analisados: intervalo entre “bursts” (IBI), número de “bursts” no trem (NB), tamanho do trem (TT) e frequência (Freq) (Tabela 4.5).

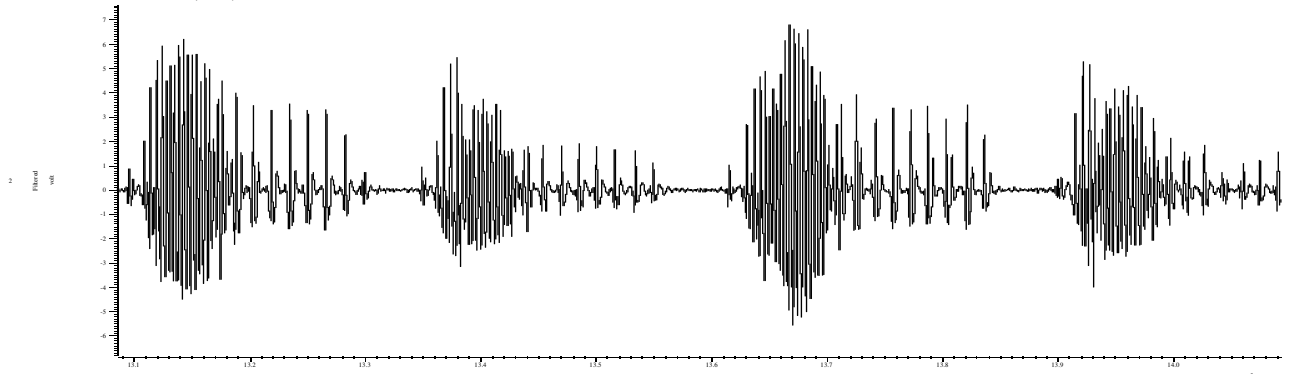
Foram realizadas análises de variância comparando os dados obtidos para as populações de *L. longipalpis* e *L. cruzi*. Primeiramente, foram comparadas todas as populações de *L. longipalpis* com o padrão de “burst”. Em seguida foi realizado um teste com essas populações incluindo-se na análise os machos de *L. cruzi*. Essa análise mostrou diferenças significativas no IBI, incluindo ou não os machos de *L. cruzi* (tabela 4.6). Houve também uma diferença significativa ao nível de 5% ( $p=0,045$ ) na frequência na comparação que incluiu *L. cruzi*.

Assim como na análise do padrão pulsado, foi realizado também um teste *Post-Hoc* LSD comparando-se as populações com som de “burst” par-a-par (tabelas 4.7 e 4.8). Esse teste revelou as populações de Jaíba 2P e de *L. cruzi* como os extremos, maiores e menores, para o parâmetro IBI. Essas populações apresentaram diferenças significativas em relação à quase todas as outras populações, exceto na comparação de *L. cruzi* com Marajó e com Pancas. Nesta mesma análise, no parâmetro frequência, as populações com maior diferença em relação às outras foram as de Natal e, novamente, de *L. cruzi*.

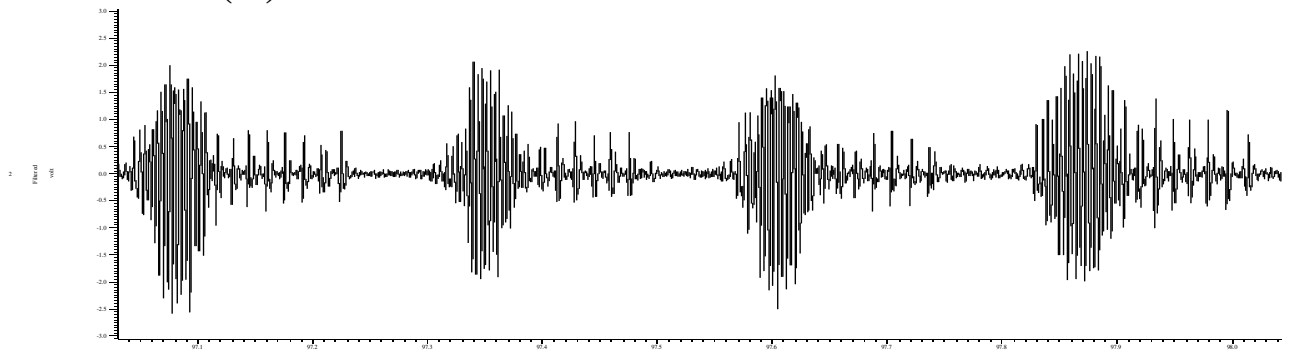
Sobral 2P (B)



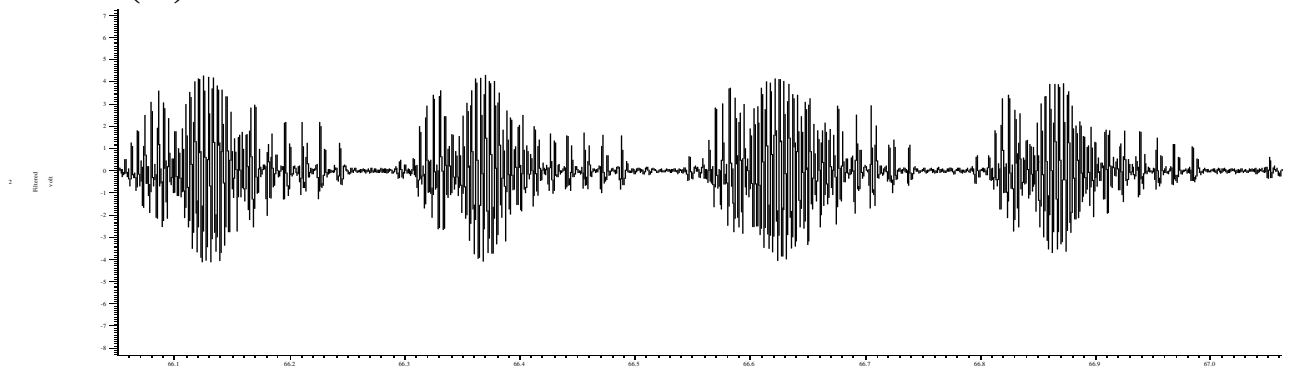
Jaíba 2P (B)



Estrela 2P (B)

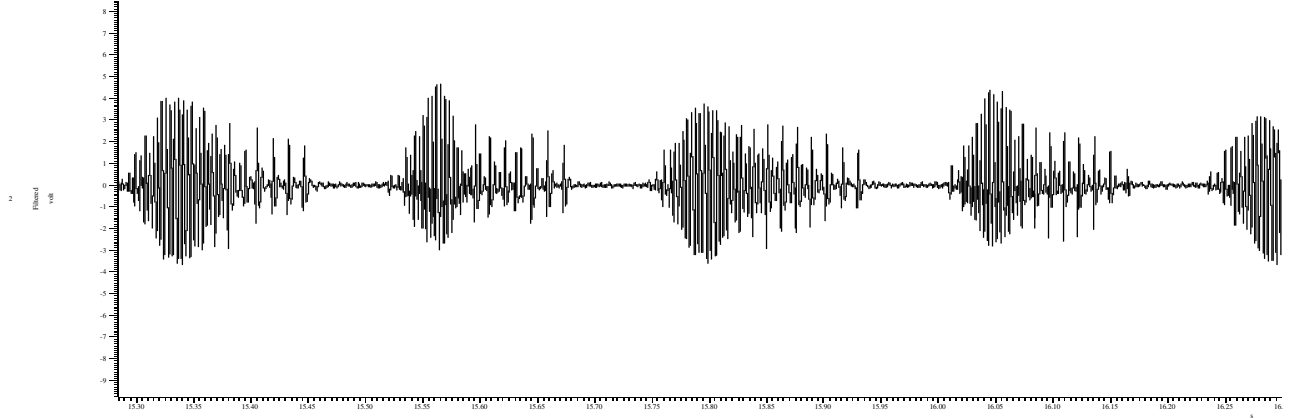


Natal (B)

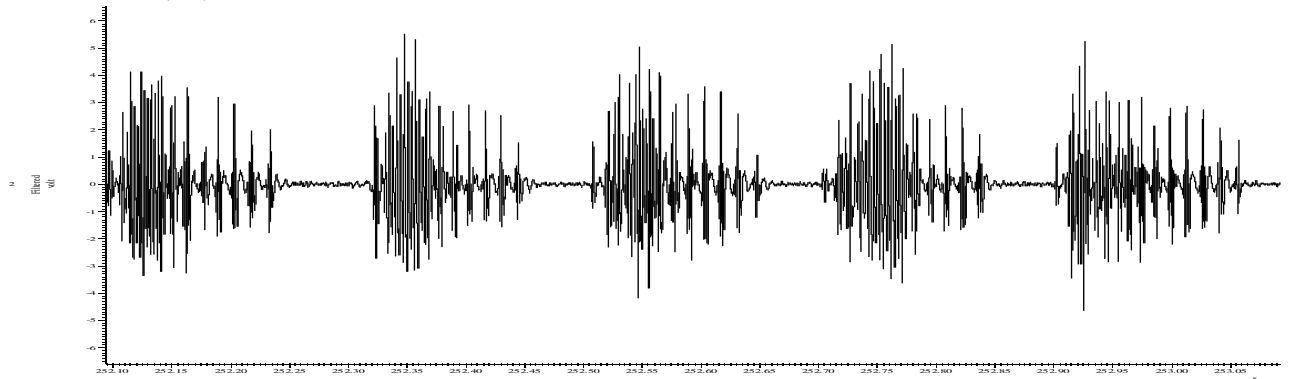


**Figura 4.4A:** Som primário das diferentes populações de *L. longipalpis* que apresentam som do tipo “burst”. Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

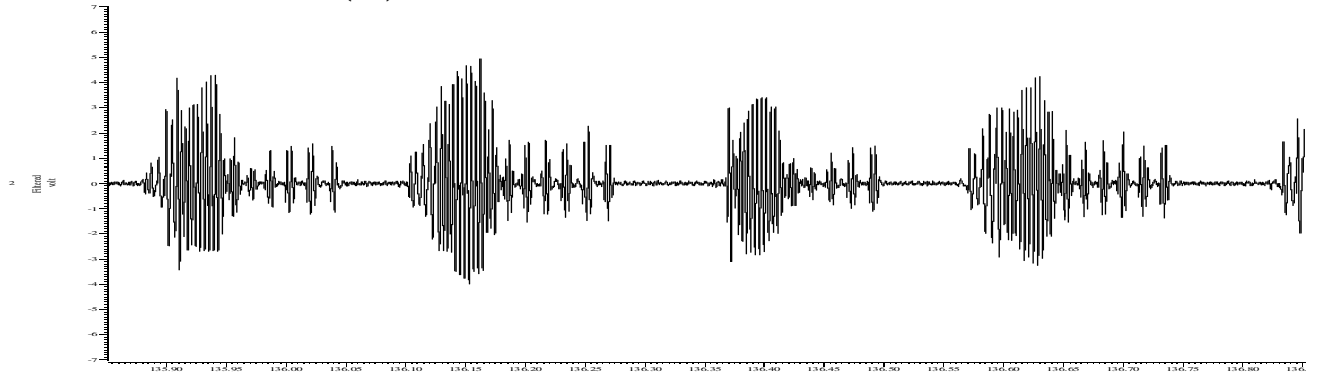
## Marajó (B)



## Pancas (B)

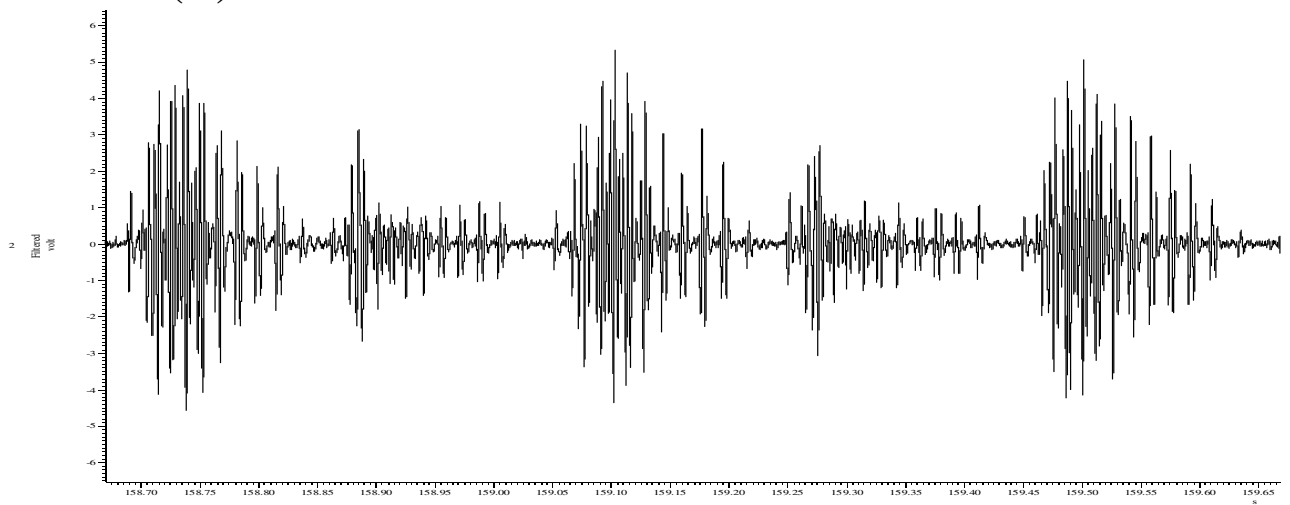


## Nova Porteira (B)



**Figura 4.4B (continuação):** Som primário das diferentes populações de *L. longipalpis* que apresentam som do tipo “burst”. Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

*L. cruzi* (B)



**Figura 4.5:** Som primário de *L. cruzi*. Esta espécie apresenta um som com padrão de “burst”. | Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

**Tabela 4.5:** Parâmetros do som das populações que apresentam som do tipo “burst”. A tabela mostra a média ( $\pm$ erro padrão da média).

	<b>N</b>	<b>IBI (ms)</b>	<b>NB</b>	<b>TT (s)</b>	<b>Freq (HZ)</b>
<b><u>Sobral2P</u></b>	8	226,23 $\pm$ 8,38	13,69 $\pm$ 1,10	3,01 $\pm$ 0,28	285,89 $\pm$ 4,01
<b><u>Jaíba 2P</u></b>	8	279,12 $\pm$ 14,36	10,78 $\pm$ 1,07	2,89 $\pm$ 0,34	272,11 $\pm$ 11,60
<b><u>Estrela 2P</u></b>	7	238,55 $\pm$ 14,75	13,62 $\pm$ 0,95	3,14 $\pm$ 0,24	267,28 $\pm$ 5,37
<b><u>Natal</u></b>	9	229,86 $\pm$ 8,22	11,15 $\pm$ 1,04	2,47 $\pm$ 0,23	292,58 $\pm$ 8,76
<b><u>Marajó</u></b>	7	200,76 $\pm$ 9,59	12,00 $\pm$ 1,45	2,34 $\pm$ 0,30	281,81 $\pm$ 7,20
<b><u>Pancas</u></b>	5	224,56 $\pm$ 11,92	12,00 $\pm$ 1,00	2,58 $\pm$ 0,14	291,50 $\pm$ 4,20
<b><u>N. Porterinha</u></b>	5	243,51 $\pm$ 5,61	11,37 $\pm$ 0,99	2,63 $\pm$ 0,23	263,67 $\pm$ 6,18
<b><u>L. cruzi</u></b>	6	191,68 $\pm$ 11,33	12,93 $\pm$ 1,00	2,42 $\pm$ 0,22	296,15 $\pm$ 7,11

N – número de indivíduos  
 IBI – intervalo entre “bursts”  
 NB – número de “bursts” por trem  
 TT – tamanho do trem  
 FREQ – frequência

**Tabela 4.6:** Análises de variância comparando as populações de *L. longipalpis* com som de “burst” e *L. cruzi*.

	<b>IBI (ms)</b>	<b>NB</b>	<b>TT (s)</b>	<b>FREQ (Hz)</b>
<b>Populações</b>				
<b>com som do</b>	$F_{[6,42]} = 4,87$	$F_{[6,42]} = 1,14$	$F_{[6,42]} = 1,19$	$F_{[6,42]} = 2,03$
<b>tipo “burst”</b>	$p=0,001$	$p=0,356$	$p=0,331$	$p=0,086$
<b>Populações</b>				
<b>com som do</b>	$F_{[7,47]} = 5,91$	$F_{[7,47]} = 1,08$	$F_{[7,47]} = 1,21$	$F_{[7,47]} = 2,27$
<b>tipo “burst” +</b>	$P<0,001$	$p=0,394$	$p=0,316$	$p=0,045$
<b><i>L. cruzi</i></b>				

IBI – intervalo entre “bursts”  
 NB – número de “bursts” por trem  
 TT – tamanho do trem  
 FREQ – frequência



**Tabela 4.7:** Análise *Post-Hoc* LSD com o teste LSD comparado as populações com som pulsado. A metade superior da tabela mostra os valores de probabilidade para o IBI e a parte inferior é referente ao número de “bursts”.

NB \ IBI	<u>Sobral2P</u>	<u>Jaíba 2P</u>	<u>Estrela 2P</u>	<u>Natal</u>	<u>Marajó</u>	<u>Pancas</u>	<u>N. Porterinha</u>	<u>L. cruzi</u>
<u>Sobral2P</u>	*****	<b>0,001</b>	0,422	0,801	0,101	0,921	0,308	<b>0,035</b>
<u>Jaíba 2P</u>	0,054	*****	<b>0,011</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,039</b>	<b>&lt;0,001</b>
<u>Estrela 2P</u>	0,964	0,068	*****	0,561	0,056	0,748	0,410	<b>0,017</b>
<u>Natal</u>	0,082	0,798	0,102	*****	0,056	0,748	0,410	<b>0,017</b>
<u>Marajó</u>	0,273	0,427	0,568	0,568	*****	0,174	<b>0,017</b>	0,581
<u>Pancas</u>	0,319	0,470	0,606	0,606	1,000	*****	0,314	0,071
<u>N. Porterinha</u>	0,172	0,728	0,895	0,895	0,714	0,735	*****	<b>0,006</b>
<u>L. cruzi</u>	0,636	0,182	0,255	0,255	0,571	0,603	0,384	*****

**Em negrito estão assinalados os valores significativos ao nível de 5%.**

IBI – intervalo entre “bursts”

NB – número de “bursts” por trem

**Tabela 4.8:** Análise *Post-Hoc* LSD com o teste LSD comparado as populações com som pulsado. A metade superior da tabela mostra os valores de probabilidade para o tamanho do trem e a parte inferior é referente a frequência

TT Freq	<u>Sobral2P</u>	<u>Jaíba 2P</u>	<u>Estrela 2P</u>	<u>Natal</u>	<u>Marajó</u>	<u>Pancas</u>	<u>N. Porterinha</u>	<u>L. cruzi</u>
<u>Sobral2P</u>	*****	0,745	0,728	0,129	0,077	0,298	0,354	0,137
<u>Jaíba 2P</u>	0,188	*****	0,509	0,232	0,143	0,447	0,519	0,232
<u>Estrela 2P</u>	0,088	0,653	*****	0,071	<b>0,042</b>	0,188	0,228	0,079
<u>Natal</u>	0,508	<b>0,047</b>	<b>0,019</b>	*****	0,718	0,787	0,698	0,901
<u>Marajó</u>	0,704	0,368	0,194	0,306	*****	0,571	0,497	0,834
<u>Pancas</u>	0,635	0,106	0,051	0,926	0,426	*****	0,917	0,722
<u>N. Porterinha</u>	0,065	0,476	0,766	<b>0,015</b>	0,140	<b>0,038</b>	*****	0,642
<u>L. cruzi</u>	0,362	<b>0,036</b>	<b>0,015</b>	0,744	0,218	0,711	<b>0,012</b>	*****

**Em negrito estão assinalados os valores significativos ao nível de 5%.**

TT – tamanho do trem  
FREQ – frequência

### 4.1.3 Padrão misto

O terceiro padrão de som, o misto, foi encontrado somente na população de Mesquita (Fig. 4.6). Como mencionado anteriormente, esse tipo de som parece ser intermediário aos outros dois padrões. O primeiro quarto se assemelha ao som pulsado e os três quartos restantes ao padrão de “burst”. Apenas dois indivíduos, proles da mesma fêmea, foram gravados, no entanto, um deles copulou com três fêmeas diferentes. Os sons destas cópulas foram analisados separadamente, pois a variação entre os trens produzidos por este indivíduo foi similar a variação encontrada entre os dois indivíduos.

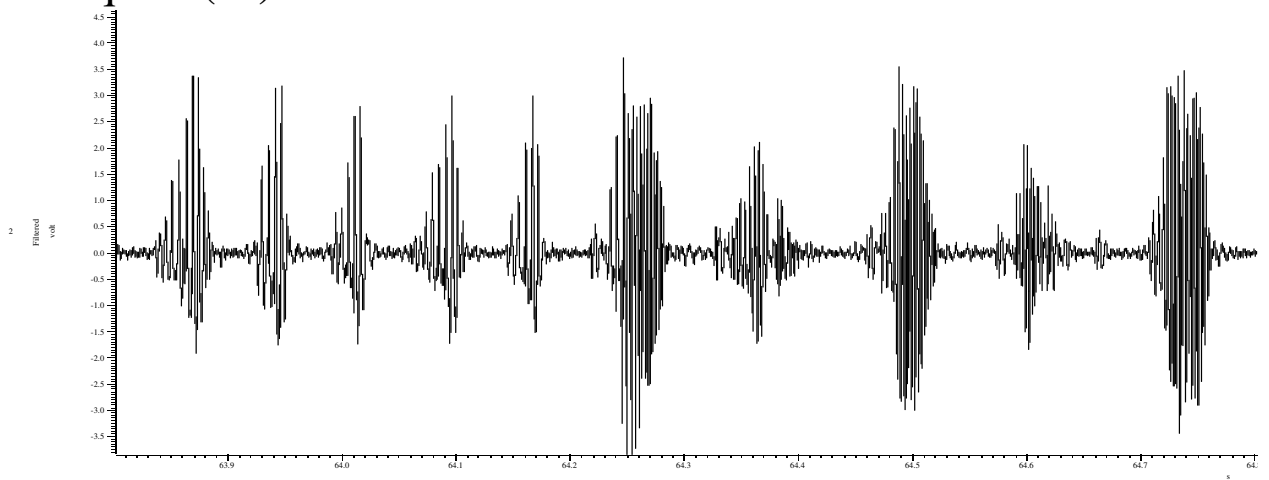
Os valores de todos os parâmetros encontrados para esse padrão são significativamente diferentes de todos os outros e sua frequência é a maior encontrada nos sons das populações de *L. longipalpis*, em média 317,39 Hz. O número de ciclos por pulso também apresentou grande diferença, com uma média total de quase 14 ciclos por pulso (Tabela 4.9).

Um aspecto importante do som de Mesquita é o seu caráter intermediário: a primeira parte é produzida e soa como um som pulsado, já a segunda parte se assemelha ao som do tipo “burst”. Assim as duas partes também foram analisadas separadamente e comparadas, cada uma delas, com as populações com o tipo de som correspondente. A média e o desvio padrão dos parâmetros das duas partes estão apresentados na tabela 4.9.

A parte inicial corresponde a cerca de um quarto do trem total tanto em tempo quanto em número de pulsos. Esta parte, entretanto, apresenta pulsos com cerca de 8 ciclos por pulsos, valor que é maior do que o número de ciclos encontrados nos pulsos policíclicos de Lapinha (Tabelas 4.1 e 4.9). A parte final, que corresponde a maior parte do trem, tem um tamanho de trem similar ao tamanho visto nas populações com som do tipo “burst” (~3,287 segundos), no entanto, o intervalo entre “bursts” apresenta um valor médio próximo da metade dos valores médios encontrados nas populações com som de “burst”.

As duas partes do trem foram comparadas com as populações que produziam o tipo de som semelhante a cada um deles por análise de variância. Nesta análise não foi feita a comparação do número de ciclos por pulso da parte final, pois não foi feitos esse tipo de análise no som das populações com tipo “burst”. O resultado desta análise está apresentado na tabela 4.10. É interessante notar que o tamanho do trem da segunda parte não apresenta diferença significativa com o tamanho do trem das populações com som de “burst”.

## Mesquita (M)



**Figura 4.6:** Som primário da população de *L. longipalpis* de Mesquita que apresenta som do tipo misto. Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

**Tabela 4.9:** Parâmetros do som da população que apresenta som do tipo misto. A tabela mostra a média ( $\pm$ erro padrão da média). O valor inicial se refere a parte semelhante ao som pulsado e o valor final a parte similar ao som de “burst”.

	<b>IPI / IBI (ms)</b>	<b>NP / NB</b>	<b>TT (s)</b>	<b>Freq (Hz)</b>	<b>CCP</b>
<b>Mesquita (total)</b>	106,49 $\pm$ 3,40	40 $\pm$ 1,96	4,14 $\pm$ 0,29	317,39 $\pm$ 8,46	13,94 $\pm$ 0,20
<b>Mesquita (inicial)</b>	87,22 $\pm$ 5,31	10,5 $\pm$ 0,96	0,817 $\pm$ 0,08	161,14 $\pm$ 4,88	7,98 $\pm$ 0,39
<b>Mesquita (final)</b>	116,33 $\pm$ 2,46	29,25 $\pm$ 2,594	3,287 $\pm$ 0,29	312,50 $\pm$ 10,55	16,13 $\pm$ 0,41

IPI – intervalo entre pulsos  
 IBI – intervalo entre “bursts”  
 NP – número de pulsos por trem  
 NB – número de “bursts” por trem  
 TT – tamanho do trem  
 FREQ – frequência  
 CPP – ciclos por pulso

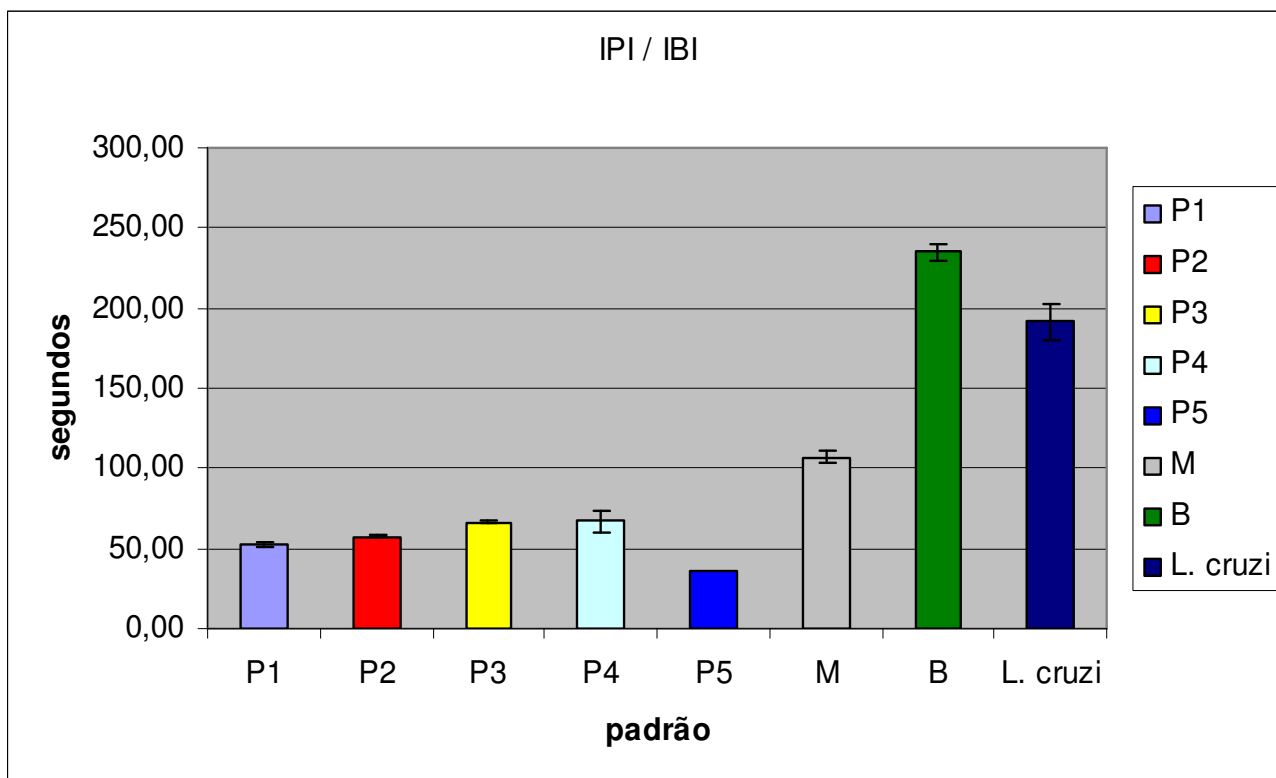
**Tabela 4.10:** Análises de variância comparando as duas partes do som de Mesquita com as populações correspondentes a cada uma das partes. A parte inicial foi comparada com as populações com som pulsado e a segunda parte com as populações com som de “burst”.

	<b>IPI / IBI (ms)</b>	<b>NP / NB</b>	<b>TT (s)</b>	<b>FREQ (Hz)</b>	<b>CPP</b>
<b>Comparação com som pulsado</b>	$F_{[6,44]} = 29,31$	$F_{[6,44]} = 29,1$	$F_{[6,44]} = 14,55$	$F_{[6,44]} = 22,82$	$F_{[6,44]} = 92,78$
	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
<b>Comparação com som de "burst"</b>	$F_{[8,50]} = 12,83$	$F_{[8,50]} = 22,03$	$F_{[8,50]} = 1,41$	$F_{[8,50]} = 3,45$	
	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,2156$	$p = 0,0031$	

IPI – intervalo entre pulsos  
 IBI – intervalo entre “bursts”  
 NP – número de pulsos por trem  
 NB – número de “bursts” por trem  
 TT – tamanho do trem  
 FREQ – frequência  
 CPP – ciclos por pulso

#### **4.1.4 Comparação dos diferentes padrões de som**

Finalmente realizamos uma comparação dos diferentes parâmetros analisados nos padrões observados. Esta comparação foi feita com as médias e o erro padrão da média de cada um dos padrões. Tanto a média como o erro padrão da média foram calculados a partir dos valores de todos os indivíduos de cada padrão. Estes dados estão apresentados nas figuras, 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10. Apesar do som dos machos de *L. cruzi* terem um padrão de “burst”, esta espécie não foi agrupada com as populações de *L. longipalpis* que produzem este tipo de som, sendo analisada separadamente.



**Figura 4.7:** Gráfico com a média e o erro padrão da média do IPI (ou IBI) dos diferentes padrões encontrados em *L. longipalpis* e a média do IBI e o erro padrão da média de *L. cruzi*.

P1 – pulsado 1 encontrado em Jacobina

P2 – pulsado 2 encontrado em Lapinha

P3 – pulsado 3 encontrado em Sobral 1P e Teresina

P4 – pulsado 4 encontrado em Jaíba 1P

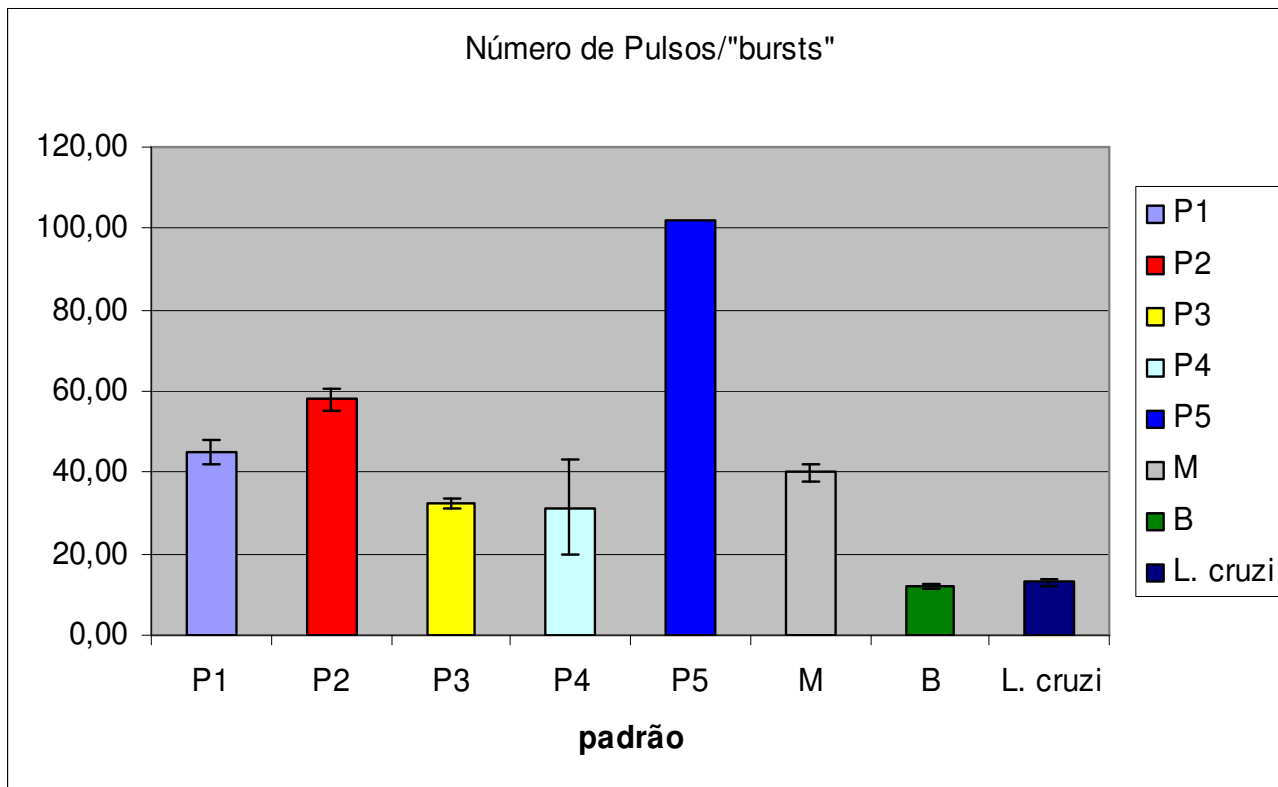
P5 – pulsado 5 encontrado em Estrela 1P

M – misto encontrado em Mesquita

B - som de “burst” encontrado em Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porterinha.

*L. cruzi* – som encontrado nesta espécie, tipo “burst”





**Figura 4.8:** Gráfico com a média e o erro padrão da média do número de pulsos (ou número de “burst”) dos diferentes padrões encontrados em *L. longipalpis* e a média do número de “burst” e o erro padrão da média de *L. cruzi*.

P1 – pulsado 1 encontrado em Jacobina

P2 – pulsado 2 encontrado em Lapinha

P3 – pulsado 3 encontrado em Sobral 1P e Teresina

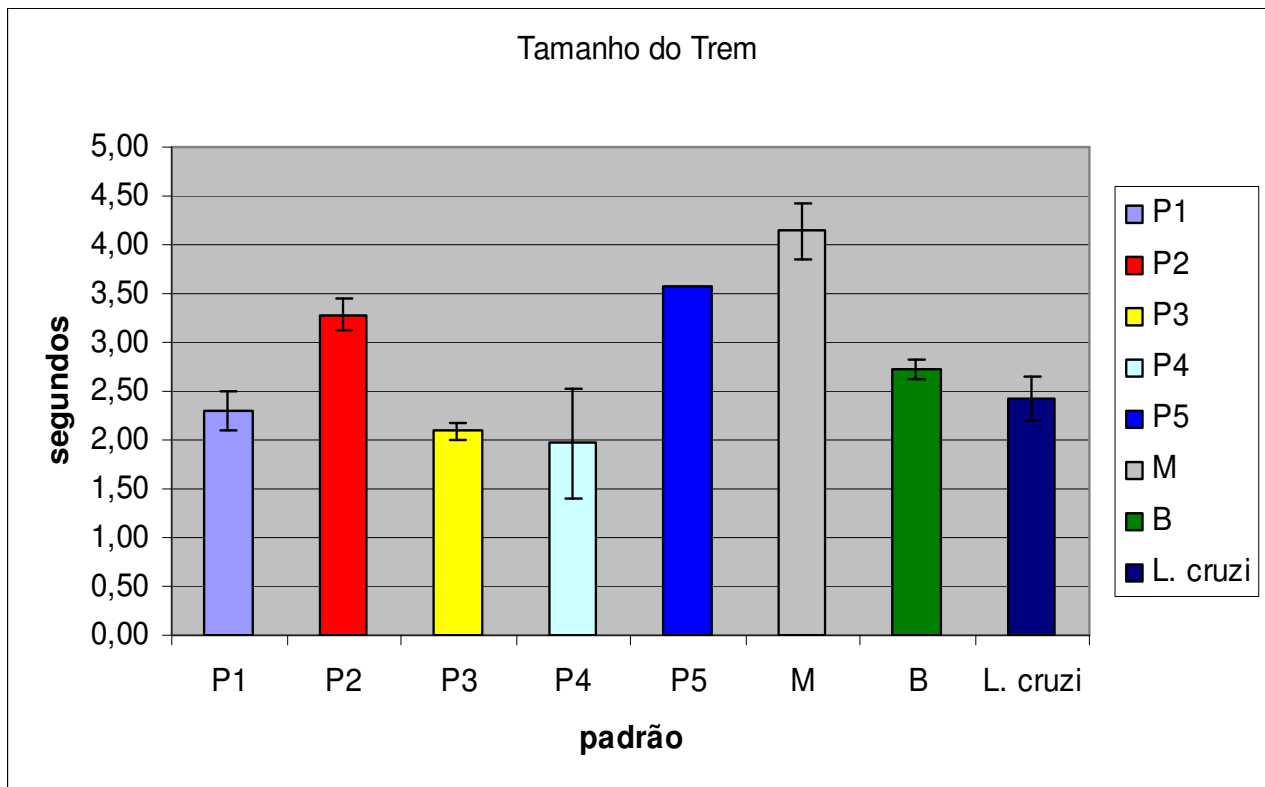
P4 – pulsado 4 encontrado em Jaíba 1P

P5 – pulsado 5 encontrado em Estrela 1P

M – misto encontrado em Mesquita

B - som de “burst” encontrado em Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porteira.

*L. cruzi* – som encontrado nesta espécie, tipo “burst”



**Figura 4.9:** Gráfico com a média e o erro padrão da média do tamanho do trem dos diferentes padrões encontrados em *L. longipalpis* e do som de *L. cruzi*.

P1 – pulsado 1 encontrado em Jacobina

P2 – pulsado 2 encontrado em Lapinha

P3 – pulsado 3 encontrado em Sobral 1P e Teresina

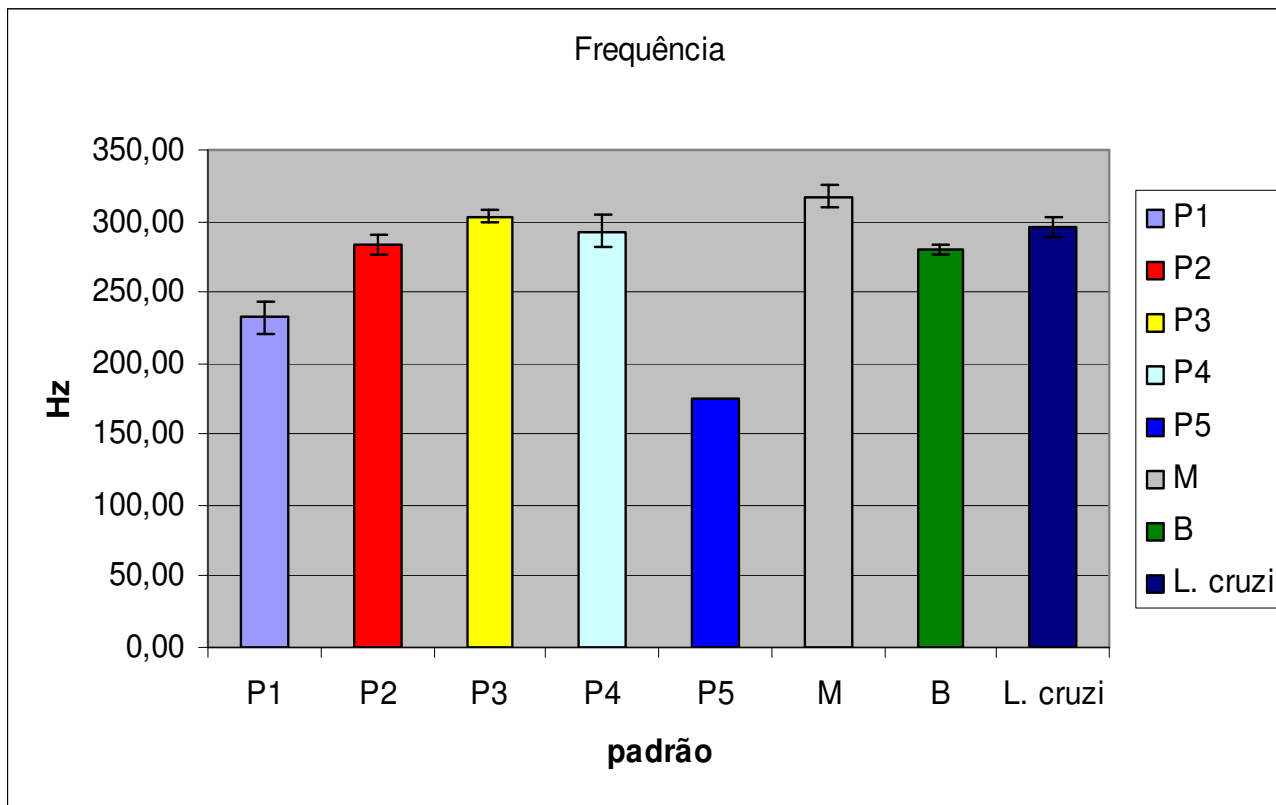
P4 – pulsado 4 encontrado em Jaíba 1P

P5 – pulsado 5 encontrado em Estrela 1P

M – misto encontrado em Mesquita

B - som de “burst” encontrado em Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porterinha.

*L. cruzi* – som encontrado nesta espécie, tipo “burst”



**Figura 4.10:** Gráfico com a média e o erro padrão da média da frequência dos diferentes padrões encontrados em *L. longipalpis* e do som de *L. cruzi*.

P1 – pulsado 1 encontrado em Jacobina

P2 – pulsado 2 encontrado em Lapinha

P3 – pulsado 3 encontrado em Sobral 1P e Teresina

P4 – pulsado 4 encontrado em Jaíba 1P

P5 – pulsado 5 encontrado em Estrela 1P

M – misto encontrado em Mesquita

B - som de “burst” encontrado em Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porterinha.

*L. cruzi* – som encontrado nesta espécie, tipo “burst”

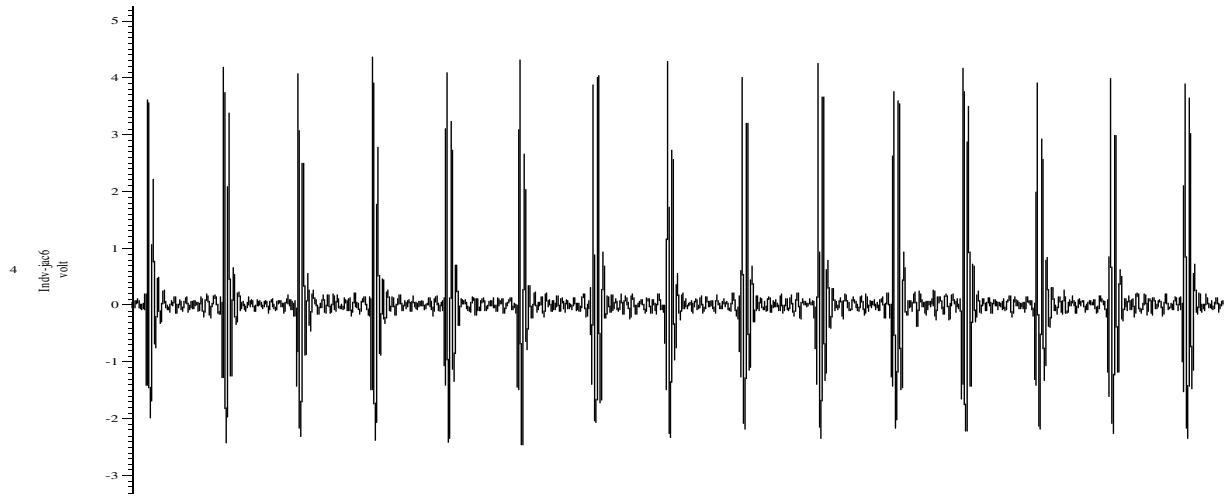
## 4.2 Análise do som de machos de colônias antigas.

Outra análise realizada neste trabalho foi a do som de colônias de *L. longipalpis* provenientes de Jacobina e de Marajó, mantidas no laboratório a 15 e 4 anos respectivamente, no intuito de verificar se a colonização prolongada causa algum efeito no som. Não foram observadas diferenças nos padrões em relação aos sons dos indivíduos gravados diretamente do campo e/ou de poucas gerações criadas em laboratório (Fig. 4.11). A tabela 4.11 mostra as médias ( $\pm$  erro padrão) encontradas para os parâmetros do som de machos destas colônias.

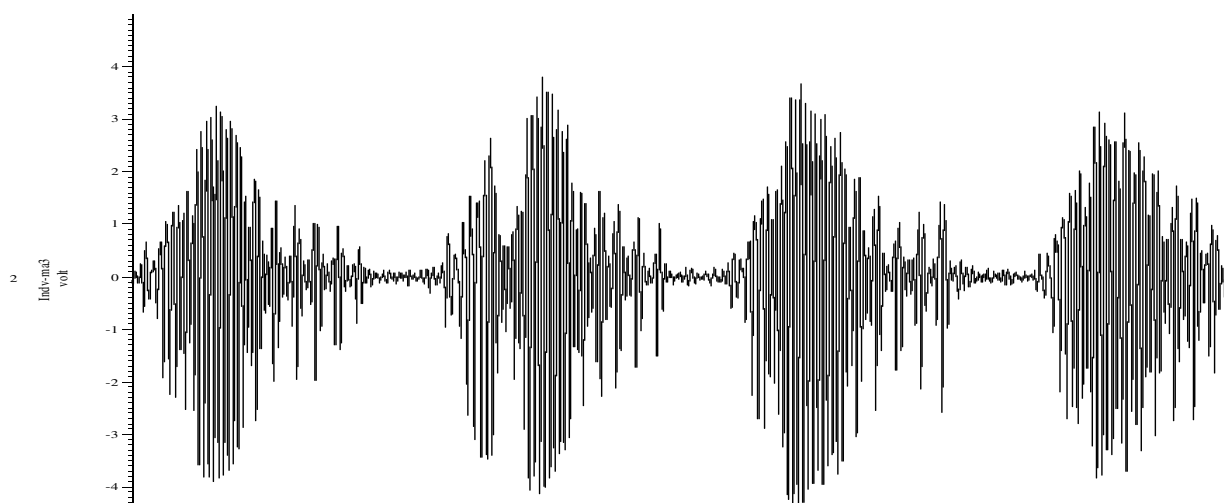
Apesar do padrão não apresentar diferenças, vemos na comparação da média, tanto do IPI como do IBI, uma diferença significativa entre as colônias e as populações naturais correspondentes. Ambas as colônias apresentam um aumento neste parâmetro: 65,88 milisegundos para Jacobina e 256,22 milisegundos para Marajó. Essa diferença se mostrou significativa na análise de variância em ambas as populações ( $F_{[1;25]} = 62,69$ ,  $p < 0,001$ ;  $F_{[1;25]} = 18,87$ ,  $p < 0,001$  respectivamente).

Também foram encontradas diferenças significativas no número de pulsos na comparação da população do campo com a colônia de Jacobina ( $p = 0,031$ ) e na variação no tamanho do trem ( $p = 0,045$ ) na comparação entre as duas amostras de Marajó

## Jacobina-colônia



## Marajó-colônia



**Figura 4.11:** Som primário dos machos das colônias provenientes de Jacobina e de Marajó. Na figura é mostrado cerca de 1s de som.

**Tabela 4.11:** Parâmetros do som das colônias antigas e das populações selvagens ou de colônias recentes correspondentes. A tabela mostra a média ( $\pm$ erro padrão da média).

	<b>N</b>	<b>IPI / IBI (s)</b>	<b>NP/NB</b>	<b>TT (s)</b>	<b>Freq (Hz)</b>	<b>CPP</b>
<b><u>Jacobina colônia</u></b>	16	65,98 $\pm$ 0,97*	35,28 $\pm$ 2,78*	2,25 $\pm$ 0,18	235,24 $\pm$ 5,87	3,11 $\pm$ 0,11*
<b><u>Marajó colônia</u></b>	15	256,22 $\pm$ 7,46*	12,75 $\pm$ 0,91	3,11 $\pm$ 0,20*	278,68 $\pm$ 3,40	

N – número de indivíduos

IPI – intervalo entre pulsos

IBI – intervalo entre “bursts”

NP – número de pulsos por trem

NB – número de “bursts” por trem

TT – tamanho do trem

FREQ – frequência

## **5. Discussão:**

Muitos insetos fazem corte durante a cópula e este comportamento parece ser importante para o que é conhecido como a escolha “críptica” da fêmea (Eberhard, 1994). Este tipo de comportamento parece estar ocorrendo em *Lutzomyia longipalpis*, pois alguns estudos observaram que no cruzamento entre algumas populações brasileiras ocorria a cópula, no entanto, a fêmea não era inseminada (Ward *et al*, 1988; Souza *et al*, 2002b) sugerindo que existe algum mecanismo durante a cópula que faz com que a fêmea “aceite” ou não ser inseminada.

Sinais acústicos emitidos durante a corte são importantes no isolamento reprodutivo de espécies do gênero *Drosophila* (Ewing & Bennet-Clark, 1968; Kyriacou & Hall, 1980; Kyriacou & Hall, 1982; Hoikkala & Crossley, 2000; Hoikkala *et al.*, 2000; Tauber & Eberl, 2003). Os machos de *L. longipalpis* também produzem som, no entanto, ele é feito principalmente durante a cópula e, talvez, seja o sinal usado pela fêmea para que esta “permita” a inseminação.

Foram encontrados três tipos distintos de som (primário) de cópula produzido por machos de *L. longipalpis*: o tipo pulsado, o de “burst” e o misto. Dentre esses tipos foram observados sete padrões de som, cinco pulsados e um de cada um dos outros dois tipos sugerindo a existência de sete espécies crípticas de *L. longipalpis*. Essas diferenças observadas são maiores que às vistas entre algumas espécies de *Drosophila* (ver Fig. 1.1), sugerindo que cada um dos padrões corresponde a uma espécie diferente do complexo. Isso corrobora os dados obtidos com marcadores moleculares como microsatelites (Maingon *et al*, 2003; Watts *et al*, 2005) e os genes *period*, *cacophony* e *paralytic*, todos os três envolvidos com o som de corte de *Drosophila*, que separam estas populações de forma semelhante à separação vista no som de cópula (Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Bottecchia *et al*, 2004; Araki 2005; Araki & Peixoto, dados não publicados; Lins 2006; Lins & Peixoto, dados não publicados). Estes marcadores moleculares, assim como experimentos com cruzamentos (Ward *et al*, 1983; 1988; Souza & Peixoto; dados não publicados) e feromônios (ver abaixo) indicam que as populações com diferentes tipos de som pulsado representam espécies distintas enquanto que as populações de *L. longipalpis* com som de “burst” representam provavelmente uma única espécie (Souza *et al*, 2004).

Em *L. longipalpis* foram descobertos até o momento quatro tipos de feromônio sexual: o 3-metil- $\alpha$ -himacaleno (3M $\alpha$ H), produzido pelos machos de Jacobina, o (S)-9-metilgermacreno-B (9MGB), achado nas populações de Lapinha e Sobral 1P, cembreno-1, encontrado em machos de Estrela 1P e em diversas populações com tipo som “burst”, e o cembreno-2 visto recentemente em Jaíba 1P (Ward *et al*, 1988, Hamilton *et al*, 1996a; 1996b; 2004; 2005). Esses feromônios são produzidos por glândulas presentes nas as pintas abdominais e os compostos mencionados anteriormente correspondem a mais de 90% do conteúdo extraído destas (Ward *et al*, 1988, Hamilton *et al*, 1996a; 1996b; 2004; 2005). Além do componente principal, tanto a concentração como a quantidade deste e dos outros componentes produzidos por essas glândulas são importantes na caracterização taxonômica (Hamilton *et al*, 2005).

A população de Jacobina onde encontramos o padrão P1, apresenta o feromônio 3-metil- $\alpha$ -himacaleno (3M $\alpha$ H) (Hamilton *et al*, 1996b, Souza *et al*, 2002a; Souza, Vigoder *et al*, 2004). Essa combinação padrão de som-feromônio é exclusiva para esta população (Hamilton *et al*, 1996b, Souza *et al*, 2002a; Souza *et al*, 2004). Experimentos de cruzamento mostraram que essa população é isolada reprodutivamente de outras populações que apresentam outro tipo de som e feromônio (Ward *et al*, 1988, Souza *et al*, 2002b). Os dados moleculares da análise das seqüências dos genes *period*, *cacophony* e *paralytic*, também mostram que essa população é diferente das outras populações brasileiras (Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Bottecchia *et al*, 2004; Araki 2005; Araki & Peixoto, dados não publicados; Lins 2006; Lins & Peixoto, dados não publicados).

Os machos de Lapinha (padrão P2) e de Sobral 1P (padrão P3) produzem sons pulsados bem distintos. Embora, os machos destas duas populações produzam o mesmo componente principal do feromônio sexual, o 9MGB, o extrato glandular possui quantidades e concentrações de compostos bem diferentes (Hamilton *et al*, 2005). Além disso, essas populações apresentam também diferenças moleculares nos genes *period*, *cacophony* e *paralytic* (Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Bottecchia *et al*, 2004; Lins 2006; Lins & Peixoto, dados não publicados).

Outro tipo de som pulsado, o P4, foi encontrado em Jaíba 1P. Os valores médios dos parâmetros desse som são semelhantes ao do som P3 encontrado em Sobral 1P e Teresina. Além da semelhança numérica, esses dois padrões têm em comum uma variação cíclica da amplitude dos pulsos, no entanto, enquanto no som P3 a variação ocorre de pulso



para pulso, no som P4 essa variação acontece ao longo de vários pulsos. Os machos de Jaíba 1P se diferenciam daqueles com padrão P3, pelo feromônio; o cembreno-2 e por diferenças moleculares no gene *period* (Hamilton *et al*, 2004; Araki 2006; Araki & Peixoto, dados não publicados). O som desta população ainda deve ser melhor caracterizado já que apenas dois machos tiveram o seu som gravado, no entanto, em todas as outras populações estudadas o padrão foi consistente, com todos os indivíduos, dentro de uma determinada população, produzindo o mesmo padrão de som.

O último padrão de som pulsado (P5) foi encontrado na população de Estrela 1P. Esta população é a que apresenta maiores discrepâncias quando comparados distintos marcadores como os padrões do som, tipos de feromônio e análise molecular dos genes *period*, *cacophony* e *paralytic* (Ward *et al*, 1988; Hamilton *et al*, 1996a; 1996b, 2004, 2005; Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Bottecchia *et al*, 2004; Araki 2005; Araki & Peixoto, dados não publicados; Lins 2006; Lins & Peixoto, dados não publicados). Em Estrela 1P, o padrão de som e as análises moleculares separam esta população da população simpátrica Estrela 2P (com som tipo “burst”), mas o feromônio encontrado é o mesmo (cembreno-1) (Hamilton *et al*, 2005). A população de Estrela 1P é a única com som pulsado a apresentar o feromônio cembreno-1, característico das populações com som de “burst” (ver adiante) (Ward *et al*, 1988; Hamilton *et al*, 2004; 2005). Seria interessante realizar experimentos de cruzamento entre estas duas populações simpátricas para verificar o grau de isolamento reprodutivo entre elas. O padrão P5 ainda deve ser confirmado, pois apenas um indivíduo teve o som gravado, mas como mencionado anteriormente, até o momento o padrão de som tem se apresentado consistente em todos os indivíduos de uma população.

A única população com som pulsado cujos machos não tiveram seu feromônio analisado foi Teresina. Estes machos produzem o mesmo padrão de som encontrado em Sobral 1P, o pulsado 3 (P3). O som destas duas populações não apresentou diferenças significativas e a análise molecular do gene *period* também não mostrou diferenças entre elas (Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Araki & Peixoto, dados não publicados).

O padrão mais comum encontrado nas populações brasileiras de *L. longipalpis* foi o do tipo “burst”. Este som, visto em machos de Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porteira, é semelhante nestas populações, apresentando poucas diferenças nos seus parâmetros. Estas populações apresentaram diferenças significativas apenas no parâmetro intervalo entre “bursts” (IBI). Esta diferença se deve principalmente ao IBI de Jaíba 2P, significativamente mais alto que o das outras populações. Na falta de

experimentos de cruzamentos é difícil determinar se essa variação no IBI está causando algum isolamento reprodutivo entre Jaíba 2P e as demais populações com som de “burst”. No entanto, análise com o gene *period* (Araki & Peixoto, dados não publicados) indica pouca diferenciação entre elas.

Em espécies de *Drosophila*, na qual o som de corte é bem caracterizado como um componente importante no isolamento reprodutivo, foi visto que as mutações observadas que alteram o IPI o aumentam (Gleason, 2005). Além disso, é mais fácil selecionar artificialmente para um aumento no IPI do que uma diminuição (Ritchie & Kyriacou, 1996), o que sugere a existência de seleção sexual para IPIs menores (Gleason *et al*, 2002; Ritchie & Kyriacou, 1996). Assim, o aumento do IBI na população de Jaíba 2P poderia ocorrer devido a uma seleção sexual fraca para este parâmetro. Outra alternativa seria uma mudança na preferência das fêmeas para o valor do IBI nesta localidade.

Para distinguir estas alternativas e responder algumas perguntas seria interessante realizar experimentos de “playback” com esta e outras populações. Nesse tipo de experimento, cortam-se as asas dos machos e produz-se o som de forma artificial para testar a resposta da fêmea aos diferentes tipos de som e parâmetros. Assim poderíamos saber a real importância do som de cópula para o isolamento reprodutivo e quais são os componentes principais deste sinal acústico para o reconhecimento específico por parte das fêmeas das diferentes populações.

Além da semelhança do padrão de som (Souza *et al* 2004; esta dissertação) e do tipo de feromônio (cembreno-1) (Ward *et al*, 1988; Hamilton *et al*, 2004; 2005; Brazil, comunicação pessoal), as populações Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porteira também não apresentam diferenciação significativa em análises moleculares do gene *period* (Bauzer *et al*, 2002a; 2002b; Araki 2005; Araki & Peixoto, dados não publicados). Assim é provável que estas populações representem uma única espécie como mencionado acima.

O som do tipo “burst” foi encontrado também nos machos de *Lutzomyia cruzi*. Os machos desta espécie se diferenciam dos machos de *L. longipalpis* pela anatomia da genitália. A comparação do som de *L. cruzi* com as populações de *L. longipalpis* que apresentam o mesmo tipo de som (Sobral 2P, Jaíba 2P, Estrela 2P, Natal, Marajó, Pancas e Nova Porteira) mostrou variação no IBI e uma pequena variação na frequência. Eles se diferenciam dessas populações pelo tipo de feromônio sexual produzido, o (S)-9-metilgermacreno-B (9MGB) (Brazil & Hamilton, 2004) que também é encontrado em machos

de Lapinha e Sobral 1P de *L. longipalpis* (Hamilton *et al*, 1996b; 2005). A análise molecular do gene *period* mostrou que *L. cruzi* apresenta diferenças em relação a *L. longipalpis* sendo a diferenciação semelhante à observada entre populações com som de “burst” e pulsado desta última (Araki 2006; Araki & Peixoto, dados não publicados).

O último tipo de som de cópula encontrado foi o tipo misto. Apenas dois indivíduos, prole da mesma fêmea, foram analisados. Este som foi gravado em machos da população de Mesquita e apresenta características dos dois outros tipos encontrados (pulsado e “burst”), inclusive na forma como o som é produzido. Um dado interessante encontrado no som destes machos é que o tamanho do trem da parte que se assemelha ao som de “burst” não apresenta diferença em relação ao tamanho do trem das populações com som do tipo “burst”. Talvez este tipo de som seja uma transição entre os dois outros tipos, tornando esta população particularmente interessante para um estudo evolutivo do som de cópula dos machos de *L. longipalpis*. Infelizmente não é possível realizar uma nova coleta na área devido a problemas de segurança pública. No entanto, iremos tentar gravar o som de populações próximas com a esperança de encontrar o mesmo padrão.

Outra análise realizada em nosso trabalho foi a do som de colônias antigas. Esta análise mostrou que o som mantém o padrão inalterado apesar da longa colonização. Um dado interessante desta análise é que ambas as colônias estudadas (Jacobina e Marajó) apresentam um aumento significativo do intervalo entre pulsos/“burst” (IPI/IBI). Este resultado levanta duas hipóteses; ou não está havendo forte seleção e o aumento está ocorrendo por deriva, ou está havendo seleção nas colônias a favor do aumento do IPI/IBI já que o aumento nas duas colônias ocorreu de forma proporcional. A análise do som de colônias de *Drosophila melanogaster* não mostrou ocorrência de um efeito no IPI causada simplesmente por técnicas de colonização (Ritchie *et al*, 1994). Considerando que também em *Drosophila* parece haver seleção para um IPI mais curto e que mutações provocam principalmente um aumento do IPI (Ritchie & Kyriacou, 1996; Gleason, 2005), o aumento observado no IPI/IBI nas colônias de *L. longipalpis* pode ser devido à ausência de forte seleção no laboratório.

As diferenças encontradas no som entre as populações de *L. longipalpis* são particularmente interessantes quando comparamos as localidades onde parecem ocorrer duas espécies em simpatria, como Sobral, Jaíba e Estrela. Nestas localidades, os machos apresentam diferenças marcantes no som apesar de indivíduos de uma pinta e duas pintas serem coletados na mesma armadilha, mostrando que representam espécies simpátricas, o

que é corroborado pelos dados do gene *period* (Araki 2006; Araki & Peixoto, dados não publicados). É interessante notar que nos três casos os machos dos dois fenótipos produzem sons de tipos diferentes, com o macho de um par de pintas produzindo som pulsado e o de duas pintas som do tipo “burst”, apesar do tipo de som não está associado ao fenótipo de pintas, já que encontramos em outras localidades som pulsado em machos com duas pintas (Jacobina) e som de “burst” em machos de uma pinta (Marajó e Pancas).

Seria interessante traçar uma linha evolutiva dos padrões de som de cópula de *L. longipalpis* para poder entender melhor o que está acontecendo no complexo. No entanto, é difícil determinarmos qual dos tipos de som encontrado seria o ancestral. Um estudo mais aprofundado de indivíduos com som misto poderia, talvez, fornecer respostas para esta dúvida já que este tipo parece ser intermediário aos outros dois podendo até mesmo ser uma transição de um para o outro, ou representar uma população originada da hibridização de populações com som pulsado e de “burst”. Seria interessante também, para entender melhor essa questão, gravar o som de outra espécie do complexo, *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Arrivillaga & Feliciangeli, 2001), e de alguma espécie próxima que não faça parte do complexo, para tentar começar a compreender como surgiram os diferentes tipos de som.

## **6. Conclusões:**

- A análise dos sinais acústicos de diferentes populações de *Lutzomyia longipalpis* indica a existência de pelo menos sete padrões diferentes no som de cópula dos machos, cinco padrões pulsados e um padrão de “burst” e um padrão misto.
- Os resultados da análise do som de cópula são, de forma geral, consistentes com os obtidos em experimentos de cruzamentos, com dados de feromônios sexuais, com a análise de microsatélites e molecular dos genes *period*, *cacophony* e *paralytic*, sugerindo a existência de pelo menos 7 espécies crípticas no complexo longipalpis no Brasil.
- Verificou-se que os machos de *Lutzomyia cruzi* produzem um som de cópula similar ao produzido por algumas populações de *L. longipalpis*, que, no entanto, produzem um feromônio distinto, reforçando a idéia de que *L. cruzi* provavelmente faz parte do complexo longipalpis.
- A análise do som de duas colônias antigas mostrou que o padrão de som de cópula é um caráter estável e bastante útil na identificação das espécies do complexo.

## **7. Bibliografia:**

Alt S, Ringo J, Talyn B, Bray W & Dowse H. The period gene controls courtship song cycles in *Drosophila melanogaster*. **Animal Behavior**; 1998; 56(1): 87-97.

Araki AS. **Análise da diferenciação genética no gene *period* entre populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae)**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Dissertação em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz.

Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD & Lanzaro GC. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Infection, Genetics and Evolution**; 2002; 2(2): 83-95.

Arrivillaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD & Lanzaro GC. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. **Journal of Medical Entomology**; 2003; 40(5): 615-627.

Aspi J. & Hoikkala A. Male mating success and survival in the field with respect to size and courtship song character in *Drosophila littoralis* and *Drosophila montana* (Diptera: Drosophilidae). **Journal of Insect Behavior**; 1995; 8: 67–87.

Azevedo AC, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NA, Rosa-Freitas MG & Rangel EF. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 2000; 95(3):305-22.

Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, Andrade PP, Castro JAF, Rebêlo JM, Carvalho SMS & Ramalho-Ortigão M. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. **Acta Tropica**; 2006; 98(1): 15-24

Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RSJ, Kyriacou CP & Peixoto AA. The *period* gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Molecular Biology**; 2002a; 11(4): 315-323.

Bauzer LGSR, Gesto JSM, Souza NA, Ward RSJ, Hamilton GC, Kyriacou CP & Peixoto AA. Molecular divergence in the *period* gene between two putative sympatric species of *Lutzomyia longipalpis* complex. **Molecular Biology and Evolution**; 2002b; 19(9): 1624-1627.

Bauzer LGSR, Souza NA, Maigon RDC & Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 2007; 102: in press.

Belton P. Attraction of male mosquitoes to sound, **Journal of the American Mosquito Control Association**; 1994; 10(2): 297-301.

Bottecchia M, Oliveira SG, Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, Kyriacou, CP & Peixoto AA. Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Molecular Evolution**; 2004; 58(6):754-761.

Brazil RP & Hamilton JG. Isolation and identification of 9-methylgermacrene-B as the putative sex pheromone of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 2002; 97(3): 435-436.

Brogdon WG. Measurement of flight tone differentiates between female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), **Journal of Medical Entomology**; 1994; 31(5): 700-703.

Brogdon WG. Measurement of Flight Tone Differentiates Among Members of the *Anopheles gambiae* Species Complex (Diptera: Culicidae), **Journal of Medical Entomology**; 1998; 35(5): 681-684.

Centers for Disease Control and Prevention. Division of Parasitic Diseases. [on-line]. Estados Unidos, Atlanta; 2006 [capturado em 16 dez 2006]. Disponível em: [www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht\\_leishmania.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm).

Chang HC & Miller DD. Courtship and mating sounds in species of *Drosophila affinis* subgroup. **Evolution**; 1978; 32(3): 540-550.

Clements AN. **The biology of mosquitoes**. volume 2. U.K. CABI Publishing; 1999.

Derlinger DL, Saini RK & Chaudhury MFB. Parturition in the Tsetse fly *Glossina morsitans*: pattern of activity, sound production and evidence for control by the mother's brain, **Journal of Insect Physiology**; 1983; 29 (9): 715-721.

Doi M, Matsuda M, Tomaru M, Matsubayashi H & Oguma Y. A locus for female discrimination behavior causing sexual isolation in *Drosophila*. . **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**; 2001; 98(12):6714-6719.

Duhrkopf RE & Hartberg WK. Differences in male mating response and female flight sounds in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), **Journal of Medical Entomology**; 1992; 29 (5): 796-801.

Eberhard WG. Evidence for widespread courtship during copulation in 131 species of insects and spiders, and implications for cryptic female choice. **Evolution**; 1994; 48: 711-733.

Ewing AW & Bennet-Clark HC. The courtship songs of *Drosophila*. **Behavior**; 1968 31: 288-301.

Ewing AW. **Arthropod bioacoustics**. New York: Cornell University Press; 1989.

Gleason JM, Nuzhdin SV & Ritchie MG. Quantitative trait loci affecting a courtship signal in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**; 2002; 89(1):1-6.



Gleason JM. Mutations and natural genetic variation in the courtship song of *Drosophila*. **Behavior Genetics**; 2005; 35(3):265-277.

Gopfert MC & Robert D. The mechanical basis of *Drosophila* audition. **Journal Experimental Biology**; 2002; 205(Pt 9):1199-1208.

Gorczyca M & Hall JC. The INSECTAVOX, an integrated device for recording and amplifying courtship songs of *Drosophila*. **Drosophila Information Service**; 1987; 66: 157-160.

Greenspan RJ. Understanding the genetic construction of behavior. **Scientific America**; 1995; 272(4):72-78.

Hamilton JGC, Dawson GW & Pickett JA. 9-Methylgermacrene-B; Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. **Journal of Chemical Ecology**; 1996a; 22: 1477-1491.

Hamilton JGC, Dawson GW & Pickett JA. 3-Methyl-Himachalene: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. **Journal of Chemical Ecology**; 1996b; 22: 2331-2340.

Hamilton JG, Brazil RP & Maingon R. A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**; 2004; 41(6):1021-1026.

Hamilton JG, Maingon RD, Alexander B, Ward RD & Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. **Medical Vector Entomology**; 2005; 19(4):480-488.

Hodgkinson VH, Birungi J, Quintana M, Dietze R & Munstermann LE. Mitochondrial cytochrome b variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; 2003; 69(4):386-92. Erratum in: **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; 2003; 69(5):564

Hoikkala A. **Evolution of male courtship sound in the species of the *Drosophila virilis* group**. Acta Universitatis Ouluensis, series A, Scientiae Rerum Naturalium; 1985; 175.

Hoikkala A & Lumme J. Genetic control of the difference in male courtship sound between *Drosophila virilis* and *Drosophila. lummei*. **Behavior Genetics**; 1984; 14(3): 257-268.

Hoikkala A & Lumme J. The genetic basis of evolution of the male courtship sounds in the *Drosophila virilis* group. **Evolution**; 1987; 41: 827-845.

Hoikkala, A. **Courtship signals, their importance and inheritance in the species of the *Drosophila virilis* group**. Acta Universitatis Ouluensis, series A, Scientiae Rerum Naturalium; 1993; 248.

Hoikkala A, Aspi J & Suvanto L. Male courtship song frequency as an indicator of male genetic quality in an insect species, *Drosophila montana*. **Proceedings of Biological Science**; 1998; 265(1395):503-508.

Hoikkala A, Paallysaho S, Aspi J & Lumme J. Localization of genes affecting species differences in male courtship song between *Drosophila virilis* and *Drosophila littoralis*. **Genetic Reviews**; 2000a; 75(1):37-45.

Hoikkala A, Crossley S & Castillo-Melendez C. Copulatory courtship in *Drosophila birchii* and *Drosophila serrata*, species recognition and sexual selection. **Journal of Insect Behavior**; 2000b; 13: 361-373.

Howe MA & Lehane MJ. Post-feed buzzing in the tsetse, *Glossina-morsitans-morsitans*, is an endothermic mechanism. **Physiological entomology**; 1986; 11(3): 279-286.

Isoherranen E, Aspi J & Hoikkala A. Variation and consistency of female preferences for simulated courtship songs in *Drosophila virilis*. **Animal Behavior**; 1999; 57(3): 619-625.

Kahn MC & Offenhauser JrW. The first field tests of recorded mosquito sounds used for mosquito destruction. **American Journal of Tropical Medicine**; 1949; 29: 811-825.

Konopka RJ & Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**; 1971; 68(9): 2112-2116.

Kulkarni SJ, Steinlauf AF & Hall JC. The *dissonance* mutant of courtship song in *Drosophila melanogaster*: isolation, behavior and cytogenetics. **Genetics**; 1988; 18(2): 267-285. *Erratum in: Genetics*; 1988; 118(4): 720.

Kyriacou CP & Hall JC. Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**; 1980; 77(11): 6729-6733.

Kyriacou CP & Hall JC. The function of courtship song rhythms in *Drosophila*. **Animal Behavior**; 1982; 30: 784-801.

Kyriacou CP & Hall JC. Interspecific genetic control of courtship song production and reception in *Drosophila*. **Science**; 1986; 232(4749): 494-497.

Lane R, Phillips A, Molyneux DH, Procter G & Ward RD. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: Site of a possible sex pheromone? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**; 1985; 79(2): 225-229.

Leston D. The stridulatory mechanisms in terrestrial species of Hemiptera Heteroptera. **Proceedings of the Zoological Society of London**; 1957; 128: 369-386.

Liimatainen J, Hoikkala A, Aspi J, & Welbergen P. Courtship in *Drosophila montana*: the effects of male auditory signals on the behavior of flies. **Animal Behavior**; 1992; 43: 35–48.

Lins RMMA. **Isolamento e genética de populações de genes associados à resistência a inseticidas em *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vetor da Leishmaniose visceral americana.** Rio de Janeiro; 2006. Mestrado [Dissertação em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz.

di Luciano V. Morphology of the stridulatory groove of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**; 1981 18(1): 24-32.

Maingon RDC, Ward RD, Hamilton JGC, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ & Watts PC. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. **Molecular Ecology**; 2003; 12(7): 1879-1894.

Mangabeira O. Sobre a sistemática e biologia dos flebótomos do Ceará. **Revista Brasileira de Malariologia de Doenças Tropicais**; 1969; 21: 3-26.

Manrique G & Lazzari CR, Sexual behavior and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 1994; 89(4): 629-633.

Manrique G & Schilman PE. Two different vibratory signals in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica**; 2000; 77(3): 271-278.

Masters WM. Insect disturbance stridulation – Its defensive role. **Behavioral Ecology and Sociobiology**; 1979; 5(2): 187-200.

Masters WM. Insect disturbance stridulation: Characterization of airborne and vibrational components of the sound. *Behavioral Journal of Comparative Physiology A*; 1980; 135: 259-268.

Mukhopadhyay J, Ghosh K, Rangel EF & Munstermann LE. Genetic variability in biochemical characters of brazilian field populations of the *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 1998a; 59(6): 893-901.

Mukhopadhyay J, Ghosh K, Azevedo AC, Rangel EF & Munstermann LE. Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of American Mosquito Control Association*; 1998b; 14(3):277-282.

Mutebi JP, Alexander B, Sherlock I, Wellington J, Souza AA, Shaw J, Rangel EF & Lanzaro GC. Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 1999; 61(1):149-157.

Peixoto AA. & Hall JC. Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila*. *Genetics*; 1998; 148(2): 827-838.

Perrotey S, Mahamdallie SS, Pesson B, Richardson KJ, Gallego M & Ready PD. Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. *Parasite*; 2005; 12(4):283-91.

Popham EJ, Parr MJ & Chowdhury V. Specific differences in tsetse fly sounds and their behavioural significance. *Experientia*; 1977; 34(9): 1152-1154.

Rendahl KG, Jones KR, Kulkarni SJ, Bagully SH & Hall JC. The dissonance mutation of the *no-on-transient-A* locus of *Drosophila melanogaster*. Genetic control of courtship and visual behaviors by a protein with putative RNA-binding motifs. **Journal Neuroscience**; 1992; 12(2): 390-407.

Ritchie MG, Yate VH & Kyriacou CP. Genetic variability of the interpulse interval of courtship song among some European populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity**; 1994; 72 (Pt 5):459-464.

Ritchie MG & Kyriacou CP. Artificial selection for a courtship signal in *Drosophila melanogaster*. **Animal Behavior**; 1996; 52:603–611.

Ritchie MG, Townhill RM & Hoikkala A. Female preference for fly song: Playback experiments confirm the targets of sexual selection. **Animal Behavior**; 1998; 56(3): 713-717.

Ritchie MG, Halsey EJ & Gleason JM. *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural of Kyriacou & Hall cycles in *Drosophila Melanogaster* song. **Animal Behavior**; 1999; 58(3): 649-657.

Roces F & Manrique G. Different stridulation vibrations during sexual behavior and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Insect Physiology**; 1996; 42(3): 231-238.

Saini RK. The pattern of sound production by the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 (Diptera, Glossinidae). **Insect Science Et Applicata**, 1981; 1: 167-169.

Saini RK. Sound production associated with feeding, behaviour of the tsetse, *Glossina m. morsita*, **Entomologia Experimentalis Et Applicata**; 1983; 34: 1-8.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffman MP, Freitas RA & Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Vector Entomology**; 1998; 12: 315-317.

Satokangas P, Liimatainen JO & Hoikkala A. Songs produced by the females of the *Drosophila virilis* group of species. **Behavior Genetics**; 1994; 24(3): 263-272.

von Schilcher F. The function of pulse song and sine song in the courtship of *Drosophila melanogaster*. **Animal Behavior**; 1976; 24: 622-625.

Schilman PE, Lazzari CR & Manrique G. Comparison of disturbance stridulations in five species of triatominae bugs. **Acta Tropica**; 2001; 79(2): 171-178.

Schofield CJ. Sound production in some triatomine bugs. **Physiological Entomology**; 1977; 2: 43-52.

Shorey HH. The nature of the sound produced by *Drosophila melanogaster* during courtship. **Science**; 1962; 137: 677-678.

Smith LA, Wang XJ, Peixoto AA, Neumann EK, Hall LM & Hall JC. A *Drosophila* calcium channel  $\alpha$ -1 subunit gene maps to a genetic locus associated with behavioral and visual defects. **Journal of Neuroscience**; 1996; 16(24): 7868-7879.

Soto SI, Lehmann T, Rowton ED, Velez BID & Porter CH. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**; 2001; 18(1): 84-93.

Souza NA, Ward RD, Hamilton JGC, Kyriacou CP & Peixoto AA. Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; 2002a; 96(1): 102-103.

Souza NA, Rangel EF & Peixoto AA. Reproductive isolation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Entomología y Vectores**; 2002b 9 (supp. 1): 62.

Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP & Peixoto AA. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. **Journal of Medical Entomology**; 2004; 41(5):906-913.

Spiegel CN, Brazil RP, Santos SO & Soares MJ. Morphology of pheromone gland pores in male *Lutzomyia cruzi* insects (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 1998; 93 (Suppl.): 338

Tauber E & Eberl DF. Acoustic communication in *Drosophila*. **Behavior Processes**; 2003; 64(2): 197-210.

Uribe S. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 1999; 94(6): 729-734.

Ward RD, Ribeiro AL, Ready PR & Murtagh A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 1983; 8(3): 269-280.

Ward RD, Phillips A, Burnet B & Marcondes CB. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: **Biosystematics of Haematophagous Insects**, Service, M.W. (editor). Oxford: Oxford University Press, 1988; 258-269.

Wekesa JW, Brogdon WG, Hawley WA & Besansky NJ. Flight tone of field-collected populations of *Anopheles gambiae* an *Anopheles Arabiensis* (Diptera: Culicidae). **Physiological Entomology**; 1998; 23: 289-294.



Yamamoto D, Jallon JM & Komatsu A. Genetic dissection of sexual behavior in *Drosophila melanogaster*. **Annual review of Entomology**; 1997; 42: 551-585.

Young DG & Duncan MA. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae)**. American Entomological Institute, Associated Publishers, Gainesville, 1994.