

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

NÁDIA CONSUELO ARAGÃO

**PADRÕES DE DIVERGÊNCIA DO GENE *Period* EM
POPULAÇÕES DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) DO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL**

RECIFE - PE

2012

NÁDIA CONSUELO ARAGÃO

**PADRÕES DE DIVERGÊNCIA DO GENE PERIOD EM POPULAÇÕES
DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) DO ESTADO
DO CEARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Brisola Marcondes

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Recife, PE

2012

NÁDIA CONSUELO ARAGÃO

**PADRÕES DE DIVERGÊNCIA DO GENE *Period* EM
POPULAÇÕES DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) DO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL**

APROVADO EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Dr. Carlos Brisola Marcondes

PPGG/UFPE

1º Examinador: Dra. Rita de Cássia de Moura

PPGG/UFPE

2º Examinador: P.Ph.D Hebert Álvaro Abreu de Siqueira

PPGEA/UFRPE

Aragão, Nádia Consuelo

Padrões de divergência do gene *Period* em populações de *Lutzmyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) do Estado do Ceará, Brasil/ Nádia Consuelo Aragão– Recife: O Autor, 2012.

50 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Carlos Brisola Marcondes

Coorientador: Valdir de Queiroz Balbino

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2012.

Inclui bibliografia.

- 1. Genética de populações 2. Lutzomyia 3. Entomologia médica I. Marcondes, Carlos Brisola (orientador)II. Balbino, Valdir Queiroz (coorientador) III. Título**

576.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012- 116

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo amor, apoio, paciência, confiança e incentivo.

Ao meu querido Pablo e família por todo carinho, paciência e apoio.

Aos professores e grandes orientadores Carlos Brisola Marcondes e Valdir de Queiroz Balbino: serei eternamente grata pela oportunidade, atenção e confiança, o que aprendi com vocês ficará para sempre!

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva: Carlos, Marcus, Lidiane (amiga para todas as horas!), Moisés, Hercília, Tiago, Patrícia e Sonaly pelos ensinamentos, ajuda e amizade ao longo do curso. Especialmente agradeço ao colega César pela paciência, ajuda e ensinamentos muito válidos para conclusão este trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Genética, ao Laboratório de Genética Molecular Humana, ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva e ao Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas, todos pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco, pela viabilização desta pesquisa.

Sou grata ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e a Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio para a realização deste trabalho.

Agradeço também à FACEPE pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que ajudaram na conclusão deste curso e deste projeto agradeço sinceramente.

“No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque
ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino.

RESUMO

Lutzomyia longipalpis, principal vetor do parasito causador de Leishmaniose Visceral Americana, tem sido estudado em aspectos morfológicos, bioquímicos e genéticos para a elucidação do seu controverso status taxonômico que abrange, na verdade, não apenas uma espécie, mas um complexo de espécies. Com a análise do gene *period*, um conhecido gene envolvido no ciclo circadiano, foram encontrados polimorfismos que caracterizaram a divisão da população de *Lutzomyia longipalpis* do município de Sobral (Ceará) em duas populações (1S para uma mancha abdominal ou 2S para duas manchas). O objetivo deste trabalho foi verificar por meio do marcador *period*, os padrões de divergência genética das populações de *Lutzomyia longipalpis* encontradas em dois municípios do Estado do Ceará, Caririáçu e Sobral, que estão separados por uma distância linear aproximada de 500 km. As coletas dos insetos foram realizadas com armadilhas do tipo CDC. O DNA dos mesmos foi extraído, amplificado por meio de PCR, purificado, quantificado e sequenciado. As sequencias foram alinhadas e a estruturação genética das populações foi avaliada utilizando-se programas de bioinformática. Com a análise dos resultados, observou-se que a árvore de Evolução Mínima separou os dois morfotipos (uma e duas manchas) com valor de *bootstrap* superior a 80%, no entanto não diferenciou as populações de acordo com as localidades. Na estruturação das populações, verificou-se que há fixação de polimorfismos que separam as populações 1S e 2S em Sobral, e não foram encontrados haplótipos compartilhados entre as populações das duas localidades. Esses dados ratificam a existência de espécies crípticas de *Lutzomyia longipalpis* na localidade de Sobral e amplia esta condição ao município de Caririáçu.

Palavras-chave: complexo de espécies; genética de populações; entomologia médica

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis, major vector of visceral leishmaniasis, probably includes a species complex, and has had its morphology, biochemistry and genetics studied for understanding its controversial taxonomic status. The *period* gene, known for its involvement in circadian rhythm, was utilized to check the occurrence of polymorphisms associated to the splitting in two subpopulations of *Lutzomyia longipalpis* in Sobral (state of Ceará) (1S for one abdominal spot and 2S for two spots). Present study was developed to check genetic divergence among populations from Caririaçu and Sobral, separated by 500 km. DNA was extracted, amplified, purified and sequenced. Populations sequences were aligned and Minimal Evolution tree separated both morphotypes (one and two spots), with a *bootstrap* value higher than 80%, but did not differentiated populations according to localities. In structuration of populations, fixed polymorphisms separated 1S and 2S populations, without haplotypes shared between both localities.

Key words: complexo de espécies; genética de populações; entomologia médica

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fêmea adulta de flebotomíneo	15
Figura 2	Machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> . (a) macho com uma mancha; (b) macho com duas manchas abdominais	19
Figura 3	Resumo das informações disponíveis para os sons de corte e tipos de feromônio de 14 <i>Lutzomyia longipalpis</i> em diferentes populações do Brasil	20
Figura 4	Fotografia do gel – Sobral-CE, fragmento do gene <i>period</i>	27
Figura 5	Imagem do Staden 1.6. Elaboração da sequência consenso formado pelos primer forward e reverso Sobral-CE	27
Figura 6	Logos dos sítios informativos para parcimônia do marcador <i>period</i> nos morfotipos 1S e 2S de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , população Sobral-CE	28
Figura 7	Árvore de Mínima Evolução com a correção de Kimura-2-parâmetros observada para os morfotipos 1S e 2S de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , população Sobral-CE	29
Figura 8	Estrutura da população de <i>Lutzomyia longipalpis</i> indicando a separação dos morfotipos 1S e 2S provenientes do município de Sobral-CE	30
Figura 9	Numero de populações de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em Sobral-CE segundo metodologia <i>ad hoc</i>	30
Figura 10	Logos dos sítios informativos para parcimônia do marcador <i>period</i> nos morfotipos 1S e 2S de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , população Caririaçu-CE	31
Figura 11	Árvore de Evolução Mínima com a correção de Kimura-2-parâmetros observada para os morfotipos 1S e 2S de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , população Caririaçu-CE	32
Figura 12	Estrutura da população de <i>Lutzomyia longipalpis</i> indicando a separação dos morfotipos 1S e 2S provenientes do município de Caririaçu-CE	33
Figura 13	Gráfico gerado a partir da metodologia <i>ad hoc</i> , mostrando o número de populações de <i>Lutzomyia longipalpis</i> da localidade de Caririaçu-CE.	33
Figura 14	Logos dos sítios informativos para parcimônia do marcador <i>period</i> nos morfotipos 1S e 2S de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , populações de Caririaçu e Sobral-CE	34

- Figura 15 Árvore de Evolução Mínima com a correção de Kimura-2-parâmetros 35
observada para os morfotipos 1S e 2S de *Lutzomyia longipalpis*, localidades
Sobral e Caririaçu-CE.
- Figura 16 Estrutura da população de *Lutzomyia longipalpis* indicando a separação dos 36
morfotipos 1S e 2S provenientes dos municípios de Sobral e Caririaçu-CE
- Figura 17 Número de populações de *Lutzomyia longipalpis* em Sobral e Caririaçu-CE 36
segundo metodologia *ad hoc*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Sigla	Definição
1S	Fenótipo de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com uma mancha no tergito abdominal
2S	Fenótipo de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com duas manchas no tergito abdominal
C	Citosona
<i>Fst</i>	Índice de Fixação
<i>I</i>	Proporção de sítios invariáveis
<i>K</i>	Número de populações utilizado no STRUCTURE
Mm	Milímetros
μm	Micrômetro
<i>PB</i>	Pares de base
SNP	Polimorfismo de base única
T	Timina
Thr-Gly	Região repetitiva dos aminoácidos treonina e glicina
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Flebotomíneos	15
2.2 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	17
2.2.1 O complexo de Espécies <i>Lutzomyia longipalpis</i>	18
2.3 O gene <i>period</i>	21
2.4 Método Structure e o complexo de espécies: estruturação genética de populações	22
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

Lutzomyia longipalpis (LUTZ e NEIVA, 1912) é um díptero pertencente à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae. Tem ampla distribuição no continente americano e neste também é considerado o principal vetor do parasito causador da leishmaniose visceral.

Desde a década de 1960, a partir de divergências morfológicas detectadas entre exemplares coletados nos Estados do Ceará e do Pará, no Brasil, a possibilidade desta espécie estar nominando um complexo de espécies-irmãs, ao invés de uma única espécie intriga pesquisadores das diversas áreas que estudam este organismo.

Várias formas de abordagens já foram utilizadas para elucidar esta questão taxonômica, tais quais: análise de fragmentos gênicos, constituição de feromônios para a atração sexual, estudos de sons de corte, entre outros, no entanto até agora apenas uma das espécies-irmãs desse complexo, *Lutzomyia pseudolongipalpis* Arrivillaga e Feliciangeli, 2001, encontrada na Venezuela, foi devidamente descrita e nominada.

Pesquisadores, principalmente embasados por estudos sobre sons de corte defendem que quatro espécies pertencentes ao complexo são encontradas no Brasil, mas além dessas, outra espécie distinta, *Lutzomyia cruzi* (MANGABEIRA, 1938), bastante semelhante à *Lutzomyia longipalpis*, recentemente também foi indicada como espécie-irmã do complexo.

Nas pesquisas até o momento realizadas, foi notória a presença de duas espécies-irmãs simpátricas no Município de Sobral, Ceará, que apresentam divergências significativas em todos os caracteres analisados e vários estudiosos concordam que existem evidências suficientes para que estas espécies sejam nominadas.

A análise do gene *period*, um conhecido gene envolvido no ciclo circadiano, detectou variações de polimorfismos que caracterizaram a divisão da população de *Lutzomyia longipalpis* encontrada em Sobral em duas populações distintas (1S para uma mancha abdominal e 2S para duas manchas), mas até este momento não existiam relatos sobre a utilização do software Structure 2.3 (PRITCHARD, 2000) para verificar a estruturação genética dessas populações nem havia sido observada a fixação de polimorfismos nesse gene para estas espécies.

Com base na análise de um fragmento com 520 pares de bases do gene *period*, este trabalho vem demonstrar que o padrão de separação das espécies de *Lutzomyia longipalpis* existentes em Sobral se estende para além dos limites desse município, pois também se aplica aos exemplares encontrados no município de Caririaçu que está localizado a aproximadamente 500 km de distância linear de Sobral. Além disso, apresenta, pela primeira vez, a análise da estruturação genética dessas populações com o software Structure e a detecção da fixação de polimorfismos neste fragmento do gene *period* para espécies-irmãs de *Lutzomyia longipalpis* encontradas na localidade de Sobral, Ceará.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Flebotomíneos

A subfamília Phlebotominae agrupa dípteros da família Psychodidae com aproximadamente 2 a 3 mm, corpo e asas densamente pilosos, eixo da cabeça e abdome formando ângulo de 90°, antenas com 14 flagelômeros cilíndricos e probóscida com comprimento idêntico ao da cabeça (Figura 1) (MARCONDES, 2011).



Figura 1: Fêmea adulta de flebotomíneo. Fonte: OMS (<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library>). Acesso em 16/01/2012.

Por abranger vetores dos agentes etiológicos de doenças humanas e de animais, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanosomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e numerosos arbovírus, os flebotomíneos possuem grande importância médico-veterinária (FORATTINI, 1973).

Os insetos da subfamília Phlebotominae são comumente distribuídos em seis gêneros, sendo três encontrados no Velho Mundo - *Phlebotomus* Rondani, 1840; *Sergentomyia* França e Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987- e três no Novo Mundo - *Brumptomyia* França e Parrot, 1921, *Lutzomyia* França, 1924 e *Warileya* Hertig, 1984 (YOUNG e DUNCAN 1994); foi proposta uma distribuição por 31 gêneros (RISPAIL et al., 1998; GALATI, 2003), que vem sendo progressivamente aceita por especialistas

(MARCONDES, 2011). O gênero *Lutzomyia* é composto por cerca de 430 espécies, das quais aproximadamente 70 foram incriminadas como transmissoras ou suspeitas na transmissão de *Leishmania*. (YOUNG e DUNCAN, 1994; MARCONDES, 2011).

Os flebotomíneos são holometábolos e depositam algumas dezenas de ovos elípticos, com 300 a 500 µm de comprimento, isoladamente. A oviposição ocorre na terra úmida com bastante matéria orgânica e à sombra, onde, entre quatro e dez dias, eclodem as larvas. Estas são claras e vermiformes, com a cápsula cefálica escura e bem esclerotizada, apresentam um par de cerdas na parte posterior do corpo no primeiro instar, e nos três demais instares, as larvas do gênero *Lutzomyia*, apresentam quatro cerdas; esta fase dura 30 a 60 dias. As pupas têm o corpo constituído de cefalotórax e abdome e a duração deste estágio pode variar de 20 a 40 dias. O ciclo completo acontece em aproximadamente um a dois meses ou até mais, se ocorrer diapausa (MARCONDES, 2011).

Na fase larval, esses animais são saprófagos. Já na fase adulta alimentam-se de excreções de afídeos (por conter substância açucarada) e seiva de vegetais. Somente as fêmeas são hematófagas (estas utilizam o sangue para a maturação dos ovos); no entanto há observações a respeito de algumas populações ou linhagens neotropicais autógenas, de espécies que têm preferência por hospedeiros (por exemplo, espécies do gênero *Brumptomyia* são zoofílicas e têm preferência por tatus) e de espécies ecléticas e oportunistas como o *Lutzomyia longipalpis* (FORATTINI, 1973; LANE, 1986; MONTOYA-LERMA, 1992; MARCONDES, 2001; BRASIL e BRASIL, 2003; ALVES et al., 2011).

A saliva desses insetos possui ação vasodilatadora, anti-inflamatória, anti-histamínica e imunomoduladora, entre outras, que facilitam a alimentação sanguínea no hospedeiro vertebrado, além disso, aumenta a infectividade da *Leishmania* pela inibição da apresentação de antígenos pelos macrófagos às células T (SOARES e TURCO, 2003).

Os flebotomíneos são encontrados em todo o Brasil nos mais diversos ecótopos, e as alterações ambientais, tais como o desmatamento podem alterar significativamente a composição e a adaptação desses insetos em uma determinada área, modificando o perfil epidemiológico desta e contribuindo para a emergência ou reemergência dos patógenos transmitidos por esses vetores (TEODORO, 1999; AGUIAR e MEDEIROS, 2003; MISSAWA e LIMA, 2006; CUTOLO e VON-ZUBEN, 2008; DANTAS-TORRES et al., 2010).

2.2 *Lutzomyia longipalpis*

Lutzomyia longipalpis foi identificado por Lutz e Neiva no ano de 1912, em uma localidade incerta no Brasil. Está classificado na ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. É caracterizado pela presença, nos machos, de quatro espinhos nos gonóstilos, e de cerdas dorsais curvas, em forma de chifre de antílope, nos parâmeros; já nas fêmeas, as espermatecas são menores, cilíndricas e levemente enrugadas, com comprimento cerca de quatro vezes maior do que sua largura (YOUNG e DUNCAN, 1994; LAINSON e RANGEL, 2003).

Esse flebotomíneo é encontrado em áreas onde há transmissão do tripanossomatídeo *Leishmania infantum chagasi*, principal causador da leishmaniose visceral, doença parasitária com grande importância para a saúde pública mundial, e é considerado o principal vetor desta doença nas Américas; o Brasil concentra cerca de 90% dos casos humanos registrados no Novo Mundo (LAINSON e RANGEL, 2005; MAIA-ELKHOURY, 2008; OMS, 2011).

De acordo com Lainson e Rangel (2003), o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi associado à transmissão deste parasito na década de 1930, no Estado de Sergipe, durante a investigação dos primeiros casos diagnosticados desta enfermidade no Brasil, pois era o inseto hematófago mais abundante no intra e no peridomicílio do primeiro paciente diagnosticado em vida portando leishmaniose visceral.

Na década de 50, o casal Leônidas e Maria Deane, juntamente com Joaquim Eduardo Alencar, conseguiu observar a infecção natural e experimental do flebotomíneo com “promastigotas flagelados” e a infecção natural de raposas e de cães. Perceberam também que a infecção no inseto era facilmente observada quando este era alimentado com cães infectados, sugerindo que o principal reservatório para a doença humana poderia ser o cão (LAINSON et al., 1977; LAINSON e RANGEL, 2003).

No entanto, somente em 1977, LAINSON et al. conseguiram definitivamente provar, por meio de infecção experimental no inseto e em *hamsters*, que *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor do parasito causador da Leishmaniose Visceral Americana, devido a sua capacidade de se infectar com a *Leishmania*, de disseminá-la e pela sua ampla distribuição.

Atualmente, este inseto é encontrado nas Américas Central e do Sul nos seguintes países: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Honduras, México, Nicarágua,

Panamá, Paraguai e Venezuela. No Brasil, está presente nas cinco regiões em que o país está dividido, não havendo registro de sua presença apenas nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Paraná e Santa Catarina (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; SOUZA et al., 2009; CARRANZA-TAMAYO et al., 2010). Recentemente, foram observados casos caninos autóctones, de transmissão ainda mal esclarecida, na Ilha de Santa Catarina (dados não publicados).

Há registros deste inseto nos biomas: Floresta Amazônica, com áreas de transição para o Cerrado e o Pantanal, Cerrado, Floresta Atlântica e Caatinga (MISSAWA e LIMA, 2006; CUTOLO e VON-ZUBEN, 2008; DANTAS-TORRES et al., 2010). Deane e Deane (1957) relataram que no "sertão" semi-árido o *Lutzomyia longipalpis* foi coletado em maior densidade nos sopés das serras e estreitos vales entre estas, conhecidos localmente por "pés-de-serra" e "boqueirões".

Troncos de árvores e raízes tubulares, ocos de árvores, entre pedras, fendas nas rochas, grutas, anexo de animais domésticos (galinheiro, chiqueiros e currais, entre outros), além das paredes externas e internas de domicílios são os criadouros onde *Lutzomyia longipalpis* já foi naturalmente encontrado (DEANE e DEANE, 1957; AGUIAR e MEDEIROS, 2003).

Nos últimos anos, vem se observando a urbanização desse vetor representada pela crescente expansão dos casos autóctones de Leishmaniose Visceral nos grandes centros urbanos tais quais Teresina, no Piauí e Belo Horizonte, em Minas Gerais (BEVILAQUA et al., 2001; COSTA, 2008; RANGEL e VILELA, 2008). AGUIAR e MEDEIROS (2003) classificaram *Lutzomyia longipalpis* como uma espécie em adiantado processo de domiciliação e com grande adaptação aos ambientes modificados pelo homem.

2.2.1 O complexo de espécies *Lutzomyia longipalpis*

As barreiras climáticas e geográficas existentes no Continente Americano, associadas à baixa capacidade de vôo dos flebotomíneos tornam não uniforme a distribuição do *Lutzomyia longipalpis* ao longo deste continente e podem ocasionar um importante grau de isolamento geográfico entre as populações deste inseto. As diferenças locais a que essas populações estão submetidas ao longo do tempo poderiam estabelecer condições ideais para o surgimento de um complexo de espécies, capazes de

diferir na sua capacidade de transmissão da *Leshmania chagasi* (ALEXANDER 1987; LANZARO *et al.* 1993; SOARES e TURCO, 2003).

As primeiras evidências que sugeriram que *Lutzomyia longipalpis* poderia ser, na verdade, um complexo de espécies partiram da investigação de divergências morfológicas relativas ao número de manchas abdominais (Figura 2), detectadas no final da década de 60, em populações do Estado do Ceará e do Pará (MANGABEIRA *et al.*, 1969). Depois deste evento, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para elucidar esta questão (BAUZER *et al.*, 2007).

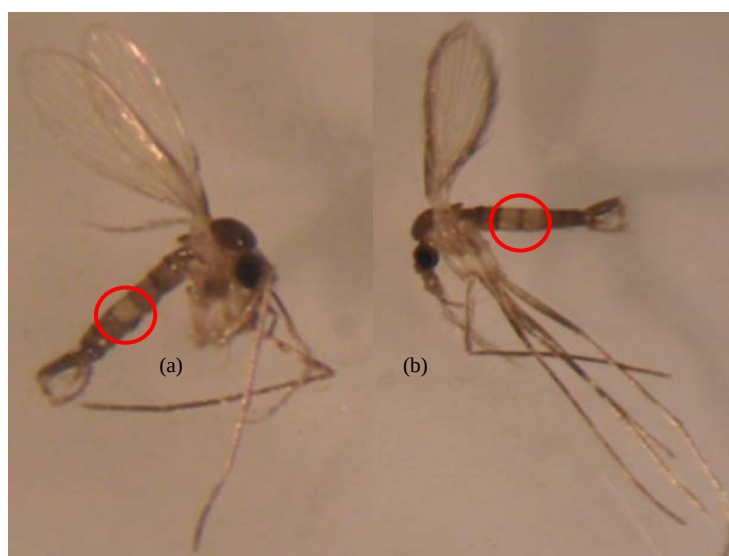


Figura 2: Machos de *Lutzomyia longipalpis*. (a) macho com uma mancha; (b) macho com duas manchas abdominais. (Fonte: ARAGÃO, N.C. e COSTA-JÚNIOR, C.R.L.)

Na década de 1980, começaram a ser descritos os primeiros testes sobre o isolamento reprodutivo entre diferentes populações brasileiras com uma e duas manchas abdominais e sobre a distribuição geográfica desses exemplares. Também neste período foram conduzidas investigações micromorfológicas que sugeriram que as manchas estavam possivelmente relacionadas a liberação de feromônios, os primeiros testes com isoenzimas e os primeiros registros dos sons de corte do *Lutzomyia longipalpis*. A maioria desses estudos apresentou conclusões que direcionavam para a existência de um complexo de espécies, com exceção da técnica de isoenzima que apontava para a existência de apenas uma espécie bastante diversa (WARD *et al.*, 1983; LANE e WARD, 1984; WARD *et al.*, 1985; BONNEFOY *et al.*, 1986).

A partir dessa base de informações, ao longo das décadas subseqüentes, confirmações e negações do complexo *longipalpis* foram realizadas por meio das mais variadas técnicas, verificando a existência e a extensão dessa condição às Américas do Sul e Central (ARRIVILLAGA et al., 2003; BAUZER et al., 2007; LINS et al., 2008; ARAKI et al, 2009).

A primeira espécie do complexo a ser nominada foi *Lutzomyia pseudolongipalpis*, da Venezuela, em estudos que envolveram genes mitocondriais e caracteres morfológicos, etológicos e reprodutivos (ARRIVILLAGA e FELIGIANGELI, 2001); hoje já estão identificadas três populações endêmicas neste país (ARRIVILLAGA e MARRERO, 2009).

Araki et al. (2009) revisaram os dados a respeito das populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* e acrescentaram novas informações à literatura existente, analisando simultaneamente um fragmento do gene *period*, padrões de sons de corte e tipos de feromônio, com isso sugeriram que a separação das espécies crípticas está basicamente associada aos padrões de sons de corte (Figura 3) e concluíram que no Brasil existem, pelo menos, quatro populações distintas.

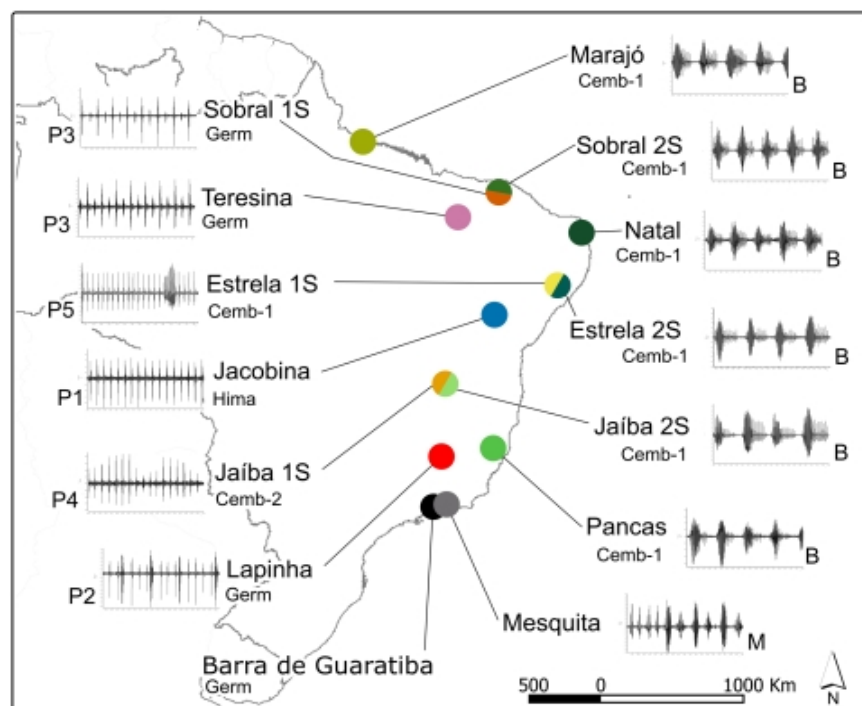


Figura 3. Resumo das informações disponíveis para os sons de corte e tipos de feromônio de 14 *Lutzomyia longipalpis* em diferentes populações do Brasil (ARAKI et.al.,2009)

A sugestão de que *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938), redescrita por Martins et al. (1984), seria mais uma espécie a fazer parte do complexo *L. longipalpis* surgiu após as análises do gene *period* e de sons de corte, em que foram encontradas similaridades compatíveis àquelas encontradas nas espécies irmãs do complexo (VIGODER et al., 2010). As fêmeas desses flebotomíneos são indistinguíveis das fêmeas de *L. longipalpis* e os machos apresentam apenas pequenas divergências na genitália. Além disso, as análises de microssatélites mostraram que o nível de divergência também é similar ao das espécies-irmãs. *L. cruzi* também está relacionado à transmissão do parasito transmissor da Leishmaniose Visceral Americana no Brasil em áreas onde o *L. longipalpis* não foi encontrado (YOUNG e DUNCAN, 1994; WATTS et al., 2005; VIGODER et al., 2010).

Nos estudos desenvolvidos observou-se, também, que no município de Sobral, no Estado do Ceará, duas espécies-irmãs simpátricas podem ser discernidas pelos caracteres fenotípicos primariamente diagnosticados (machos com uma e duas manchas abdominais), por meios moleculares (genes *period* e *paralytic*, existindo, neste último, fixação de polimorfismos não sinônimos), por meios bioquímicos (os machos que apresentam uma mancha abdominal possuem feromônios sexuais do tipo cembreno 1, enquanto os que possuem duas manchas apresentam o tipo germanocreno), pelo padrão dos sons de corte (A frequência dos sons dos machos 1S é do tipo Pulso três, e a dos 2S é explosão), além de demonstrarem um importante isolamento reprodutivo (WARD et al., 1983; BAUZER et al., 2002; LINS et al., 2008; ARAKI, 2009).

Alguns pesquisadores defendem que já existem evidências suficientes para nominar essas espécies irmãs (BRANDÃO-FILHO et al., 2009) e este seria um grande passo para a entomologia médica e a vigilância entomológica, pois a correta identificação de flebotomíneos evita possíveis confusões no reconhecimento das espécies vetoras e não vetoras (MARCONDES, 1998) e o monitoramento das espécies que fazem parte desse complexo, sua localização e biologia são de extrema importância para uma melhor compreensão sobre a epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil.

2.3 O gene *period*

O ritmo circadiano é influenciado tanto por variáveis ambientais quanto pela disponibilidade de alimento, que condicionam o organismo para as diferentes mudanças

fisiológicas, modulando reações enzimáticas específicas (RUSAK *et al*, 1993, SHIRASU *et al.*, 2003).

O gene nuclear *period* codifica um cofator de transcrição envolvido no relógio biológico e foi identificado por Konopka e Benzer (1971), a partir da detecção dos mutantes *per^o*, *per^s* e *per^L* que alteram a duração desse ciclo, provocando ciclos arrítmicos, ciclos curtos (16h) e ciclos longos (29h), respectivamente (KONOPKA e BENZER, 1971; MÜLLER, 2009).

Em *Drosophila melanogaster*, este gene tem um tamanho aproximado de 3,6 kb, apresenta apenas um íntron com mais de 50 pb e transcreve um polipeptídeo com aproximadamente 1200 aminoácidos. Este gene possui uma elevada taxa de substituições, que o torna um gene de evolução rápida e o destaca, nesse critério, dos outros genes nucleares que possuem taxas de evolução mais lentas. Dessa forma, seu uso é indicado para a reconstrução filogenética de táxons abaixo do nível de família, como sugerido por Regier *et al.* (1998), em estudo sobre a ordem Lepidoptera.

A proteína *period* funciona em um sistema de retro-alimentação que regula sua transcrição, possui importantes regiões bem conservadas PAS-A, CLD e C-Domain e a região altamente variável Thr-Gly, estando esta última está relacionada a termoestabilidade do comportamento circadiano. Quando estas regiões sofrem mutações, podem provocar alterações no ritmo dos sons de corte (KONOPKA e BENZER, 1971; MÜLLER, 2009), o que torna este gene interessante para tratar de diferenças espécie-específicas entre as espécies irmãs que compõe o complexo longipalpis, uma vez que a separação das espécies crípticas brasileiras, de acordo com ARAKI *et al.* (2009), estão basicamente associadas aos padrões de sons de corte.

2.4 Método *Structure* e o complexo de espécies: estruturação genética de populações.

Algoritmos de agrupamento de dados genéticos tornaram-se uma ferramenta importante em campos da biologia, incluindo a conservação e genética populacional (DAWSON e BELKHIR, 2001; CORANDER *et al.*, 2003; CORANDER e MARTTINEN, 2003; PURCELL e SHAM 2004; FRANCOIS *et al.*, 2006; PATTERSON *et al.*, 2006). Tais métodos são muitas vezes utilizados para compreender a estrutura das populações, bem

como para identificar indivíduos migrantes ou híbridos, como também são usados para detectar a estrutura populacional críptica (HUBISZ et al., 2009).

O STRUCTURE é um algoritmo bayesiano baseado em um modelo que é amplamente utilizado para o agrupamento de dados genéticos (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003; FALUSH et al., 2007). Dado o número de clusters (K) e assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a articulação do equilíbrio dentro de grupos, este algoritmo estima as frequências dos alelos em cada grupo e as associações das populações para cada indivíduo. Ele usa o método Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) para integrar um conjunto de parâmetros e fazer atribuições de agrupamento. Embora o valor de K tenha que ser fornecido para o algoritmo, um método heurístico de seleção K é frequentemente utilizado, baseando-se na comparação de probabilidades (HUBISZ et al., 2009).

Apesar de ainda não ter sido empregado para o estudo de populações de *Lutzomyia longipalpis*, o algoritmo STRUCTURE é largamente utilizado com o objetivo de esclarecer a problemática taxonômica em espécies crípticas. Boyd (2007) aplicou esta metodologia com o intuito de determinar a composição dos membros do complexo de *Anopheles annulipes* em populações de Townsville, Nordeste da Austrália, revelando a existência de quatro grupos populacionais vivendo em simpatria; outro exemplo consistiu no emprego do Δk (ad hoc) na estruturação do complexo *Culex pipiens*, que apontou a existência de três grupos definidos (FONSECA et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar, por meio de polimorfismos do marcador *period*, os padrões de divergência genética em duas populações de *Lutzomyia longipalpis* do Estado do Ceará.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar, por meio da análise do gene *period*, o status que caracteriza como espécies distintas os morfotipos de *Lutzomyia longipalpis* com uma e duas manchas, provenientes do município de Sobral, Ceará;
- Comparar as populações de uma e duas manchas encontradas nos municípios de Caririaçu e Sobral para verificar se as mesmas apresentam padrões de polimorfismos semelhantes e estão geneticamente isoladas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em setembro de 2008 e agosto de 2009 nas localidades de Caririaçu (07°02'31" S 39°17'02" W, área: 637.353 Km², altitude: 715M) e Sobral (3°41'15"S 40°21'5" W, área: 2. 122. 885 Km², altitude: 69m), ambas inseridas em bioma de caatinga e situadas no Estado do Ceará, Brasil. As capturas tiveram duração de três dias consecutivos e os espécimes foram coletados por meio de armadilhas luminosas tipo CDC. Em seguida os exemplares de *Lutzomyia longipalpis* foram identificados, separados quanto ao sexo e número de manchas abdominais e posteriormente, acondicionados individualmente em álcool 70% para a extração do DNA.

A extração do DNA desses flebotomíneos foi realizada segundo um protocolo padronizado à base de Chelex 5%, que consiste nas seguintes etapas: macerar a amostra em tubo plástico tipo eppendorf (1,5 ml) contendo 100µl de Chelex® (BIORAD); em seguida incubar as amostras à 55°C por 1 hora, imediatamente após incubar à 94°C por 30 minutos, centrifugar a 13.000 RPM por 6 minutos e estocar o sobrenadante a -4°C.

Depois de extraído, o DNA foi quantificado (espectrofotômetro NanoVue) e submetidos a amplificação do marcador *period* com *primers* (F: 5'–AGCATCCTTTTGTAGCAAAC– 3'; R: 5' – TCAGATGAACTCTTGCTGTC – 3') descritos por Mazzoni et al. (2002) que amplifica uma região do gene *period* contendo cerca de 540 pares de bases.

Em seguida, este fragmento foi sequenciado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e no Laboratório Central CCB/UFPE, aos quais foram encaminhadas 89 amostras do DNA amplificado para o marcador *period* (41 amostras de exemplares 1S e 48 do tipo 2S), e alíquotas dos mesmos *primers* diluídos a 3,2 pmol/µl. Foram geradas sequências consenso com base nos valores de *Phred* 20, através do programa Staden 1.6 (STANDEN, 1996). As sequências foram alinhadas e em seguida foram aferidas as árvores de Mínima Evolução com a correção de Kimura-2-parâmetros, para cada localidade, no programa MEGA5 (TAMURA, 2011).

Com a finalidade de facilitar a visualização dos sítios variáveis, foram gerados logos de sequência para as duas populações através do programa Weblogo 3.0 (CROOKS, 2004).

A estruturação genética das populações de *Lutzomyia longipalpis* foi verificada utilizando-se o software Structure 2.3 (PRITCHARD, 2000), que se baseia num algoritmo

de agrupamento bayesiano para estimar a probabilidade de um indivíduo fazer parte de uma dada população. Foi utilizado um período de aquecimento de 20000 interações seguido por 200000 interações de Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC), repetindo este procedimento para cada número “K” de populações (ajustado de 1 a 10). Para determinar o número de grupos “K”, foi utilizada a quantidade ad hoc ΔK segundo Evanno e colaboradores.

5. RESULTADOS

As análises preliminares do sequenciamento das amostras coletadas em 2008 para a localidade de Sobral resultou em 45 sequências de aproximadamente 525 *pb* de boa qualidade. O tamanho do fragmento final foi diferente das amostras da primeira amplificação (Figura 04) devido à remoção dos nucleotídeos que exibiram valores de *Phred* inferior a 20 (Figura 05).

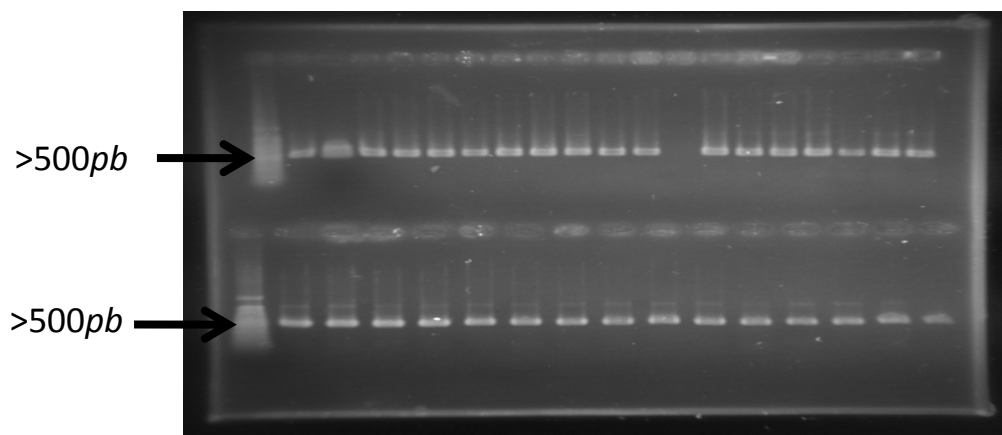


Figura 04: Fotografia do gel – Sobral-CE, fragmento do gene *period*. O primeiro poço na metade superior e na metade inferior refere-se ao marcador de 100 pares de bases. Os demais poços correspondem ao amplicon do gene *period* de *Lutzomyia longipalpis* com tamanho esperado de aproximadamente 540 pares de bases.



Figura 05: Imagem do Staden 1.6. Elaboração da sequência consenso formado pelos primer forward e reverso Sobral-CE.

A população de Sobral neste estudo está representada por 45 exemplares, compostos de 24 amostras do morfotipo 1S e 21 do morfotipo 2S. O conjunto de dados apresentou 525 pares de base (*pb*), em que 85 *pb* foram polimórficos e destes apenas 67 foram informativos para parcimônia. A análise dos logos dos sítios informativos para parcimônia revelou dois polimorfismos de base única (SNP) separando as duas formas fenotípicas (figura 04). No sítio 124 pertencente a um *exon* do gene *period* as sequências do morfotipo com uma mancha apresentam uma timina (T), por outro lado, no morfotipo com duas manchas aparece uma citosina (C). O segundo SNP informativo para separação dos dois fenótipos é o 171, localizado no *intron*. Já no sítio 424 há uma fixação de polimorfismo para os morfotipos 2S onde há uma C. No entanto, percebe-se que nos dados formados pelo conjunto dos morfotipos 1S existe uma frequência maior para a base T (Figura 06).

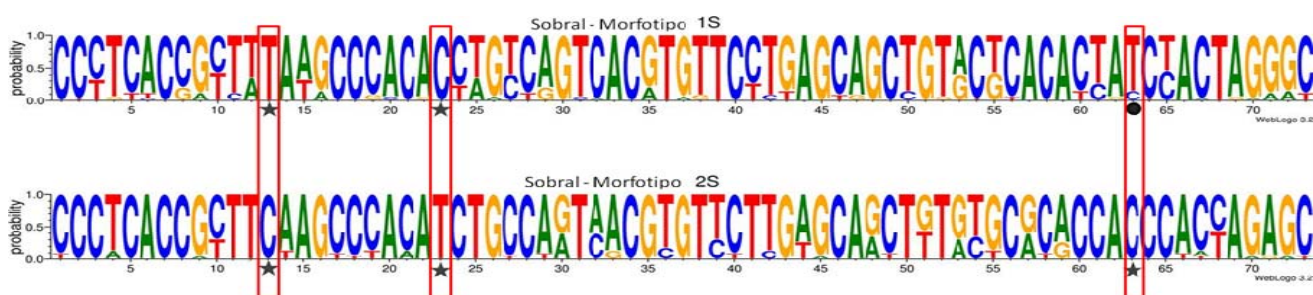


Figura 06: Logos dos sítios informativos para parcimônia do marcador *period* nos morfotipos 1S e 2S de *Lutzomyia longipalpis*, população Sobral-CE. Indicação dos sítios polimórficos em que a fixação de polimorfismo separa as duas formas fenotípicas. As marcações em estrela representam os sítios 124, 171 e 424, já a marcação em círculo representa fixação parcial do polimorfismo.

A árvore aferida através da Evolução Mínima separou os morfotipos com valores de bootstrap de 66% para o clado formado com as sequências pertencentes a 1S e 91% para o clado formado por 2S (Figura 07). As análises de estruturação genética foram realizadas com as mesmas populações acima descritas e os resultados obtidos identificaram dois grupos genéticos associados aos fenótipos 1S e 2S tanto pela metodologia STRUCTURE quanto pelo método *ad hoc* conforme as figuras (Figuras 08 e 09).

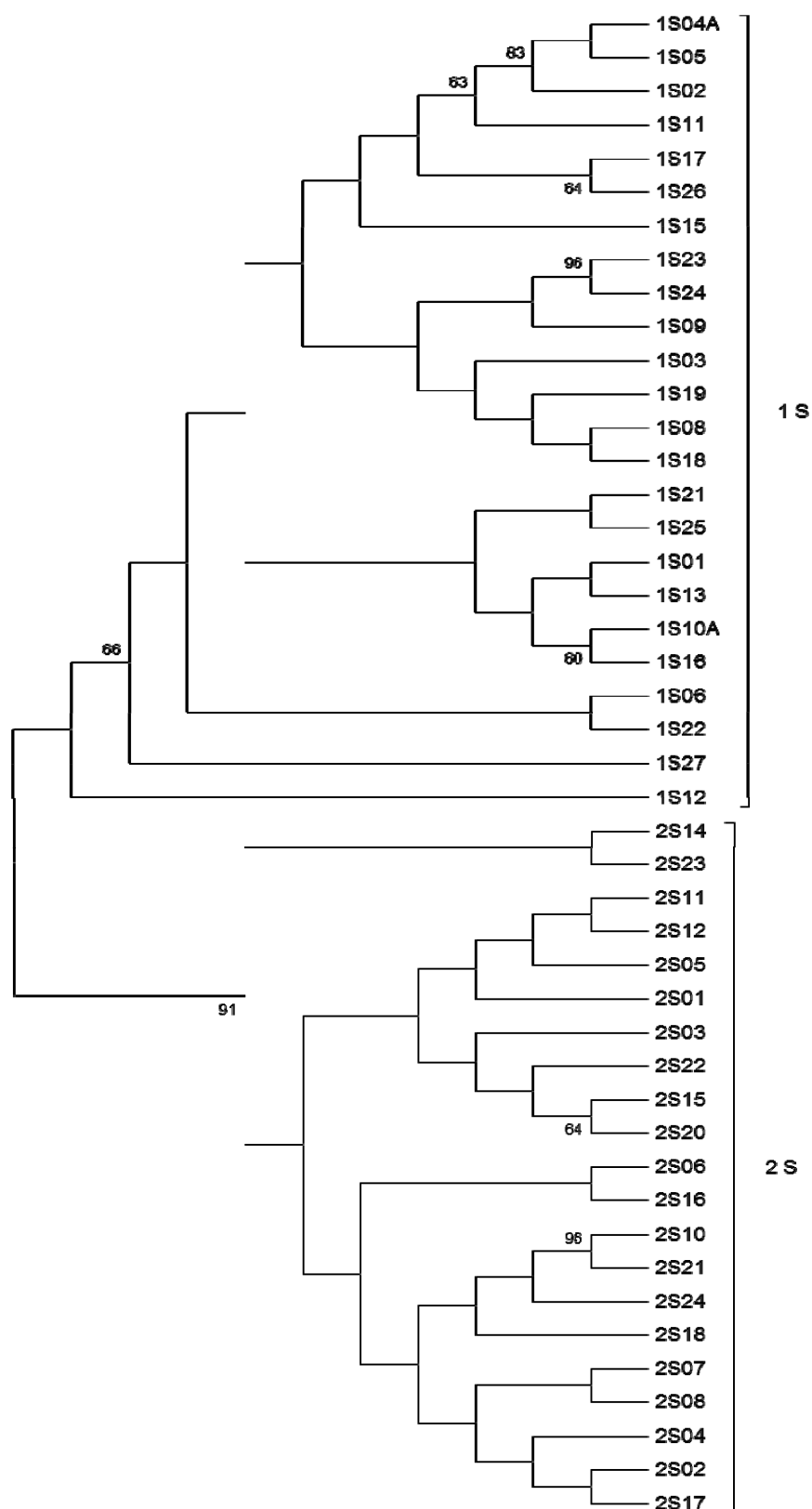


Figura 07: Árvore de Mínima Evolução com a correção de Kimura-2-parâmetros observada para os morfotipos 1S e 2S de *Lutzomyia longipalpis*, população Sobral-CE. Nota-se que esta topologia conseguiu separar de forma consistente as duas variantes morfológicas.

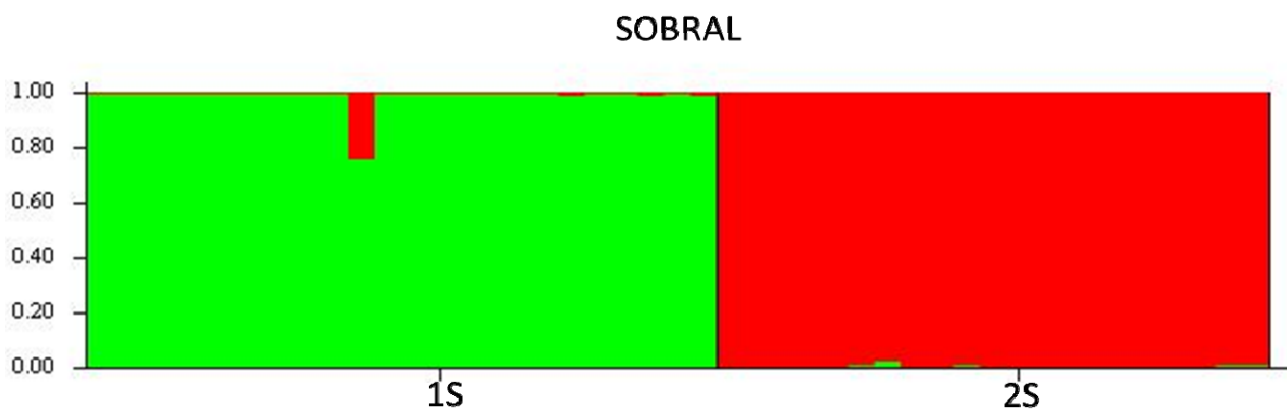


Figura 08: Estrutura da população de *Lutzomyia longipalpis* indicando a separação dos morfotipos 1S e 2S provenientes do município de Sobral-CE. Distribuição de Q de cada indivíduo para cada grupo. Cada indivíduo é representado por uma única linha vertical dividida em K cores, o tamanho do segmento colorido indica o grau de parentesco de cada indivíduo àquele grupo. As indicações das populações 1S e 2S aparece na parte inferior do gráfico.

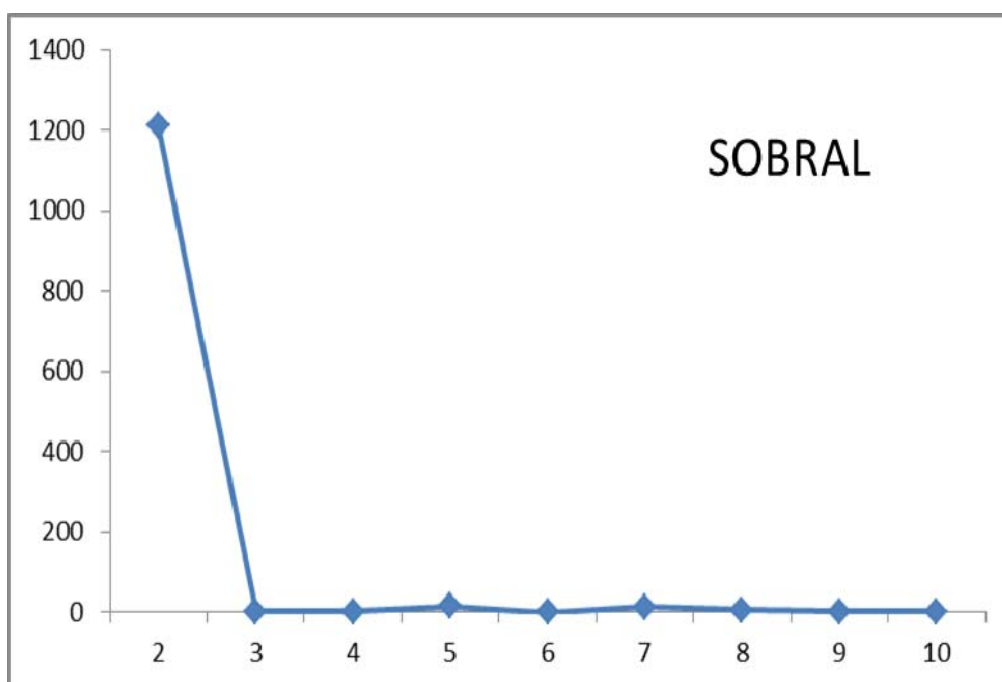


Figura 09: Numero de populações de *Lutzomyia longipalpis* em Sobral-CE segundo metodologia *ad hoc*. O pico demonstra o número de populações.

Para a população de Caririaçu, o conjunto de dados foi composto por 48 sequências do marcador *period* (18 do morfotipo 1S e 30 do 2S) e apresentou 525 pb; destes, 81 sítios foram polimórficos, dentre os quais apenas 51 apresentaram-se informativos para parcimônia. Neste conjunto de dados também foi detectada a presença de três SNPs que separam os morfotipos 1S e 2S. O primeiro localizado no exon 1 (sítio 124) em que as variantes 1S possuem uma T e a variante 2S possui uma C, o segundo SNP está localizado no sítio 17, em que o morfotipo 1S apresenta uma C e o 2S uma T e o terceiro, no sítio 424 no exon 2 em que o morfotipo 1S apresenta uma T e o morfotipo 2S apresenta uma C (Figura 10). Todas estas substituições são sinônimas em que não há mudança de aminoácido.

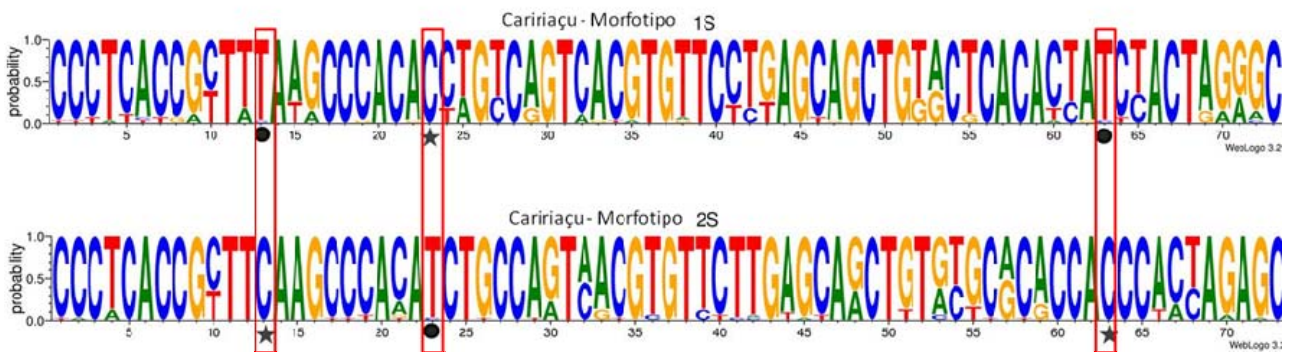


Figura 10: Logos dos sítios informativos para parcimônia do marcador *period* nos morfotipos 1S e 2S de *Lutzomyia longipalpis*, população Caririaçu-CE. Indicação dos sítios polimórficos em que a fixação de polimorfismo separa as duas formas fenotípicas. As marcações em estrela representam os sítios fixados e as marcações em círculos representam as fixações parciais dos sítios 124, 171 e 424.

O dendrograma aferido através do algoritmo de Evolução Mínima com a correção de Kimura-2-parâmetros apresentou uma topologia em que apenas o fenótipo 2S foi separado com 90% de bootstrap (Figura 11). Os métodos de estruturação populacional (STRUCTURE e *ad hoc*) também identificaram duas populações genéticas de *Lutzomyia longipalpis* para a localidade de Caririaçu (figuras 12 e 13)

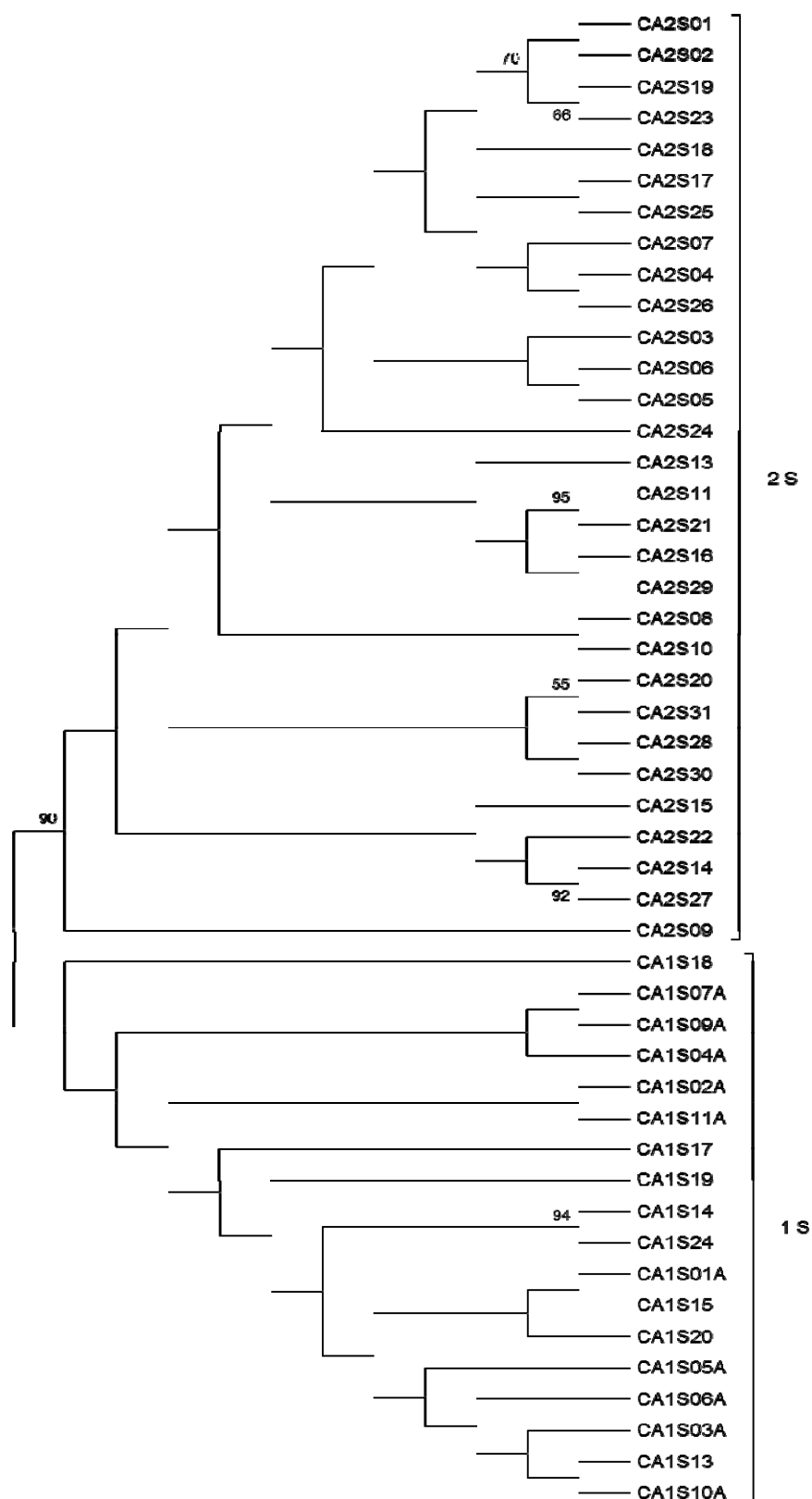


Figura 11: Árvore de Evolução Mínima com a correção de Kimura-2-parâmetros observada para os morfotipos 1S e 2S de *Lutzomyia longipalpis*, população Caririaçu-CE. Nota-se que esta topologia conseguiu separar de forma consistente as duas variantes morfológicas.

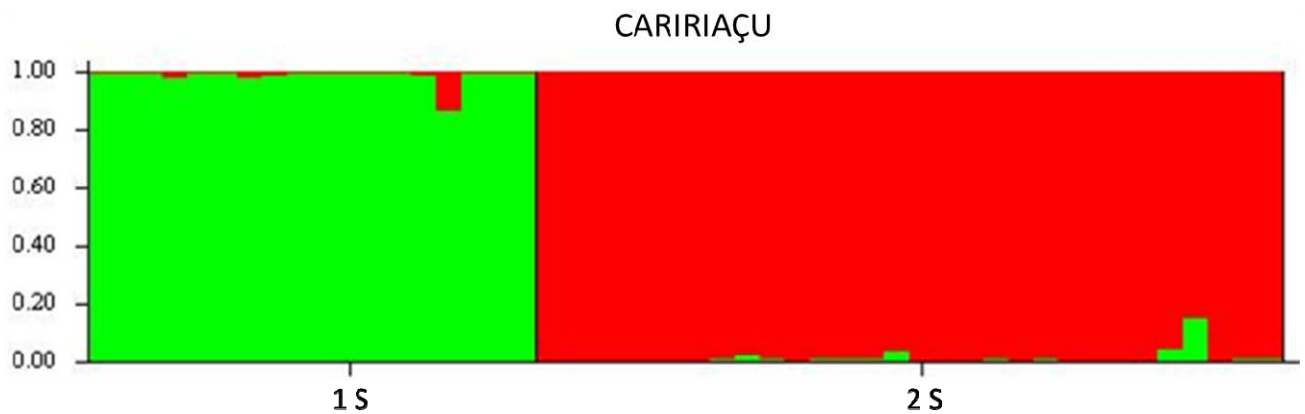


Figura 12: Estrutura da população de *Lutzomyia longipalpis* indicando a separação dos morfotipos 1S e 2S provenientes do município de Caririaçu-CE. Distribuição de Q de cada indivíduo para cada grupo. Cada indivíduo é representado por uma única linha vertical dividida em K cores, o tamanho do segmento colorido indica o grau de parentesco de cada indivíduo àquele grupo. As indicações das populações 1S e 2S aparece na parte inferior do gráfico.

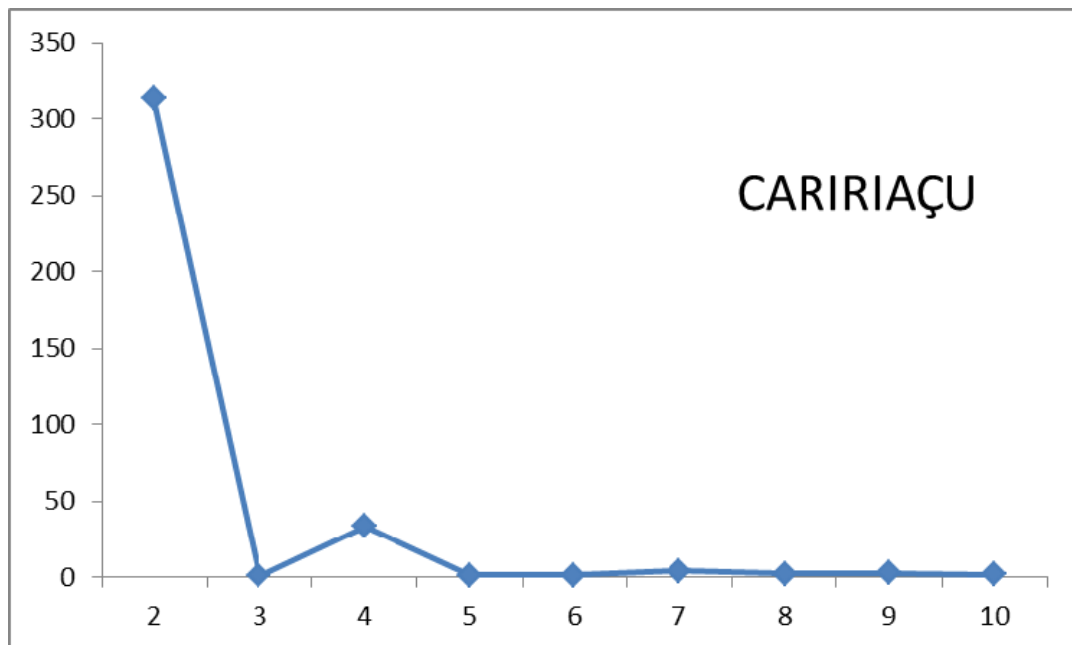


Figura 13: Numero de populações de *Lutzomyia longipalpis* em Caririaçu-CE segundo metodologia *ad hoc*. O pico demonstra o número de populações.

Os resultados obtidos da união das duas populações apresentou um conjunto de dados com 525 *pb*, dentre os quais 102 sítios são polimórficos e apenas 74 são informativos para a parcimônia. A análise dos Logos destes sítios não revelou nenhum polimorfismo que individualizasse as duas localidades, entretanto, mostrou que apenas um SNP (sítio 124) que separa os dois morfotipos é comum nas duas localidades. Já os outros SNPs possuem frequência alta nas localidades em que não estão fixados (figura 12).

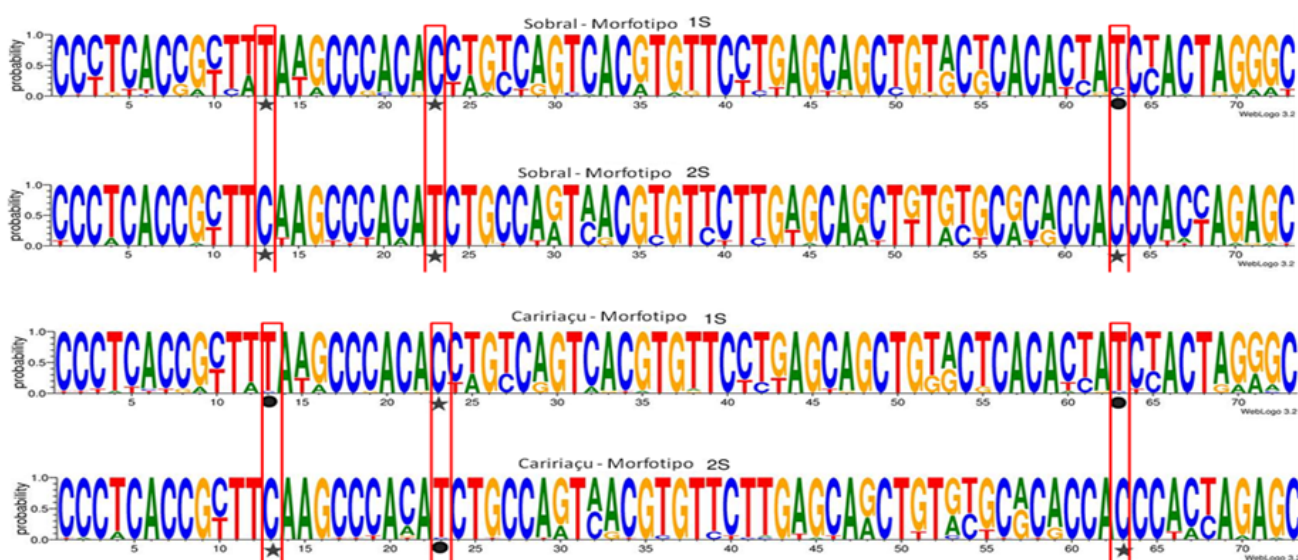


Figura 14: Logos dos sítios informativos para parcimônia do marcador *period* nos morfotipos 1S e 2S de *Lutzomyia longipalpis*, populações de Caririaçu e Sobral-CE. Os sítios polimórficos em que a fixação de polimorfismo separa as duas formas fenotípicas estão indicados. As marcações em estrela representam os sítios em que há fixação do polimorfismo e a marcação em círculo representam os sítios com onde não há a fixação de polimorfismo.

A árvore filogenética entre as duas formas fenotípicas encontradas nas duas localidades revelou um agrupamento separando apenas os morfotipos de *Lutzomyia longipalpis* e não evidenciou agrupamentos entre as localidades. O clado 1S foi sustentado com 56% de bootstrap, com exceção da sequência 1S12 que não apresentou posição filogenética definida, e o clado do morfotipo 2S foi sustentado por 84% de bootstrap ratificando o monofiletismo (Figura 15).

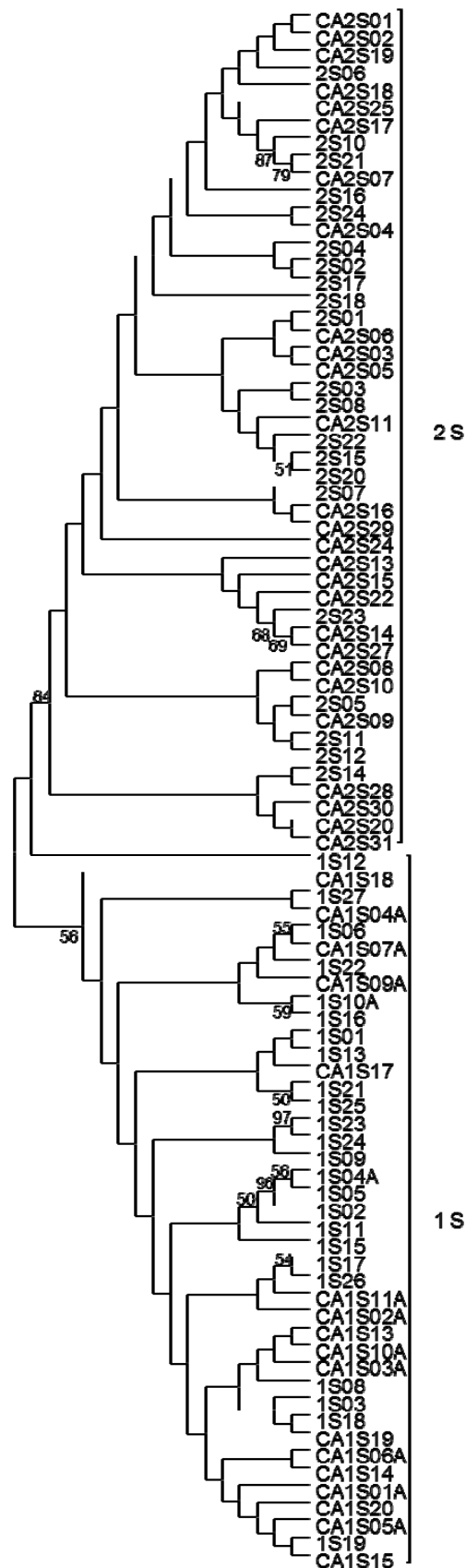


Figura 15: Árvore de Evolução Mínima com a correção de Kimura-2-parâmetros observada para os morfotipos 1S e 2S de *Lutzomyia longipalpis*, localidades Sobral e Caririaçu-CE. Nota-se que esta topologia conseguiu separar de forma consistente as duas variantes morfológicas.

Nas análises de estruturação genética (STRUCTURE e *ad hoc*) realizadas com as duas localidades (Sobral e Caririaçu), os resultados obtidos foram de duas populações genéticas relacionadas aos fenótipos que estruturam as localidades (Figuras 16 e 17).

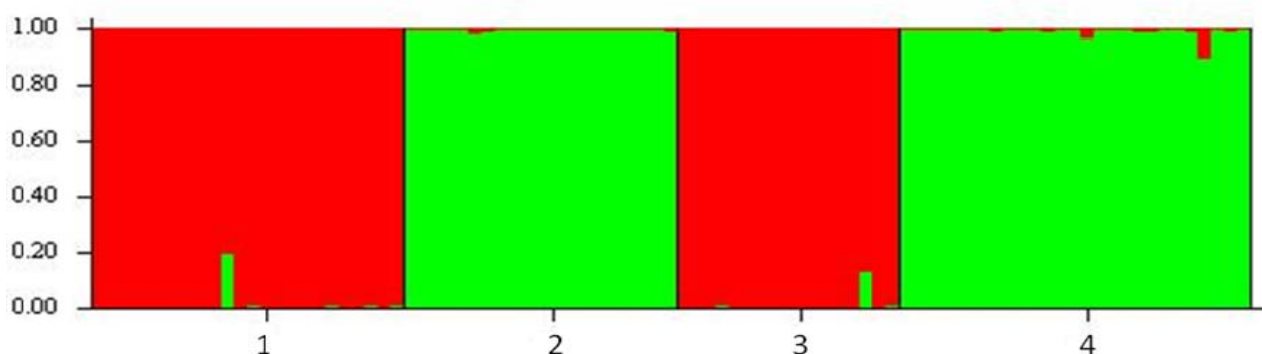


Figura 16: Estrutura da população de *Lutzomyia longipalpis* indicando a separação dos morfotipos 1S e 2S provenientes dos municípios de Sobral e Caririaçu-CE. Distribuição de Q de cada indivíduo para cada grupo. Cada indivíduo é representado por uma única linha vertical dividida em K cores, o tamanho do segmento colorido indica o grau de parentesco de cada indivíduo àquele grupo. Os números 1 e 2 embaixo das barras estão relacionados às sequências de Sobral, já os números 3 e 4 pertencem a localidade de Caririaçu. Os números 1 e 3 são sequências dos indivíduos pertencentes ao grupo 1S e os números 2 e 4 indicam os indivíduos do grupo 2S

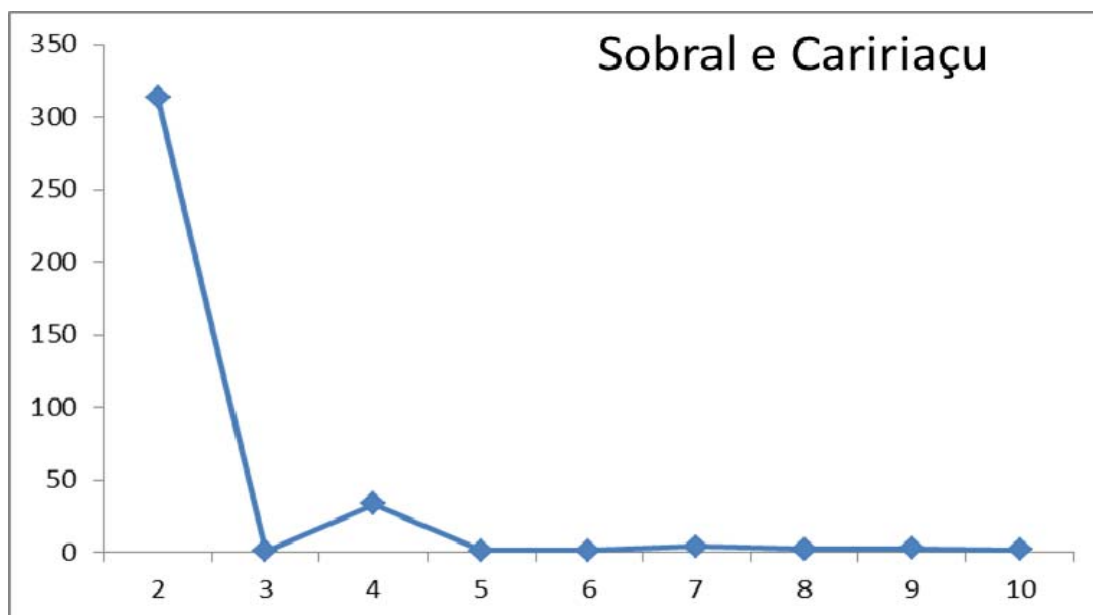


Figura 17: Número de populações de *Lutzomyia longipalpis* em Sobral e Caririaçu-CE segundo metodologia *ad hoc*. O pico demonstra o número de populações.

6. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho percebemos que a utilização de um fragmento com 525 *pb* do gene *period* proporcionou uma maior distinção entre os dois morfotipos de *Lutzomyia longipalpis* analisados, quando comparados aos 266pb usados por Bauzer (2002) em seu estudo. Isto indica que o tamanho do fragmento dos marcadores escolhidos para os trabalhos de genética de populações deve ser bem determinado para que a estruturação genética populacional seja devidamente representada, já que a quantidade e a frequência dos polimorfismos genéticos dentro de uma população são os principais componentes dos padrões evolutivos (DESAI e PLOTKIN, 2008).

A observação dos *logos* de sequência dos dois conjuntos populacionais apresentados neste trabalho indica três sítios informativos (124, 171 e 424) para distinção entre as formas 1S e 2S. Os SNPs 124 e 171 possuem frequência igual a 100% nas populações analisadas do município de Sobral, mas por não estarem totalmente fixados nas populações de Caririaçu não podem ser considerados indicativos taxonômicos para separação dessas espécies crípticas (TURNER et al., 2009, SALAZAR et al., 2010). A fixação de polimorfismo já foi detectada na população de *Lutzomyia longipalpis* da localidade de Sobral para o marcador *paralytic*, entretanto, neste gene, a fixação foi ocasionada por mutação não sinônima e ocasionou mudança de aminoácido (LINS et al 2008), o que não ocorreu em nosso estudo já que a mutação detectada foi considerada sinônima.

As informações obtidas a partir das árvores de Evolução Mínima ratificaram a presença de espécies crípticas ocorrendo em simpatria em Sobral-CE, como observado no estudo de BAUZER et al. (2002) e Lins et al. (2008).

A nossa árvore de Evolução Mínima foi comparada com a árvore do mesmo tipo gerada no estudo de Bauzer (2002) onde foram avaliados 49 espécimes (24 1S e 23 2S) que geraram sequencias com 266 *pb* (com apenas 29 sítios informativos para parcimônia) e em que se verificou a presença de uma sequência pertencente a um grupo genético diferente do grupo fenotípico. Em nossas análises com 45 exemplares (24 1S e 21 2S) foram 525pb e 67 sítios parcimônia informativos, percebemos que não houve divergências entre fenótipo e genótipo. Esta mesma condição também foi observada no estudo de Lins et al. (2008), em que houve distinção perfeita entre os fenótipos e os genótipos com uma e duas manchas para o gene *paralytic*.

Quanto às análises de estruturação genética populacional realizadas com o software Structure, estas confirmaram a existência de duas populações bastante distintas tanto em Sobral quanto em Caririaçu claramente observadas nas figuras apresentadas de estrutura populacional (8, 12 e 16) e da metodologia *ad hoc* (9, 13,17). Assim também Boyd (2007), com o uso da metodologia Structure, percebeu a existência de quatro populações de *Anopheles annulipes* vivendo em simpatria em Townsville, na Austrália e Fonseca et al. (2004) verificou a existência de três populações do complexo *Culex pipiens* por meio da metodologia Δk (*ad hoc*).

No município de Caririaçu, localizado a uma distância linear aproximada de 500 km do município de Sobral, a população de *Lutzomyia longipalpis* apresenta a mesma identidade genética que a população de Sobral.

Em nossas análises, os morfotipos oriundos de Caririaçu se comportaram como duas espécies genéticas diferentes em relação ao padrão de manchas abdominais encontradas nos machos de *Lutzomyia longipalpis*, da mesma forma que ocorre no município de Sobral, mas não apresentaram haplótipos compartilhados com a mesma. Este resultado, provavelmente, deve estar indicando a ausência de fluxo gênico entre as duas localidades. Como o relevo da área onde o estado do Ceará está inserido apresenta um formato de anfiteatro isolado das demais localidades por maciços rochosos (CLAUDINO-SALES e PAULVAST, 2007) é provável que a população de *Lutzomyia longipalpis* da localidade de Caririaçu compartilhe outras características da população de Sobral como feromônios e sons de corte, sumarizadas no estudo de Araki et al. (2009).

No contexto filogeográfico, não foi possível encontrar estruturação populacional como inferida Araki et al. (2009) utilizando as metodologias empregadas para o marcador *period*. Apenas foi evidenciada a questão taxonômica representada pela distinção genética relacionada aos fenótipos 1S e 2S. A estruturação populacional que separa os morfotipos por localidade observada por alguns autores que não utilizaram marcador de especiação, por exemplo o RFLP, (BALBINO et al., 2006 e SILVA et al., 2011) não foi observada, devido, provavelmente, ao tipo de marcador por nós usado que está relacionado à especiação (NIELSEN et al., 1994, REIGEIR et al., 1998, GOTTER et al., 1999 e BARR et al., 2005).

A inserção de Caririaçu no cenário do complexo *L. longipalpis* revela, mais uma vez, o importante papel do marcador *period* na determinação da especiação do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.

8. CONCLUSÕES

- A análise do fragmento de 525pb do gene *period* suporta a hipótese de que o município de Caririaçu-CE apresenta duas populações de espécies-irmãs do complexo de espécies atualmente nominado “*Lutzomyia longipalpis*”, quando levados em consideração os caracteres fenotípicos de uma ou duas manchas abdominais;
- O fragmento de 525 pb do gene *period* utilizado para avaliar a população do município de Sobral conseguiu separar adequadamente as populações com fenótipos 1S e 2S e apresentou um maior número de polimorfismos informativos que o fragmento de 266 pb previamente citado na literatura, permitindo uma melhor resolução do complexo de espécies nessa localidade, sem presença de eventos evolutivos como introgressões e compartilhamento de haplótipos antes relatados na literatura;
- Os padrões genotípicos observados nas localidades de Caririaçu e Sobral não evidenciaram a separação geográfica entre as espécies avaliadas. Isto indica que provavelmente o marcador utilizado não foi eficiente para realizar um estudo filogeográfico entre as espécies crípticas;
- A localidade Sobral apresentou fixação de polimorfismos na separação dos dois fenótipos (1S e 2S), fato pela primeira vez relatado para o marcador *period* na investigação do complexo *longipalpis*, além disso, não houve compartilhamento de haplótipos entre as populações verificadas.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR G.M., MEDEIROS V.M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, p. 207-255. In Rangel E F, Lainson R (eds) **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

ALEXANDER, J.B. Dispersal of Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 24, p. 552–558, 1987.

ALVES, V. R.; FREITAS, R. A.; SANTOS, F. L.; BARRETT, T. V. Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 353-359, 2011.

ARAKI , A.S.; VIGODER, F. M.; BAUZER, L.G.S. R. ; FERREIRA, G.E.M.; SOUZA, N.A.; ARAÚJO, I.B.; HAMILTON, J.G.C.; BRAZIL, R.P.; PEIXOTO, A.A. Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 3, n. 1, e365, 2009.

ARRIVILLAGA, J. C.; FELIGIANGELI, M. D. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: The First New Species Within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 38, n. 6, p. 783-790, 2001.

ARRIVILLAGA, J.; MUTEBI, J. P.; PINANGO, H.; NORRIS, D.; ALEXANDER, B.; FELICIANGELI, M. D.; LANZARO, G. C. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 40 p. 615-627, 2003.

ARRIVILLAGA, J.C e MARRERO, R. Dos Nuevas Poblaciones de *Lutzomyia pseudolongipalpis* Arrivillaga y Feliciangeli (Diptera: Phlebotominae) Vector de

Leishmaniasis Visceral en Venezuela **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 56-559, 2009.

BALBINO, V. Q.; COUTINHO-ABREU, I. V.; SONODA, I.V.; MELO, M. A., ANDRADE, P. P.; CASTRO ; REBELO, J. M.; CARVALHO, S. M.; RAMALHO-ORTIGAO, M. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 98, p. 15-24, 2006.

BARR, N. B., CUI, L.; MCPHERON, B. A. Molecular systematics of nuclear period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **An. Entomol. Soc. America.**, College Park, v. 98, n. 2 p. 173-180, 2005.

BAUZER L. G.; GESTO, J. S.; SOUZA N. A; WARD, R. D.; HAMILTON, J. G.; KYRIACOU, C. P.; PEIXOTO, A. A. Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v.19, p. 1624-1627, 2002.

BAUZER, L. G. S. R.; SOUZA, N. A.; MAINGON, R. D. C; PEIXOTO, A. A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n. 1, p. 1-12, 2007.

BEVILAQUA, P. D.; PAIXÃO,H. H.; MODENA, C. M; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, p. 1-8 , 2001.

BONNEFOY, S.; TIBAYRENC, M.; LE PONT, F.; DUJARDIN J.; DESJEUX, P.; AYALA, F. An isozymic study of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) the vector of visceral leishmaniasis in the Yungas (Bolivia) **Cah ORSTOM Ser. Entomol. Med Parasitol.**, Bondy, v. 24, n. 3, p. 213-217, 1986.

BOYD, A. M.; FOLEY, D. H. Distribution of sibling species of the *Anopheles annulipes* complex (Diptera: Culicidae) in the Townsville region of Australia. **Austr. J. Entomol.**, Canberra, v. 46, p. 133–139, 2007.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BALBINO, V. Q.; MARCONDES, C. B.; BRASIL, R. P.; HAMILTON, J. G.; SHAW, J. J. Should reproductively isolated populations of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato receive taxonomically valid names? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 8, p. 1197-1200, 2009.

BRASIL, R. P.; BRASIL, B. C. Biologia de Flebotomíneos Neotropicais. pp.257-274. In, E. R. Rangel, R. Lainson (Organizersorgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. 367 pp., 2003.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; CARVALHO, M. S. L.; BREDT, A.; BOFIL, M. I. R.; RODRIGUES, R.M. B.; SILVA, A. D.; CORTEZ, S. M. F. C.; ROMERO, G. A. S. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 396-399, 2010.

CLAUDINO-SALES e PAULVAST, EVOLUÇÃO MORFOESTRUTURAL DO RELEVO DA MARGEM CONTINENTAL DO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL, **Cam. Geogr.**, Uberlândia, v. 7, n. 20, p. 1 - 21, 2007. Disponível em <<http://www.ig.ufu.br/revista/caminhos.html>> Acesso em 15 Nov., 2011.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. **Molec. Ecol.**, Oxford, v. 15, n. 10, p. 2833-2843, 2006.

CORANDER, J.; WALDMANN, P.; SILLANPÄÄ, M. J. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. **Genetics.**, Baltimore, v. 163, p. 367-374, 2003.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.

CROOKS, G. E.; HON, G.; CHANDONIA, J. M.; BRENNER, S. E. WebLogo: A sequence logo generator, **Genome Res.**, New York, v. 14, p. 1188-1190, 2004.

CUTOLO, A. A.; VON-ZUBEN, C. J. FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) DE ÁREA DE CERRADO NO MUNICÍPIO DE CORUMBATAÍ, CENTRO-LESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 45-49, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; ANDRADE, A. J.; TENÓRIO, K. E. R.; ANDRADE-FILHO, J. D.; BALBINO, V. Q.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v.43, n. 6, p. 733-736, 2010.

DAWSON, K. J.; BELKHIR, K. A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. **Genet. Res.**, London, New York, v. 78, p. 59–77, 2001.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; Observações Sobre Abrigos e Criadouros de Flebótomos no Nordeste do Estado do Ceará. Sep. **Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2,p. 4-25, 1957.

DESAI, M. M.; PLOTKIN, J. B. "Finite Site Effects on the Polymorphism Frequency Spectrum Under Directional Selection." **Genetics**, Baltimore, v. 180, p. 2175-91, 2008.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, Baltimore,v. 164, n. 4, p. 1567–1587, 2003.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molec. Ecol. Notes**, Oxford, p.1-5. 2007 Disponível em < <http://pritch.bsd.uchicago.edu/publications/>

FalushEtAl07.pdf> Acesso: 09.12.2011.

FONSECA, D. M.; KEYGHOBADI, N.; MALCON, C. A.; MEHMET, C.; SCAFFNER, F.; MOGI, M.; FLEISCHER, R. C.; WILKERSON, R. C. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. **Science**, Washington, v. 303, n. 5663, p. 1535-1538, 2004.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Edigard Bluscher, 1973.

FRANÇOIS, O.; ANCELET, S.; GUILLOT, G. Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics, **Genetics**, Baltimore, v. 174, p. 805 – 816, 2006.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. pp. 23-52. In, E. R. Rangel, R. Lainson (Organizersorgs). **Flebotomíneos do Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. 367 pp., 2003.

GOTTER, A. L.; LEVINE, J. D.; REPPERT, S. M. Sex-linked period genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*: implications for circadian clock regulation and the Evolution of sex chromosomes. **Neuron**, Cambridge, v. 24, p. 953-965, 1999.

HUBISZ, M.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molec. Ecol. Res.**, v. 9, p.1322–1332, 2009.

KONOPKA, R. J.; S. BENZER. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 68, p. 2112–2116, 1971.

LAINSON, R; RANGEL, E. F.; *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral Americana (LVA) no Brasil. PP. 311-336. In, E. R. Rangel, R. Lainson (Organizersorgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. 367 pp., 2003.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** . Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-27, 2005.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, London, v. 266, p. 628-630, 1977.

LANE, P. R.; WARD, R. D. The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). **Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.**, Bondy, v. XXII, n. 3, p. 245-249, 1984.

LANE, R. P. The sandflies of Egypt (Diptera: Phlebotominae). **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)**, London, v. 52, n. 1, p. 1-35, 1986

LANZARO, G. C.; OSTROVSKA, K.; LAWYER, P. G.; WARBURG, A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 48, p. 839-847, 1993.

LINS, R.M.M.A.; SOUZA, N.A.; PEIXOTO, A.A. Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus

associated with insecticide resistance and lovesong production, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 7, p. 736-740, 2008.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 84-95, 1912 Disponível em: < [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v4n1/tomo04\(f1\)_84-95.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v4n1/tomo04(f1)_84-95.pdf)>, Acesso: 03.11.2011.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUZA-GOMES, M. L.; SENA, J. N.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MANGABEIRA, O. Sobre duas novas especies de Flebotomus (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 349-356, 1938

MANGABEIRA, O. Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. **Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 3-26, 1969.

MARCONDES, C. B. Seria a taxonomia insignificante para a ecologia de vetores? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 31, n.5, p. 492-493, 1998.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

MARTINS, A. V.; FALCÃO, A. L.; SILVA, J. E.; DIAS, E. S. NOTA SOBRE *LUTZOMYIA* (*LUTZOMYIA*) *CRUZI* (MANGABEIRA, 1938) COM A DESCRIÇÃO DA FÊMEA (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE), **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 439-442, 1984.

MAZZONI, C. J.; GOMES, C. A.; SOUZA, N. A.; DE QUEIROZ, R. G.; JUSTINIANO, S. C. B.; WARD, R. D.; KYRIACOU, C. P.; PEIXOTO, A. A. Molecular Evolution of the period gene in sandflies. **J. Mol. Evol.**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 553-562, 2002.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

MONTOYA-LERMA, J. Autogeny in the Neotropical Sand Fly *Lutzomyia lichyi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 29, n. 4, p. 698-699, 1992.

MÜLLER, M. J. Caracterização do comportamento sexual, do som de corte e de um fragmento do gene period (per) de populações de *Zaprionus indianus* (Gupta)(DIPTERA: DROSOPHILIDAE). **Dissertação Mestrado**. UFRG, 2009. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17821/000722201.pdf?sequence=1>>, acesso em: 22 de dezembro, 2009.

NIELSEN, J.; Peixoto, A. A.; BARBUJANI, G.; COSTA, R.; KYRIACOU, C. P.; CHALMERS, D. Bigflies, small repeats: the “Thr-Gly” region of the period gene in Diptera. **Mol. Biol. Evol.**, New York, NY, v. 11, p. 839–853, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 22 dezembro. 2011

PATTERSON, N.; PRICE, A. L.; Reich, D. Population Structure and Eigenanalysis. **PLoS Genet.**, San Francisco, v. 2, n. 12 p. 2074-93, 2006.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, P.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Baltimore, v.155, p. 945–959, 2000.

PURCELL, S.; SHAM, P. Properties of structured association approaches to detecting population stratification. **Hum. Hered.**, Basel, v. 58, n.2, p. 93-107, 2004. Disponível em < <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Doi=83030>> Acesso em 27.12.2011.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, (Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, dez, 2008.

REIGIER, J. C.; FANG, Q. Q.; MITTER, C.; PEIGLER, R. S.; FRIEDLANDER, T. P.; SOLIS, M. A. Evolution and Phylogenetic Utility of the period Gene in Lepidoptera. **Mol. Biol.Evol.**, New York, NY, v. 15, n. 9, p. 1172-82, 1998.

RISPAIL, P.; Léger, N. Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. **Mem. Insti. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 787-793, 1998.

RUSAK, B.; ABE, H.; MASON, R.; PIGGINS, H. D.; YING, S. W. Neuro-physiological analysis of circadian rhythm entrainment. **J. Biologic. Rhythms**, New York, n. 8, Suppls., p. 39-45, 1993.

SALAZAR, C.; BAXTER, S. W.; PARDO-DIAZ, C.; Wu, G., SURRIDGE, A.; Genetic Evidence for Hybrid Trait Speciation in Heliconius Butterflies. **PLoS Genet.**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. 1-12, 2010.

SHIRASU, N.; SHIMOHIGASHI, Y.; TOMINAGA, Y.; SHIMOHIGASHI, M. Molecular cogs of the insect circadian clock. **Zoologic. Science**, Tokyo, v. 20, n. 8, p. 947-55, 2003.

SILVA, M. H.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; LEONARDO, F. S.; REBÊLO, J. M. M.; PEREIRA, S. R. F. Genetic Differentiation in Natural Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) (Diptera:Psychodidae) with Different Phenotypic Spot Patterns on Tergites in Males. **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v.40, n. 4, p. 501-504, 2011.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J.; *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An. da Acad. Bras. de Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J. D.; The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 8, p. 1181-1182, 2009.

STANDEN, R. The Staden sequence analysis package. **Mol. Biotechnol.** n. 5, v. 3, p. 233-41. 1996.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v.10, p. 1093/molbev/msr121, 2011.

TEODORO, U.; KÜHL, J. B.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotomíneos no sul do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p. 901-906, 1999.

TURNER, T. L.; HAHN, M. W.; NUZHDIN, S. V. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. **PLoS Biol.**, San Francisco, v. 3, p. 285, 2005.

VIGODER, F. M.; ARAKI, A.S.; BAUZER, L. G. S. R.; SOUZA, N. A.; BRAZIL, R. P.; PEIXOTO, A. A. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect.*, **Gen. Evol.** On-line, Padova, 2010.

WARD, R. D.; RIBEIRO, A. L.; READ, P. D.; 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, 1983.

WARD, R. D.; RIBEIRO, A. L.; RYAN, L.; FALCÃO, A. L.; RANGEL, E. F. The Distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ e NEIVA) (Diptera: Psychodidae) **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, p. 145-148, 1985.

WATTS, P. C.; HAMILTON, J. G. C.; WARD, R. D.; NOYES, H. A.; SOUZA, N. A.; KEMP, S. J.; FELICIANGELI, M. D.; BRAZIL, R. and MAINGON, R. D. C. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, IL, v. 73, p. 734-743, 2005.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). **Mem. Am. Entomol. Inst.** Florida, v. 54, p. 1-881, 1994.