

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Nádia Consuelo Aragão

**Estudo de *Lutzomyialongipalpis* (Diptera: Psychodidae) do
Estado do Ceará, Brasil, por meio de morfometria
geométrica alar e do marcador nuclear *period***

Recife

2017

Nádia Consuelo Aragão

**Estudo de populações de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
Psychodidae) do Estado do Ceará, Brasil, por meio
demorfometria geométrica alar e do marcador nuclear
*period***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientador: Carlos Brisola Marcondes

Coorientador: Valdir de Queiroz Balbino

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Aragão, Nádia Consuelo
Estudo de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) do Estado do Ceará, Brasil, por meio de morfometria geométrica alar e do marcador nuclear *period* / Nádia Consuelo Aragão- Recife: O Autor, 2017.

93 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Brisola Marcondes

Coorientador: Valdir de Queiroz Balbino

Tese (doutorado) ã Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2017.

Inclui referências e anexos

- 1. Lutzomyia 2. Filogenia 3. Ceará I. Marcondes, Brisola (orientador)
II. Balbino, Valdir de Queiroz (coorientador) III. Título**

595.77

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-231

Nádia Consuelo Aragão

Estudo de *Lutzomyialongipalpis* (Diptera: Psychodidae) do Estado do Ceará, Brasil, por meio de morfometria de geometria alar e do marcador nuclear *period*

Aprovado em 23 / 02 / 2017

Banca Examinadora:

Dr. Carlos Brisola Marcondes
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Filipe Dantas Torres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Sinval Pinto Bradão Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior
Instituto Brasileiro de Gestão e Marketing

Recife

2017

Dedico este trabalho a minha tia avó e madrinha Maria de Lourdes Aragão (*in memoriam*). O meu amor por você é infinito.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus familiares, especialmente a minha sobrinha Mariana, por todo amor, orações e paciência: eu os amo!

Aos professores Carlos Brisola Marcondes e Valdir de Queiroz Balbino, pela oportunidade, confiança, apoio e por todo auxílio na realização deste projeto.

Aos professores e pesquisadores: Eunice Bianchi Galati; Priscila Sábio; Márcia Bicudo; Cecília Lavitschka; Lincoln Suesdek; e Camila Lorenz, que disponibilizaram sua atenção e o seu tempo em estágio e curso para que eu pudesse aprender sobre as ferramentas necessárias à concretização da pesquisa.

Ao LABBE, que me acolheu durante os anos deste curso.

Aos colegas de trabalho Lidiane, Kláudia, Moisés, Sérgio, Abigail, Carlos, Marcos Sergipe, Beatriz, Lucas, César, Marcos, Elaine, Karla, Wilson e demais colegas, pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos amigos que fiz nos Estados do Ceará, Pernambuco e São Paulo, onde fui muito bem recebida durante o meu doutorado. Também agradeço àquelas pessoas que, mesmo sem nos conhecer, permitiram a instalação de armadilhas em suas residências e/ou facilitaram o nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, por todo o apoio recebido.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhaes, pela disponibilização da infraestrutura para realização de algumas etapas deste trabalho.

À FACEPE, pelo apoio financeiro.

A minha madrinha, Ir. Ana Márcia V.O.T.C.R., agradeço pelo carinho, ajuda, paciência, incentivo e orações.

Aos Amigos da UBS Cajueiro Seco . Jaboatão/PE, por toda ajuda e apoio.

Aos amigos para sempre: Salomé e familiares, Lindalva, Lorena, Celita, Maria José, Sarah e João, Hilka, Hercylio, Izabel e Antonio, Vania e equipe do Laboratório de Entomologia da Prefeitura do Recife, Evellyn, Celeste, Rafaely, Edson, Lucas, equipes do castramóvel e da Secretaria de meio ambiente de Jaboatão dos Guararapes, Amanda, Marluce, Sueleide, Cláudia, Geiza, Nelson, Eneida, Severina, Hozana e à madrinha, Ir. Maria Faustina O.C.D., agradeço por toda ajuda, orações e palavras de incentivo e ânimo. Vocês moram em meu coração.

%D que eu faço é uma gota no meio de um oceano,
mas sem ela, o oceano seria menor.+

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

Lutzomyia longipalpis, vetor da leishmaniose visceral americana, está inserido em um complexo de espécies e diversas análises tem sido desenvolvidas para melhorar o conhecimento acerca desse vetor. Nesse trabalho, avaliou-se o uso da morfometria geométrica alar, da estruturação genética e da análise filogenética do gene *period* na separação de machos das morfoespécies (1S e 2S) do Estado do Ceará. No primeiro estudo, foram analisados, 78 exemplares coletados em Sobral, em março/2012, e, 111 coletados em setembro/2012, em Caririaçu. Uma avaliação morfométrica geométrica para 12 *landmarks* com análises de tamanho centróide, componentes principais, variáveis canônicas e discriminantes conferiram uma distância de Mahalanobis entre 1S e 2S de 2,0198 e reclassificação com acertos de 80% dos 1S e 73,21% dos 2S. Dados do Genbank foram usados para construção de uma árvore filogenética por inferência bayesiana de um fragmento de 525 pb do gene *period* que separou corretamente os grupos 1S e 2S com 53% e 48% de suporte dos ramos. No segundo estudo, foram analisados 58 espécimes de Sobral, 59 de Caririaçu e 54 de Bodocó. O DNA foi sequenciado e análises estruturação e, filogenética, por máxima verossimilhança, para o gene *period*, foram feitas. Uma estruturação com K=2 correspondente aos morfotipos analisados e suporte de 55% foram obtidos. Todas as análises aplicadas, demonstraram tendência de separação das espécies crípticas de *Lu. longipalpis* do Estado do Ceará, conforme o padrão de manchas abdominais proposto por Mangabeira em 1969.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*. Morfometria Geométrica. Gene *period*.

Abstract

Lutzomyia longipalpis, a vector of American visceral leishmaniasis, is inserted in a complex of species, and several analyses have been developed to improve the knowledge about this vector. In this work, the use of the geometric morphometry, the genetic structuring and the phylogenetic analysis of the *period* gene in the males of morphospecies 1S and 2S from the state of Ceará was evaluated. In the first study, 78 specimens collected in Sobral, in March / 2012, and 111 collected in September / 2012, in Caririaçu, were analyzed. A geometric morphometric evaluation for 12 landmarks with centroid size analysis, main components, canonical and discriminant variables gave a Mahalanobis distance between 1S and 2S of 2.0198 and reclassification with 80% of the 1S and 73.21% of the 2S. Genbank data were used to construct a phylogenetic tree by Bayesian inference from a 525-bp fragment of the *period* gene that correctly separated the 1S and 2S groups with 53% and 48% support from the branches. In the second study, 58 Sobral, 59 Caririaçu and 54 Bodocó specimens were analyzed. The DNA was sequenced, and structure analysis and phylogenetic analysis for the *period* gene by maximum likelihood were generated. A structuring with $K = 2$, corresponding to analyzed morphotypes and support of 55% was obtained. All the applied analyses showed a tendency of separation of the cryptic *Lu.longipalpis* species of the State of Ceará, according to the pattern of abdominal spots proposed by Mangabeira in 1969.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*. Geometric Morphometry. Gene *period*.

Lista de ilustrações

Revisão da literatura

- Figura 1: Genitália dos machos de *Lutzomyia longipalpis*. 23
- Figura 2: Machos de *Lutzomyialongipalpis*. (a) fenótipo 1S (b) fenótipo 2S. 24
- Figura 3: Resumo das informações disponíveis para os sons de corteio dos tipos de feromônio de *Lutzomyialongipalpis* em 14 diferentes populações do Brasil. 26
- Figura 4: Divergências nas genitálias dos machos de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyiacruzi* 28

Capítulo I

- Figura 1:Localização dos 12 landmarks na asa de *Lutzomyia longipalpis* 45
- Figura 2:Gráficos das variáveis canônicas sem alometria demonstrando a separação dos morfotipos de *Lu. longipalpis* com duas e uma mancha abdominal 47
- Figura 3: Árvore filogenética por inferência Bayesiana das sequencias do gene *period* de *Lu. longipalpis* de Sobral e Caririaçu-CE. 48

Capítulo II

- Figura 1: Representação esquemática de polimorfismos de um fragmento de 525 pb do gene *period* usando Weblogo 61
- Figura 2:Mapa de elevação e análise de atribuição genética. A: Mapa de relevo do Brasil (inserir) ea distância entre as localidades de Bodocó, Caririaçu e Sobral, que apresenta uma topografia muito robusta que varia de 63 m a 900 m de altitude. As parcelas de barras geradas pelo software STRUCTURE inferiram a estrutura genética de populações de *Lu. longipalpis* de cada local 62

estudado. B: Atribuição genética de todas as localidades, os espécimes 1S fenótipo foram atribuídos ao grupo vermelho, e 2S espécimes foram atribuídos ao grupo azul. C: Delta K método [35], indicando a presença de duas populações genéticas.

Figura 3: Árvore AMOVA UPGMA para populações de *Lu. longipalpis*. UPGMA 64 construída a partir dos valores de F_{st} para cada fenótipo e respectivas localidades. As populações de Sobral e Caririçu 1S e 2S (SOB1S, SOB2S, CAR1S e CAR2S) são populações distintas de Bodocó (BOD1S e BOD2S).

Figura 4: Árvore de máxima verossimilhança obtida do modelo TVM + I + G 65 mostrou os resultados da utilização de 525 pb do marcador *period* para *Lutzomyia longipalpis*. As localidades de Bodocó (BOD), Estado de Pernambuco e Caririçu (CAR) e Sobral (SOB), Estado do Ceará, Brasil. A topologia mostrada (55% de suporte de bootstrap) separa consistentemente as duas variantes morfológicas conhecidas para os morfotipos 1S e 2S de *Lu. longipalpis*, bem como coloca em evidência a posição monofilética derivada do grupo 2S.

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1: Percentagem de identificação correta no teste de reclassificação comparando populações de <i>Lu. longipalpis</i> de Sobral e Caririaçu-CE	48
---	----

Capítulo II

Tabela 1: Testes de neutralidade e medidas de diversidade genética intra-populacional para cada amostra	61
Tabela 2: Diferenciação genética entre amostras	63
Tabela 3: Resultados AMOVA para populações de <i>Lu. longipalpis</i>	64

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Item	Definição
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
1S	Fenótipo de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com uma mancha no 3º tergito abdominal
2S	Fenótipo de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com uma mancha no 3º e no 4º tergito abdominal
IPI	Intervalo Interpulso
COI	Cytochrome oxidase
PAS-A	PER-ARNT-SIM (PAS) Domínio de interação Proteína-proteína A
CLD	Domínio de localização citoplasmática
Thr-Gly	Região repetitiva dos aminoácidos treonina e glicina
Kb	Quilobase
Pb	Pares de base
MCMC	Cadeia de Markov Monte Carlo
RAPD	Bandas de Diagnóstico Aleatórias de DNA polimórfico amplificado

Sumário

1. Introdução	16
2. Revisão da Literatura	18
2.1 Leishmaniose Visceral Americana	18
2.2 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	21
2.3 Complexo de espécies <i>Lutzomyia longipalpis</i>	24
2.4 Morfometria Geométrica	28
2.5 Gene <i>Period</i>	31
2.6 Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para análise filogenética	33
2.7 Estruturação populacional com o software structure	35
3. Objetivos	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. Capítulo I	39
5. Capítulo II	58
6. Discussão Geral	68
7. Conclusões	72
Referências Bibliográficas	73
Anexo 1: Regras submissão de pesquisa no periódico Systematic Entomology	78
Anexo 2: Comprovante de Submissão do Artigo	86
Anexo 3: Currículo Lattes	88

1. Introdução

O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é um díptero pertencente à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, encontrado na América Central e América do Sul. É considerado o principal vetor da *Leishmania infantum*, agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), apresentando variações que levam a suspeitar que este inseto constitua um complexo de espécies crípticas.

O caráter morfológico tem sido um impasse para a separação das espécies crípticas que compõem o complexo *Lu.longipalpis*. No entanto, já foi nominada, até o momento, na Venezuela, *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Arrivillaga e Feligiangeli, 2001) caracterizada por estudos que envolveram várias abordagens biológicas, entre elas, genética e a morfológica. Uma segunda espécie, *Lutzomyia cruzi* descrita por Mangabeira (1938), posteriormente redescrita por Martins *et al.* (1984), foi considerada, desde a sua descrição, espécie distinta de *Lu.longipalpis*. No entanto, foi lançada mais recentemente a hipótese de sua participação no complexo *Lutzomyia longipalpis*.

Ainda tratando sobre abordagem morfológica, temos que a morfometria geométrica alar é uma técnica que vem sendo bastante utilizada na entomologia para ajudar a resolver problemas relacionados à identificação de espécies próximas, populações geográficas de vetores e alguns complexos de espécies. Baseada na análise da diferença de forma, orienta os estudos que buscam elucidar a causa dessa diferença, e quando associada a outros testes, tem maior confiabilidade, oferecendo um suporte aos resultados obtidos.

A análise de alguns genes foi importante para o atual conhecimento do complexo *Lu.Longipalpis* e estudos realizados em populações simpátricas e alopátricas do mesmo inseto ratificou a qualidade do gene *period* como marcador de especiação para resolver o problema dessas espécies do complexo *Lu.longipalpis*, no Brasil.

O presente estudo, por meio das análises morfométrica e geométrica alar, filogenética do gene *periode* e estruturação populacional, busca evidenciar possíveis divergências entre as morfoespécies simpátricas de *Lu. longipalpis* do Estado do Ceará, conforme o padrão de manchas abdominais proposto por Mangabeira em 1969, e caracterizaram a divisão das populações de *Lu. longipalpis*, dos municípios de Sobral e Caririaçu, no Ceará, em grupos populacionais com diferentes padrões morfológicos de uma ou duas manchas abdominais, sugerindo a extensão dessa condição para o município de Bodocó, em Pernambuco.

2. Revisão da Literatura

2.1 LeishmanioseVisceral Americana

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma doença parasitária com grande importância para a saúde pública mundial e com alta incidência no Brasil. Para as Américas, no período de 2001 a 2014 foram registrados de 48.720 casos de leishmaniose visceral com uma média anual de 3.480 casos, dos quais que 96,42% (46.976), estão concentrados no Brasil (OPAS/OMS, 2016).

Inicialmente, no Brasil, essa enfermidade tinha um caráter rural, no entanto, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte, principalmente associada a ambientes de baixo nível socioeconômico e pobreza (Brasil, 2003).

A LVA caracteriza-se como uma enfermidade cujo período de incubação no homem é 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses, e no cão é bastante variável, de 3 meses a vários anos com média de 3 a 7 meses (Brasil, 2003), sendo a LV caracterizada em humanos principalmente por febre de longa duração, emagrecimento, anemia, fraqueza e pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos quando não tratada; enquanto no cão (principal reservatório urbano) desde a falta de sintomas até febre irregular, apatia, emagrecimento, crescimento exagerado das unhas, descamação furfurácea, úlceras, conjuntivite, paresia do trem posterior e fezes sanguinolentas são os sintomas mais característicos; as raposas e os marsupiais são os principais reservatórios da LV silvestre (Brasil, 2016).

Os vetores da LVA são os flebotomíneos, insetos conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui, cangalhinhas etc. (Marcondes et al., 2011) e No Brasil, *Lu.longipalpis* (vetor principal) e *Lu.cruzi* são as duas espécies relacionadas com a transmissão dessa enfermidade.

O hospedeiro vertebrado é infectado com promastigotas quando picado pelo vetor, assim, as promastigotas penetram nos macrófagos circulantes e multiplicam-se como amastigotas depois rompem os macrófagos, quando são liberadas e infectam outros macrófagos. Dessa forma, a transmissão ocorre enquanto houver o parasitismo na pele ou no sangue periférico do hospedeiro; depois, o vetor ingere macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo e as amastigotas são liberadas no intestino do mosquito e multiplicam-se como promastigotas (Brasil, 2003).

As promastigotas, no vetor são denominadas, em procíclicas, haptomonadas, nectomonadas, paramastigotas e metacíclicas, conforme o seu desenvolvimento, e somente as últimas são consideradas formas infectantes para os hospedeiros vertebrados, quando transmitidas durante a alimentação sanguínea do vetor; mas, observou-se, que o próprio vetor é capaz de se infectar experimentalmente com as formas promastigotas da leishmania, sendo esta uma forma mais fácil de infecção para condições de laboratório(Freitas et al., 2012).

As estratégias de controle dessa endemia estão centradas no diagnóstico e no tratamento precoce dos casos humanos, na redução da população de flebotomíneos, na eliminação dos reservatórios e nas atividades de educação em saúde (Brasil, 2016).

Para os casos humanos, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos, mas ainda existem o diagnóstico imunológico pela técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e da Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), e principalmente o último é usado em inquéritos populacionais; também ocorre o diagnóstico molecular por métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RTPCR) para detecção de RNA e PCR para detecção de DNA, além do diagnóstico com base no exame parasitológico, que é definitivo, (Contijo e Melo, 2004).

O levantamento, a investigação e o monitoramento entomológico dos vetores é feito de acordo com características epidemiológicas e entomológicas da localidade analisada, por meio de coleta manual com tubo de sucção ou capturador motorizado, coletas com armadilha adesiva, armadilhas luminosas e armadilhas com animais ou com feromônios, para melhor conhecer a presença, dispersão e sazonalidade desses vetores; já o controle químico é feito utilizando deltametrina, cypermetrina, lambdacyalotrina entre outros produtos inseticidas de ação residual (Brasil 2003). Para os cães a eutanásia é recomendada a todos os animais com sorologia positiva ou parasitológico positivo, enquanto para os humanos, a medida de controle é o tratamento que é feito com Antimoniais e anfotericina B, sendo usada, também, as pentamidinas (isotionato e mesilato) principalmente na Europa e África (Brasil 2003, Brasil, 2016).

As medidas de prevenção para LV em humanos estão ligadas a evitar a exposição em horários de atividade do vetor, proteção química pelo uso de repelentes e mecânica, com o uso de telas e mosquiteiros, por exemplo, e a

educação ambiental e em saúde; já para os cães, o uso de coleiras impregnadas de deltametrina e de telas nos canis são indicados; enquanto para os vetores, manejo e saneamento ambiental que reduzam o número de ambientes propícios para sua proliferação, até o momento, são a melhor alternativa para a evita-los. (Brasil, 2016).

2.2 *Lutzomyia longipalpis*

Identificado por Lutz e Neiva, no ano de 1912, em uma localidade incerta no Brasil, o flebotomíneo *Lu. longipalpis* foi associado à transmissão da leishmaniose visceral na década de 1930 (Chagas, 1936). No entanto, apenas em 1977, foi provado, por meio de infecção experimental e pela análise das capacidades de infecção e transmissão, assim como da distribuição geográfica, que este inseto era o principal vetor do parasito causador da LVA (Lainson *et al.*, 1977).

O ciclo de desenvolvimento desse inseto acontece em um a dois meses ou até mais, e passa pelas fases de ovo, larva com quatro ínstar (em que as do gênero *Lutzomyia* apresentam duas cerdas na parte posterior do corpo durante primeiro instar e quatro cerdas, nos três últimos), que se desenvolve no solo úmido e se alimenta de matéria orgânica ali depositada, posteriormente pupa e emerge o adulto que se alimenta de açúcares de plantas e secreção de afídeo e apenas a fêmea precisa da alimentação sanguínea para maturar seus ovos. (Marcondes, 2011).

Ostroncoscos e raízes tubulares de árvores, as grutas e fendas, nas rochas, os criatórios dos animais domésticos além das paredes externas e

internas dos domicílios são os principais criadouros/abrigos do *Lu. longipalpis* (Deane e Deane, 1957, Aguiar e Medeiros, 2003).

Esse vetor já foi encontrado em diversos biomas, como os associados à 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).

Inicialmente, existia uma natureza rural na distribuição do *Lu. longipalpis* e, conseqüentemente, da LVA no Brasil. No entanto, ao longo dos anos, o número crescente de casos autóctones, nos grandes centros urbanos (Costa, 2008, Rangel e Vilela, 2008) e a recente descoberta desse inseto e de cães infectados no entorno de um cemitério em área urbana no Rio de Janeiro (Brasil, 2013) demonstram uma crescente adaptação desse inseto ao ambiente antropizado. Logo, *Lu. longipalpis* é uma espécie em adiantado processo de domiciliação e com grande adaptação aos ambientes modificados pelo homem (Aguiar e Medeiros, 2003).

A presença deste inseto é relatada nas Américas Central e do Sul, do México até a Argentina, e o mesmo possui uma ampla distribuição no território brasileiro (Young e Duncan, 1994, Aguiar e Medeiros, 2003).

Lu. longipalpis é caracterizado, morfológicamente, por apresentar, nos exemplares machos, quatro espinhos nos gonóstilos e cerdas dorsais curvas em forma de chifre de antílope que estão inseridas em seus parâmeros. Já nas fêmeas, as espermatecas são pequenas, cilíndricas e levemente enrugadas, e apresentam um comprimento cerca de quatro vezes maior que sua largura (Figura 1) (Young e Duncan, 1994).

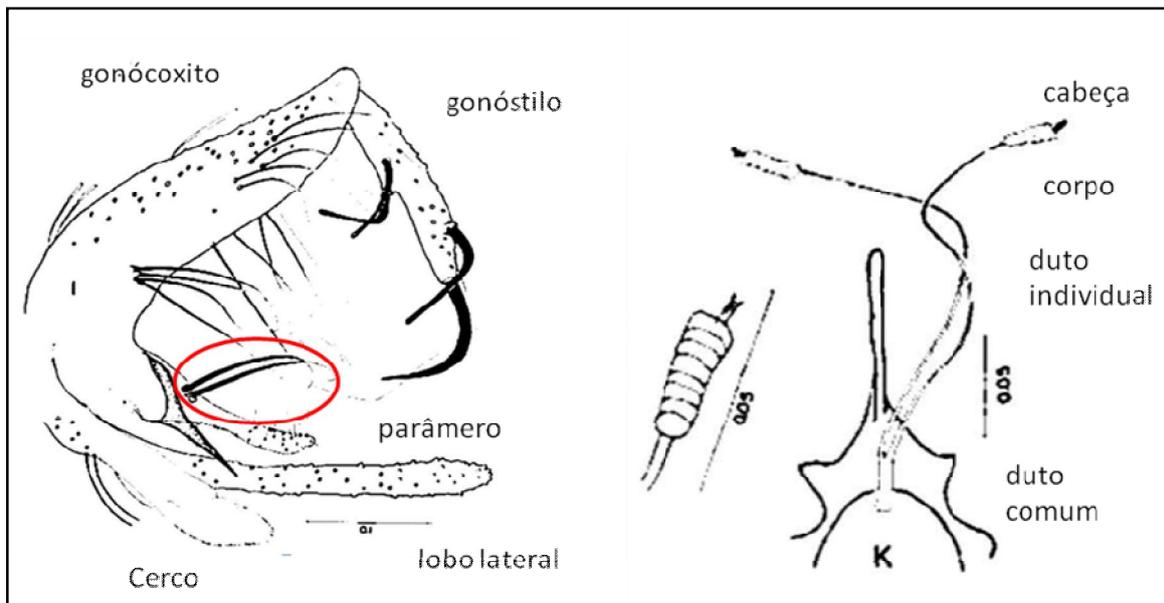


Figura 1: Genitália dos machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Destaque em vermelho para as cerdas em forma de Í chifre de antílope. Fonte: Young e Duncan, 1994.

Os machos dessa espécie trazem uma ou duas manchas claras nos tergitos abdominais, por isso, são considerados fenótipos 1S (uma mancha no terceiro tergito) ou 2S (duas manchas, uma no terceiro e outra no quarto tergito), respectivamente. As fêmeas são indistinguíveis de algumas outras do mesmo gênero, sendo necessária a presença do macho para uma correta diagnose da espécie, a exemplo do que ocorre com *Lu. cruzi* (Young e Duncan, 1994).

Quanto a sua classificação taxonômica, considerava-se que na subfamília Phlebotominae, ordem Diptera, estavam agrupados seis gêneros de flebotomíneos: *Phlebotomus*; *Sergentomyia* e *Chinius*, *Brumptomyia*, *Lutzomyia* e *Warileya*. (Young e Duncan, 1994).

Com o avançar das pesquisas, ao longo dos anos, uma nova distribuição, em 31 gêneros, foi proposta (RISPAIL *et al.*, 1998, Galati, 2003) e vem sendo paulatinamente aceita pelos especialistas (Marcondes, 2011).

No Continente Americano, são reconhecidas atualmente 520 espécies e 17 fósseis. O gênero *Lutzomyia* possui 82 espécies e dessas, 21 estão classificadas no subgênero de mesmo nome (Galati, 2016).

2.3 O complexo de espécies *Lutzomyia longipalpis*

Divergências no número de manchas claras observadas nos tergitos abdominais (Figura 2) de populações de *Lu. longipalpis* encontradas nos Estados do Ceará e do Pará (Mangabeira, 1969) foram as primeiras evidências sugestivas da existência de um possível complexo de espécies envolvendo esse flebotomíneo.



Figura 2: Machos de *Lutzomyia longipalpis*. (a) fenótipo 1S (b) fenótipo 2S. Fonte: LABBE-UFPE.

Inicialmente, testes sobre o isolamento reprodutivo entre diferentes populações brasileiras (Ward *et al.*, 1983), investigações micromorfológicas das manchas (Lane e Ward, 1984), distribuição dos morfotipos (Ward *et al.*, 1985) isoenzimas (Mutebi *et al.*, 1999) foram realizados a fim de aprofundar o conhecimento sobre este vetor e confirmar a existência do complexo de espécies, no Brasil. Dos resultados desses estudos, apenas as isoenzimas indicaram que as populações analisadas pertenciam a uma única espécie.

Outras formas de abordagem também foram utilizadas, entre elas a morfometria tradicional que foi, de uma forma geral, inconclusiva (Azevedo *et al.*, 2000), os tipos de feromônios produzidos, em que foram reconhecidos quatro diferentes tipos (3-Metil-a-himachalene, 9-metilgermacrene-B, Cembrene-1 e Cembrene-2) (Hamilton *et al.*, 1999a; Hamilton *et al.*, 1999b; Hamilton *et al.*, 2005), e quando associados aos love songs de populações brasileiras (Souza *et al.*, 2004) burse ou pulse (em seus quatro tipos), caracterizam bem essas populações que estão sinalizadas por distribuição geográfica na Figura 3 (Araki *et al.*, 2009).

Nos estudos genéticos, os microssatélites sinalizaram a separação das morfoespécies 1S e 2S de Sobral, no Ceará (Maingon *et al.*, 2003), os genes nucleares também apresentaram tais divergências, primeiramente com retenção de polimorfismo ancestral no gene *period* (Bauzer *et al.*, 2002) e com o avançar das pesquisas, *paralytic* e, mais recentemente, *period*, apresentaram fixações de polimorfismos (Araki *et al.*, 2009, Araki *et al.*, 2013, Costa *et al.*, 2015) enquanto os outros genes, nas demais populações brasileiras já analisadas, apontaram para a separação das espécies, porém, ainda apresentando introgressão e a ausência de polimorfismos fixados (Araki, 2015).

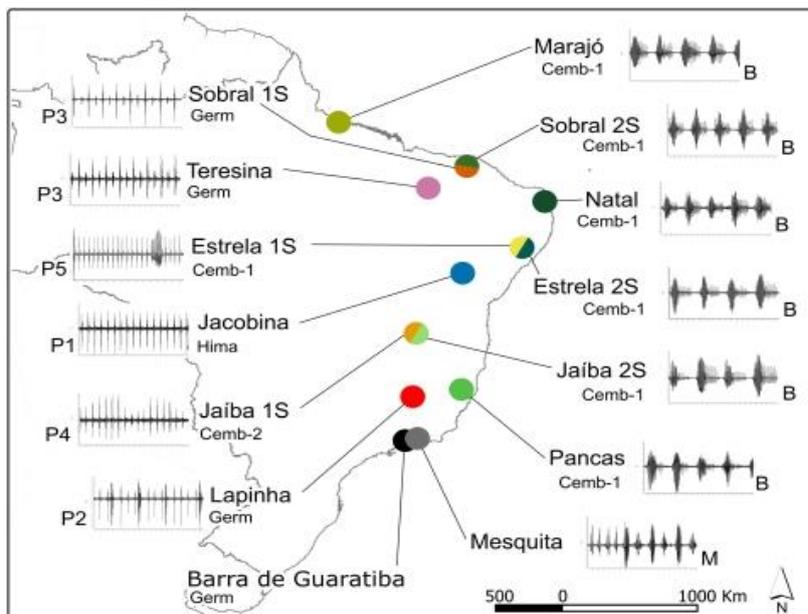


Figura 3. Resumo das informações disponíveis para os sons copulatórios e dos tipos de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* em 14 diferentes populações do Brasil. Fonte: ARAKI *et.al.*,2009.

Na América do Sul, são reconhecidos quatro grupos genéticos do complexo *Lu.longipalpis* identificados por meio do marcador mitocondrial Citocromo oxidase(*COI*). No entanto, sob essas condições, as populações brasileiras analisadas foram agrupadas como uma única espécie (Arrivillaga *et al.*, 2002).

A primeira espécie do complexo a ser nominada foi *Lu. pseudolongipalpis*, da Venezuela, em estudos que envolveram, por exemplo, isoenzimas, genes mitocondriais (*cox1*),feromônios (9-methyl-himacaleno) e caracteres morfológicos (diferenças nas larvas L4 e, para as fêmeas adultas, discrepâncias nos dentes verticais do cibário, cercos e valvíferos)(Arrivillaga e Feligiangeli, 2001).Hoje, já estão identificadas três populações endêmicas dessa espécie, nesse país (Arrivillaga e Marrero, 2009).

Araki *et al.* (2009) revisaram os dados a respeito das populações brasileiras do complexo *Lu. longipalpis*, reunindoos resultados da análise de um

fragmento do gene *period*, padrões de sons de corte e os tipos de feromônio produzidos, sugeriram que a separação das espécies crípticas está basicamente associada aos padrões de sons de corte (Figura 3), e sob esta óptica, sugerem que no Brasil existem, pelo menos, dois principais grupos elecionados por esses loves songs.

A espécie *Lu. cruzi* descrita por Mangabeira (1938), e redescrita por Martins *et al.* (1984), também foi indicada a fazer parte do complexo *Lu. longipalpis* após as análises de feromônios, pois apresenta o tipo 9-metilgermacreene-B (Watts *et al.*, 2005), sons de corte (tipo Burst) e de polimorfismo do gene *period* (Vigoderet *et al.*, 2010). Nas análises de microssatélites, a divergência encontrada é similar a das espécies-irmãs do complexo (Watts *et al.*, 2005). As fêmeas desses flebotomíneos são, até o momento, morfologicamente indistinguíveis das de *Lu. longipalpis* e os machos apresentam, apenas, pequenas disparidades na genitália (Figura 4) (Young e Duncan, 1994). Epidemiologicamente, esse inseto é considerado um vetor secundário da LVA, pois está relacionado a sua transmissão, no Brasil, pelo menos, em áreas onde o *Lu. longipalpis* não foi encontrado (Watts *et al.*, 2005).

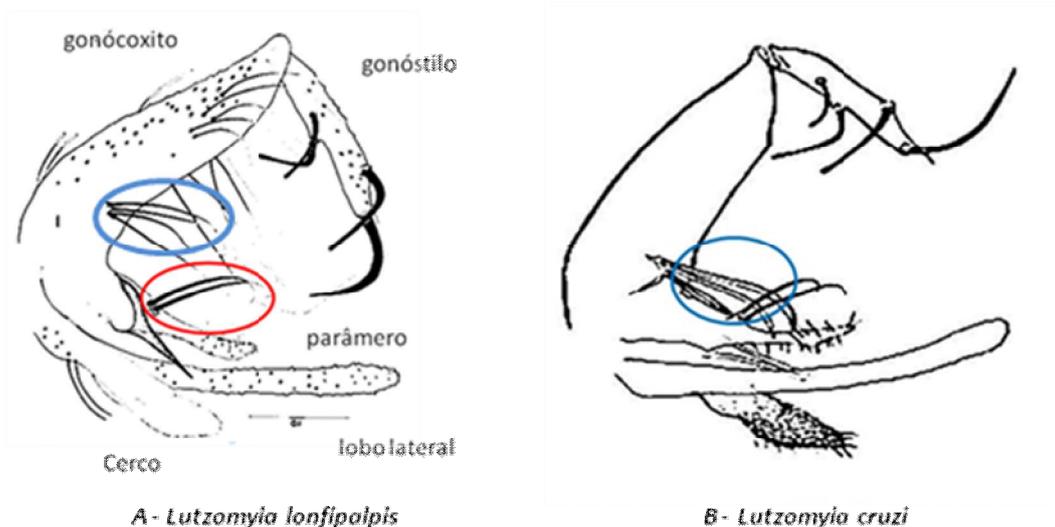


Figura 4: Divergências na genitália dos machos de A- *Lu.longipalpis* e B- *Lu. cruzi*. Em azul, tufo basal de cerdas do gonocoxito. Em A- Cerdas espiniformes. Em B- Cerdas foliáceas. Em vermelho, cerdas em forma de Íchifre de antílope. Fonte: Young e Duncan, 1994.

Elucidar esta antiga questão taxonômica que envolve o complexo *Lu. longipalpis* é primordial para mudar o cenário epidemiológico da LVA, indicando possíveis vetores principais e secundários, além de suportar estudos ecológicos para um mais claro conhecimento a respeito desses vetores.

2.4 Morfometria Geométrica

A morfometria geométrica compara indivíduos da mesma espécie ou de espécies filogeneticamente próximas e transforma marcos anatômicos em coordenadas cartesianas que simbolizam formas geométricas sem os efeitos de tamanho, posição e orientação para estudar as causas das diferenças das formas nestes organismos (Monteiro e Reis, 1999). Baseada em análises

estatísticas, esta técnica combina ferramentas de geometria, gráficos de computador e dados biométricos para proceder a uma análise multivariada, a fim de detectar variação na forma biológica (Bookstein, 1997).

O uso de marcos anatômicos permite a comparação quantitativa das formas dos organismos. Quando aplicada à sistemática, a morfometria geométrica é capaz de sinalizar mudanças de forma que, muitas vezes, são indetectáveis pela morfometria tradicional (Dujardin *et al.*, 2010)

Na entomologia médica essa técnica tem sido aplicada como uma ferramenta bastante útil para estudar, por exemplo, problemas que envolvem populações geográficas de vetores (Dujardin *et al.*, 2008) e espécies próximas (Gurgel *et al.*, 2011, Vidal *et al.*, 2011).

Duas espécies próximas de triatomíneos, vetores da doença de Chagas, tiveram seus nichos ecológicos avaliados por meio da morfometria geométrica das asas e cabeças e, apesar das análises discriminantes apresentarem sobreposição, evidenciou-se que uma das espécies avaliadas, *Triatoma garciabesi*, ocupa áreas mais frias e secas do que a outra, *Triatoma sordida*, melhorando os critérios operacionais na delimitação dessas espécies fenotipicamente semelhantes (Gurgel *et al.*, 2011).

Bastante aplicada aos insetos, a morfometria alar se utiliza da estrutura praticamente bidimensional da asa para reduzir o erro e permitir comparações válidas de um determinado fenótipo entre indivíduos, populações locais e/ou espécies, desde que haja homologia entre os pontos de referência (Dujardin, 2008).

Estudos que buscaram identificar, com precisão, espécies de mosquitos de três gêneros epidemiologicamente bastante importantes, usando morfometria

alar, tiveram sucesso na correta diagnose dos gêneros: *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* pelo formato da asa, demonstrando que para os níveis hierárquicos inferiores (subgêneros e espécies), a morfometria geométrica das asas também foi eficiente, resultando em altas pontuações de reclassificação (Wilke *et al.*, 2016). O mesmo ocorreu com diferentes linhagens de *Aedes aegypti* Tailândia, mantidas em laboratório, que foram corretamente diagnosticadas por meio da morfometria geométrica alar (Jirakanjanakit e Dujardin *et al.*, 2005).

A morfometria geométrica alar, também, mostrou-se eficaz na separação de espécies co-genéricas *Culex*, uma vez que, *Culex quinquefasciatus*, principal vetor da filariose broncofítiana, e *Culex nigripalpus*, vetor de arboviroses e encefalites, podem conviver em simpatria em ambientes urbanos e peri-urbanos e apresentam uma difícil diagnose quando danificados (Vidal *et al.*, 2011)

Complexos de espécies foram avaliados por meio da morfometria geométrica sugerindo que este método pode ser utilizado para espécies crípticas por utilizar parâmetros matemáticos derivados de coordenadas originais, cuidando para que alguns critérios sejam observados, como por exemplo, que o mesmo usuário proceda a tomada dos marcos anatômicos para evitar erros estatísticos do tipo um, rejeitando-se uma hipótese nula verdadeira (Dujardin, 2010).

Os machos das espécies crípticas das abelhas de orquídeas *Euglossa viridissima* e *Euglossa dilemma* são morfologicamente crípticos, com exceção do número e forma dos dentes mandibulares e por meio da morfometria geométrica das interseções de veias alares, as duas espécies foram separadas (em menor grau, os morfotipos da espécie *E. viridissima* que apresentam variação na forma dos dentes mandibulares) (Quezada-Euán *et al.*, 2015). Por uma análise

discriminada forma da célula radial, demonstrou-se que há separação entre os três grupos, embora com maior erro de classificação entre *E. viridissima* e *E. dilema*, identificando, pela morfometria geométrica alar, as espécies e morfotipos, contribuindo para a taxonomia infragenérica para abelhas com sua aplicação apoiada por outros métodos (Quezada-Euán *et al.*, 2015).

Por ser uma técnica de rápida execução e baixo custo, a morfometria geométrica pode ser associada a outras técnicas explorando melhor os resultados obtidos e aumentando a confiabilidade das informações geradas (Lorenz *et al.*, 2012).

2.5 Gene *period*

O gene nuclear *period* está localizado no cromossomo X de *Drosophila melanogaster*, codificando um cofator de transcrição envolvido no relógio biológico e foi identificado por Konopka e Benzer (1971) a partir da detecção dos mutantes *per*⁰¹, *per*^s e *per*^L que alteram a duração do ritmo circadiano, caracterizado por ser o ciclo de atividade locomotora em 24 horas (Konopka e Benzer, 1971, Müller, 2009).

A transcrição da proteína *period*, codificada pelo gene de mesmo nome, é regulada por retroalimentação. O referido gene possui regiões bem conservadas (PAS-A, CLD e C-Domain) e uma região altamente variável Thr-Gly, que está relacionada à termoestabilidade do comportamento circadiano e mudanças no intervalo interpulso (IPI). As mutações ocorridas nas regiões PAS-A ocasionam os ritmos longos 29h, na C-Domain ciclos curtos de 16h e 19h e em Thr-Gly podem

provocar alterações no ritmo dos sons de corte, pois podem afetar o IPI (Konopka e Benzer, 1971, Müller, 2009).

Em *Drosophila melanogaster*, esse gene tem um tamanho aproximado de 3,6 quilobase (Kb), apresenta apenas um íntron com mais de 50 pares de bases (pb) e transcreve um polipeptídeo com aproximadamente 1200 aminoácidos. Esse gene tem evolução rápida, uma alta taxa de substituições e essas características o destacam em relação a outros genes nucleares para um bom marcador nuclear com uso indicado na reconstrução filogenética de táxons abaixo do nível de família (Regier *et al.*, 1998).

Uma vez que a separação das espécies crípticas brasileiras do complexo *Lu.longipalpis*, de acordo com Araki *et al.* (2009), estão basicamente associadas aos padrões de sons de corte, o gene *period* torna-se um bom marcador para tratar de diferenças espécie-específicas entre essas espécies.

Recentemente, uma análise realizada com o gene *period*, envolvendo três populações de *Nyssomyia umbratilis* de duas regiões brasileiras (Norte e Nordeste), resultou na separação de dois grupos, em que duas populações de regiões distintas (Recife e Rio Preto da Eva) foram geneticamente associadas e, a partir desses resultados, sugeriu-se a existência de um complexo de espécies entre essas populações (Freitas *et al.*, 2015).

A análise de um fragmento de 266 pb deste gene também detectou variações de polimorfismos que caracterizaram a divisão da população de *Lu. longipalpis* encontrada em Sobral em duas populações, 1S e 2S (Bauzer *et al.*, 2002, Araki *et al.*, 2013), e para um fragmento com 525 pares de bases, existe o relato de fixação de polimorfismos para estas mesmas morfoespécies, além de

ampliar a existência do complexo para o município de Bodocó, em Pernambuco (Costa Jret *al.*, 2015).

2.6 Inferencia Bayesiana e Máxima Verossimilhança para análise filogenética

A análise filogenética estuda a relação antepassado-descendente estimada a partir dos caracteres estudados, cuja relação é representada em árvores filogenéticas. A Inferencia Bayesiana e a Máxima Verossimilhança são métodos baseados em modelos estatísticos de evolução molecular, comumente empregados nessa análise, onde se leva em conta o conhecimento a priori que se tem sobre os dados analisados (Peña, 2011).

Inferência Bayesiana

A abordagem bayesiana é bastante útil quando o número de hipóteses alternativas é extenso. Os estatísticos bayesianos evitam o padrão de abordagem em que se especifica uma hipótese como hipótese nula, mas procuram verificar se os dados são ou não robustos o suficiente para serem rejeitados, uma vez que o *output* dessa análise é a probabilidade *a posteriori* de qualquer solução, e as regras da probabilidade podem ser usadas para testar se a hipótese deve ser acreditada e o quão fortemente e, como resultado, milhões de ciclos são geralmente necessários, enquanto que muito menos (da ordem de 1.000) repetições são suficientes no método de agrupamento por *bootstrap*, para

a resolução da maioria dos problemas (Holder e Lewis, 2003).(Holder e Lewis,2003).

Na metodologia da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) para a filogenia, é a partir de uma árvore inicial que uma nova árvore é proposta. Os passos que mudam a árvore devem envolver uma escolha aleatória que satisfaça várias condições e uma amostra para cada ciclo é produzida, em que as árvores sejam altamente autocorrelacionadas. (Holder e Lewis, 2003).

Três populações de *Nyssomyia umbratilis*, principal vetor de *Leishmania guyanensis*, foram filogeneticamente analisadas por meio do marcador nuclear *period*. A análise de inferência bayesiana, pela metodologia de MCMC, indicou diferença, revelando dois clados distintos e bem suportados, com valores de probabilidade de 0,98 ou 98%, em que um clado estava composto pelas amostras de Recife (PE) e Rio Preto da Eva (AM), e o outro, pelas amostras de Manacapuru (AM). Isso demonstra que as populações de Recife e Rio Preto da Eva estão mais estreitamente relacionadas evolutivamente e reforça a possibilidade de que os indivíduos de Recife estejam ligados ancestralmente a indivíduos de Rio Preto da Eva (Freitas *et al.*,2015).

Para o complexo *Lu. longipalpis*, a análise do gene COI, usando a metodologia da MCMC na inferência bayesiana para a filogenia, não indicou o uso desse gene como um bom marcador molecular, uma vez que a árvore obtida sugeriu um único grupo genético associado aos tipos de morfologia 1S e 2S de Sobral e Caririaçu, e não foi capaz de caracterizar a relação ancestral e a origem geográfica das populações (Freitas *et al.*,2016).

Máxima Verossimilhança

No método da Máxima Verossimilhança, verifica-se a probabilidade da matriz de caracteres estar melhor explicada pelas árvores geradas, calculando-se cada árvore possível, conforme o modelo de evolução selecionado (Felsenstein 2004, Peña, 2011).

Nesse método procura-se encontrar a árvore evolutiva que produza a mais alta probabilidade de evolução observando-se os dados, de forma que a probabilidade de uma árvore é a probabilidade dos dados em função da hipótese segundo o modelo escolhido, considerando-se que a hipótese (a árvore) é a que melhor explica os dados. Isto significa que as probabilidades para diferentes árvores não somam à unidade e que a probabilidade de uma árvore não é a probabilidade de que a árvore é a correta (Peña, 2011).

Em flebotomíneos, estudo realizado, no Sri Lanka, analisando os genes COI, cytochrome oxidase b, internal transcribed spacer 2, e as regiões do DNA ribossomal 18s e 28s de *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes* sensu lato, a análise genética usando o método da máxima verossimilhança suporta a existência de dois grupos de espécies crípticas (A e B) da espécie em questão, ao invés de três, conforme anteriormente detectado (Gajapathy, 2013)

2.7 Estruturação populacional com o software structure

A definição das populações é de grande importância para se verificar a estruturação genética das mesmas e, geralmente, essa definição é feita

considerando-se a origem geográfica das amostras ou fenótipos (Evanno et al., 2005).

O software structure usa o método de análise bayesiana e MCMC para a identificação de grupos geneticamente homogêneos de indivíduos, dessa forma, atua numa questão de genética populacional pela estatística ad hoc K , com base na taxa de mudança na probabilidade log de dados entre sucessivos valores K , que são os números de agrupamentos encontrados (Evanno et al., 2005).

Foley et al. (2013) relatam que em Arequipa, no Peru, *Triatoma infestans*, está distribuído dentro e ao redor do centro urbano e essas populações compartilham uma história evolutiva recente, embora o fluxo genético seja restrito mesmo entre os locais próximos. Segundo a análise populacional realizada, a diferença entre os distritos na distribuição de frequência de alelos foi evidente, embora a maioria das clusters foram encontrados na maioria dos distritos. Os distritos localizados no centro da cidade (Paucarpata e Mariano Melgar) foram semelhantes entre si a todos os valores de K . Os distritos periurbanos (Sachaca, Cayma e Characato) diferiram pouco na composição e frequência de clusters populacionais das áreas do centro da cidade, especialmente a valores baixos de K . Os distritos rurais são os mais distintos do centro da cidade (La Joya e Quequeña), embora La Joya fosse muito mais semelhante aos distritos urbanos.

A análise de estrutura populacional realizada por Freitas et al. (2015) com o software structure, demonstrou pela estatística de K que a formação mais provável era de dois grupos (K) homogêneos para as três populações de *Lu. umbratilis* analisadas, e sob essa perspectiva, a população de

Manacapuru (sul do rio Amazonas) formou um grupo e as populações de Rio Preto da Eva (norte do rio Amazonas) e Recife representou o outro agrupamentopopulacional, e esses resultados, apoiados pelas outras metodologias utilizadas, fizeram com que os autores sugerissem que este inseto deveria ser melhor investigado a fim de desvendar se essas populações não pertenceriam, na verdade, a um complexo de espécies.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Oferecer informações extraídas, a partir de caracteres morfológicos das asas e análise filogenética do gene *period*, por inferência bayesiana e Máxima Verossimilhança e verificar a estrutura populacional a fim de contribuir para a separação das espécies crípticas de *Lu. longipalpis* encontradas no Estado do Ceará.

3.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver uma análise de morfometria geométrica alar nos espécimes do complexo *Lu. longipalpis* encontrados no Estado do Ceará.
2. Proceder a uma análise filogenética por inferência bayesiana e Máxima Verossimilhança utilizando o marcador nuclear *period*.
3. Analisar a estrutura genética das três localidades (Caririaçu, Sobral-CE e Bodocó-PE) para cada fenótipo (1S e 2S) e verificar a extensão do complexo *longipalpis* para a cidade de, Bodocó em Pernambuco.
4. Verificar se o critério de separação por manchas abdominais proposto por Mangabeira et al. (1969) é aplicável para a identificação das espécies crípticas de *Lu. longipalpis* do Ceará.

4. Capítulo I

Wing morphometry and *period* gene phylogenetic analysis of *Lutzomyia longipalpis* sand flies from Ceará, Brazil

Nádia Consuelo Aragão¹

E-mail: nadibr2@gmail.com.br

Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior¹

E-mail: sslpaiva@gmail.com

Moises Thiago de Souza Freitas¹

E-mail: moisestsf@hotmail.com

César Raimundo Lima Costa Jr¹

E-mail: cjrs@ig.com.br

Abigail Marcelino dos Santos Silva¹,

Email: abigail.marcelino@gmail.com

Lidiane Gomes da Silva¹

E-mail: lidianegomesp@hotmail.com

Valdir de Queiroz Balbino¹

E-mail: vqbalbino@gmail.com

Carlos Brisola Marcondes^{2*}

*Corresponding author

E-mail: cbrisolamarcondes@gmail.com

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis, a vector of *Leishmania infantum* in the American continent, is constituted by a species complex, with two recognized species. In the present study, wing morphometry was evaluated for the differentiation of cryptic species in Brazilian state of Ceará, previously defined by the *period* nuclear gene and the pattern of abdominal spots in males (1S and 2S), as proposed by Otávio Mangabeira in 1969. Specimens were collected in Sobral and Caririçu municipalities, in Ceará State, Brazil. Right wings of males were photographed and 12 landmarks were digitalized. Analyses of centroid size, Procrustes superimposition, principal components, canonical variate analysis, regression, discriminant analysis, were developed. Genbank data were utilized for the construction of a Bayesian phylogeny from a 525 bp fragment of the *period* gene. Mahalanobis distance between specimens 1S and 2S was 2.0198 with $p < 0.001$. Even being observed a certain overlap in the canonic space observed, *Lu. longipalpis* groups correctly clusterized in crossed reclassification in 80% of 1S and 73.21% of 2S. The *period* gene separated these groups adequately by the analysis utilizing Bayesian inference. Geometric morphometry demonstrated a tendency to separate cryptic species of *Lutzomyia longipalpis* from the state of Ceará, agreeing to the analysis of the *period* gene and the pattern of abdominal spots proposed by Mangabeira in 1969.

Keywords: American Visceral Leishmaniasis Vector; Phlebotomine Sand Flies; Wing Morphometry; *Period* Nuclear Marker.

Introduction

The sand fly *Lutzomyia longipalpis* is distributed from Mexico to Argentina and is considered as the major vector of *Leishmania infantum*, the etiologic agent of visceral leishmaniasis in the American continent (Lainson *et al.*, 1977).

Otávio Mangabeira (Mangabeira, 1969) firstly reported the presence of one or two pairs of abdominal white spots in males of *Lu. longipalpis*, inducing the suspicion of the existence of a species complex in this "species". Several approaches have been utilized to investigate this taxonomic question, including, for example, reproductive isolation between Brazilian populations with different pattern of spots (Ward *et al.*, 1983), association between morphology of spots and pheromones (Lane & Ward, 1984), distribution of morphotypes (Ward *et al.*, 1985), isoenzyme analysis (Mutebi *et al.*, 1999), lovesongs (Souza *et al.*, 2004, Vigoder *et al.*, 2015), pheromone identification (Hamilton *et al.*, 2005) and genetic analysis (Bauzer *et al.*, 2002, Costa Jr *et al.*, 2015, Lins *et al.*, 2008).

Four genetic groups have been recognized in South America by the utilization of *Cox1* mitochondrial marker, and analyzed Brazilian populations were grouped in one clad (Arrivillaga *et al.*, 2002). Additional studies suggested the existence of two groups, mostly differentiated by lovesongs (Souza *et al.*, 2004). In this context, Sobral municipality, in Ceará, is a particular case, due to the presence of two different taxonomic groups, separated by the number of abdominal spots, types of pheromones, lovesongs and genetic markers, even being sympatric (Araki *et al.*, 2009).

Two sister species in *Lu. longipalpis* complex have already been named, the first one in Venezuela, *Lu. pseudolongipalpis*, characterized by mitochondrial genes, morphology of females, ethologic and reproductive differences (Arrivillaga & Feligiangelli, 2001). It was afterwards incriminated as a vector of visceral leishmaniasis in that country (Agrela *et al.*, 2002). A second species, *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938), was redescribed (Martins *et al.*, 1984) and its participation on the complex was hypothesized after analysis of *period* gene and *lovesongs*, when similarities compatible to those found in the sister species were

seen (Vigoder *et al.*, 2010). The females of these sand flies could not yet be differentiated from those of *Lu. longipalpis*, and males presented small differences in external genitalia (Young & Duncan, 1994). Additionally, analysis of microsatellites, pheromones (Watts *et al.*, 2005), *lovesongs* and period gene demonstrated levels of divergence similar to those of sister species (Vigoder *et al.*, 2010). *Lu. cruzi* has been associated to transmission of visceral leishmaniasis in the absence of *Lu. longipalpis* in the Brazilian state of Mato Grosso do Sul-Brasil (Santos *et al.*, 2013).

The *period* nuclear marker, a gene known to be involved in the circadian cycle, has been indicated as useful for the phylogenetic reconstruction below the family level (Regier *et al.*, 1998). The utilization of a fragment of this gene has detected polymorphism variation permitting the separation of the population of *Lu. longipalpis* from Sobral into two subpopulations (1S and 2S) (Lins *et al.*, 2008, Araki *et al.*, 2013), reporting fixation of polymorphisms for these species (Costa Jr *et al.*, 2015).

Geometric morphometry analyses differences among forms of organisms in the same species or phylogenetically related species (Monteiro & Reis, 1999). In medical entomology, it has been utilized to study, for example, questions on geographic populations of vector species (Dujardin *et al.*, 2008), related species (Gurgel *et al.*, 2011, Vidal *et al.*, 2011) and species complexes, obtaining very interesting results. Being a rapid and low-cost technique, it may be associated to other techniques, enhancing the reliability, and better exploring the obtained results (Lorenz *et al.*, 2012).

The present study analyzed by wing morphometry two cryptic species of *Lu. longipalpis* obtained from the municipalities of Sobral and Caririaçu, in Ceará, defined by the abdominal spots, and a phylogenetic analysis by the *period* gene.

Methods

Biological material

Insects were collected from Sobral (3°41'15" S; 40°21'5" W, 70 m a.s.l.), in March 2012, and Caririaçu (07°02'31"S; 39°17'02" W, 713 m a.s.l.), in September 2012. Mean temperatures fluctuated from 23°C to 36°C and annual rainfall from 936 to 1100 mm. Both localities are in BSw_hq climate in accordance to the Köppen climate classification and are inserted in highly xerophillous caatinga (Peel *et al.*, 2007, Pennington *et al.*, 2000). Male specimens of *Lu. longipalpis* were identified by morphology (Young & Duncan, 1994) and separated considering the quantity of abdominal spots (1S or 2S), individually preserved in 96% ethanol and maintained at -20°C. One-hundred sixteen specimens were utilized for the geometric analysis and voucher specimens were deposited into the Reference Entomological Collection of Department of Microbiology, Immunology and Parasitology of Federal University of Santa Catarina.

Special abbreviations (Marcondes, 2007) for genera of sand flies were utilized.

Acquisition of data for geometric morphometry

Right wings of 30 1S sand flies from each locality and 30 2S from Sobral and 26 2S from Caririaçu were photographed, utilizing a MOTIC 2.0 camera, coupled to a trinocular microscope, MOTIC 168, with 2X objective and 3X zoom. Twelve landmarks (Fig. 1) were digitalized and transformed into coordinates in the cartesian plane utilizing TpsDig software v.1.40 (QSC - James Rohlf). All digitalizations were developed by the same user, to reduce the error level (Dujardin *et al.*, 2010).

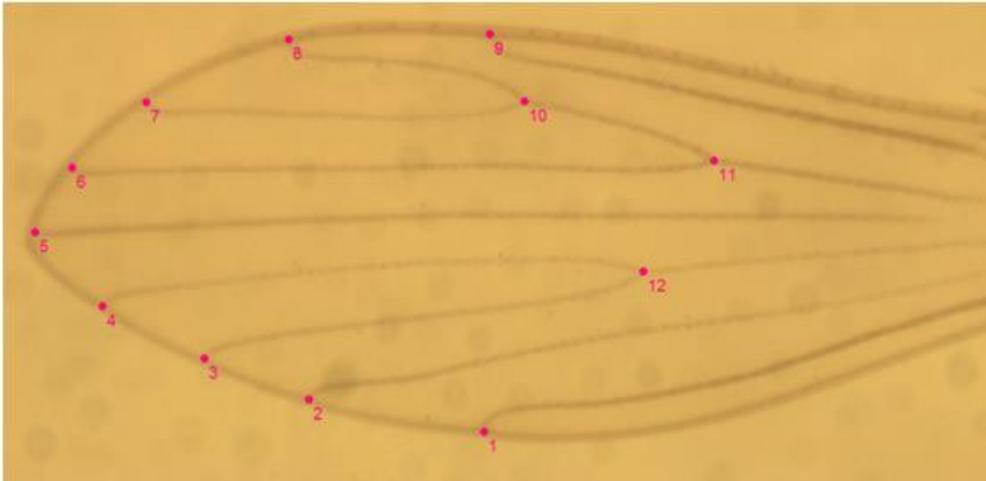


Figure 1 Location of the 12 landmarks in *Lu. longipalpis* wing

Geometric morphometry analysis

Analyses of centroid size, Procrustes superimposition, principal components, canonical variate analysis, regression, discriminant analysis, and Accuracy test (classification and reclassification test) were developed. TpsUtil 1.29, TpsRelw 1.39 (QSC - James Rohlf), MorphoJ 1.02, GraphPad InStat softwares were utilized. Graphs were generated by MorphoJ 1.02 software (Klingenberg, 2011).

Phylogenetic analysis

Seventy-three sequences of *Lu. longipalpis* males, 18 from Sobral and 55 from Caririaçu-CE, already available in Genbank (Costa Jr *et al.*, 2015) from specimens obtained in the same collections of samples utilized for geometric morphometry, were analyzed. Sequence alignment using the Clustal W integrated in the Software Package MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). The phylogenetic tree was generated by Mr. Bayes v 3.2.0[35] with 4000000 generations, using the evolutive model *HKY+I+G*, obtained by JModelTest v 2.1.4 [36]. *Phlebotomus dubosqi* sequence (AY071913) was utilized as an outgroup to give more support to groups (Delavi *et al.*, 2001; Rounq *et al.*, 2010).

Results

Analysis by geometric morphometry

Kolmogorov-Smirnov was initially utilized to check statistic normality of centroids for measuring the size in pixels of right wings of both morphospecies (1S and 2S). Considering only the pattern of abdominal spots and disregarding the locality, a median of 963.35 (Max 1072.4 . Min 814.41) was obtained for 1S insects and 967.66 (Max 1070.1 . Min 799.07) for 2S. T test indicated a non-significant difference, with a p-value of 0.8459.

In the analysis for localities, the median of centroid size for Sobral 1S was 978.24 px (Max 1072.4 . Min 895.1) and for 2S was 988.09 px (Max 1070.1 . Min 892). In Caririaçu, medians were 950.8 px (Max 1047.5 . Min 814.1) for 1S and 937.98 px (Max 1022.5 . Min 799.07) for 2S. Analysis of variance (ANOVA) indicated a very significant difference between the isometric size of populations analyzed by locality and pattern of abdominal spots (p-value = 0.0002). Tukey-Kramer test of multiple comparisons was developed and indicated significant difference between populations with a value of q greater than 3.692 (p-value <0.05). So, differences between Caririaçu 1S and Sobral 1S (q=4.048, P<0.05), Caririaçu 1S e Sobral 2S (q=4.336 e P<0.05) and principally between Caririaçu 2S and Sobral 1S (q=4.973, P<0.01) and between Caririaçu 2S and Sobral 2S (q=5.250, P<0.01). No significant difference between variances in populations 1S and 2S of the same localities were observed.

In Principal Component Analysis (MorphoJ), a correlation between variables was obtained, and three first principal components totaled 67.88% of total variance of samples (PC1 34.81%;PC2 22.35%; PC3 10.72%), not differentiating morphospecies.

Including allometry (influence of size on shape) on canonic variables Mahalanobis distance between specimens 1S and 2S was 1.8572 with p<0.001. Between groups, greater Mahalanobis distance value was 3.0069 for Caririaçu 1S and Sobral 2S specimens and the smaller was 1.8276 for Caririaçu 1S and 2S specimens (p-value <0.001) for the permutation test with 10000 repeats.

Analyzing canonical variables without allometry (Fig. 2) between morphotypes, a canonical variable corresponded to all the observed variation. On the other hand, populations analyzed by locality, the first variable constituted 55.17% of the total variation of shape, the second 31.38% and the third 13.45%. Mahalanobis distance of 2.0198 with $p < 0,001$ between morphotypes. Higher Mahalanobis distance between groups was 2.9416 for specimens of 1S from Caririaçu and 2S from Sobral and lower was 2.0325, between specimens 1S from Sobral and 1S from Caririaçu (p -value < 0.001) for the permutation test with 10000 repeats.

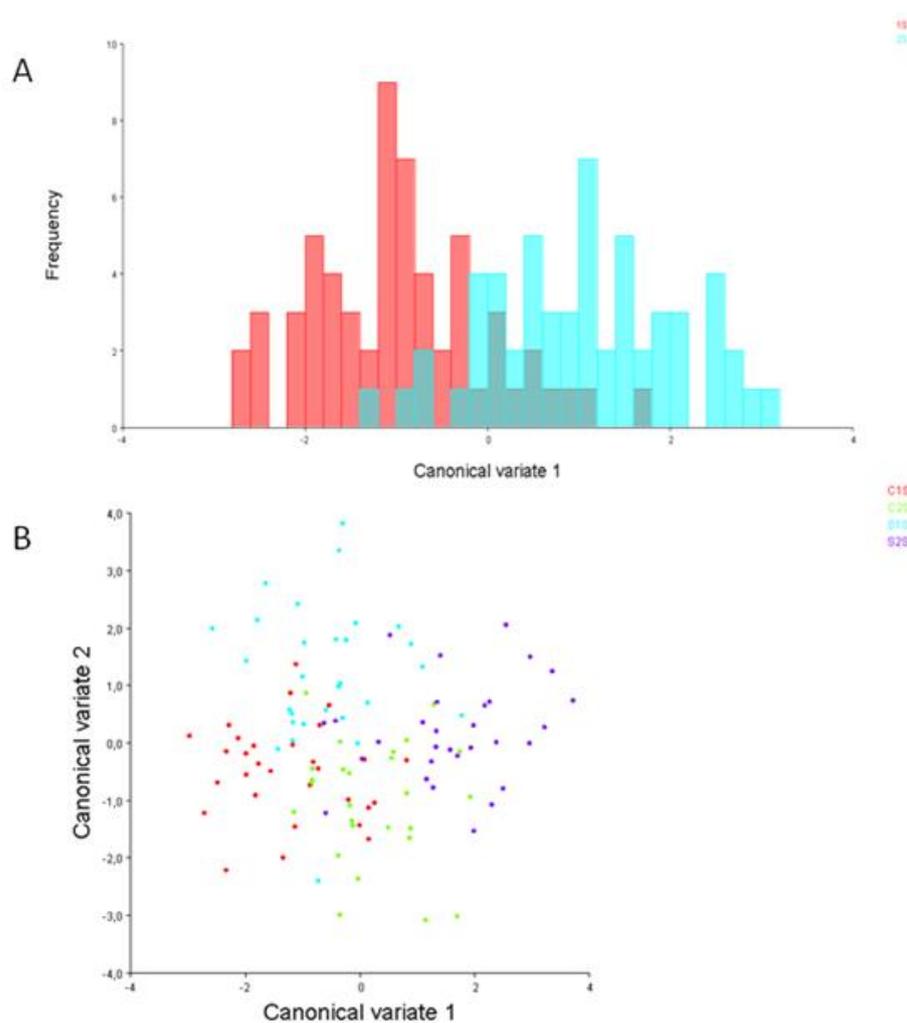


Fig. 2 Graphs of canonical variations without allometry, demonstrating separation of morphotypes with two and one abdominal spots (A) and between populations of *Lu. longipalpis* from Sobral and Caririaçu-CE (B). Populations: Caririaçu 1S, Caririaçu 2S, Sobral 1S and Sobral 2S. Morphospecies 1S (Caririaçu 1S e Sobral 1S) and 2S (Caririaçu 2S and Sobral 2S).

In discriminant analysis of morphotypes, 80% of individual insects 1S and 73.21% of 2S were correctly reclassified. Between groups in localities, the best proportions of reclassifications were those between Caririaçu 1S and Sobral 2S, in which 80% of 1S individuals and 76.66% of 2S were correctly reclassified. The worst proportions in the cross-validation test were between Caririaçu 2S and Sobral 2S, whose proportions of individuals correctly reclassified for 1S and 2S were respectively 61.54% and 60% (Table1).

Table 1 Percentage of correct identification in the reclassification test comparing populations of *Lu. longipalpis* from Sobral and Caririaçu-CE.

Populations	Reclassification hits (%)	
Caririaçu 1S X Caririaçu 2S	70	73,33
Caririaçu 1S X Sobral 1S	70	56,66
Caririaçu 1S X Sobral 2S	80	76,66
Caririaçu 2S X Sobral 1S	65,38	66,66
Caririaçu 2S X Sobral 2S	61,54	60
Sobral 1S X Sobral 2S	73,33	70

Populations: Caririaçu 1S, Caririaçu 2S, Sobral 1S and Sobral 2S.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis identified two monophyletic clades in *Lu. longipalpis* with support de 0.5301 for 1S morphotypes and 0.4855 for morphotypes 2S. Even not indicating a geographic separation between taxa, phenotypic groups 1S e 2S were adequately separated (Fig. 3).

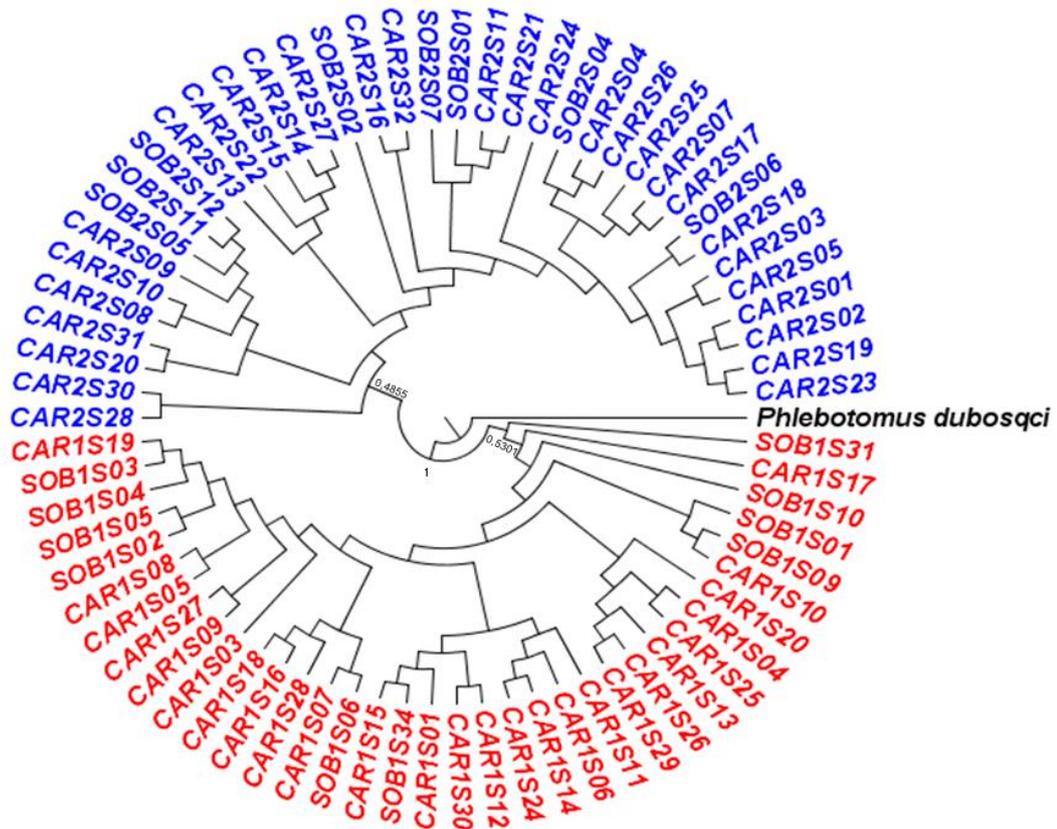


Figure 3 Phylogenetic tree ó Bayesian inference of *Lu. longipalpis* sequences from Sobral and Carriáçu-CE, utilizing fragment 525bp of *period* gene and *Phlebotomus dubosqi* sequence as a outgroup.

Discussion

Sister species of *Lutzomyia longipalpis* complex found in Sobral-CE are considered as "sympatric cryptic species", and most genetic, biochemical, and behavioral (courtship sounds and reproductive isolation) tests applied to these populations can separate them or indicate a separation according to the criterion of abdominal spots proposed by Mangabeira in 1969.

Morphological characterization has always been an impasse for the nomination of these species. Azevedo *et al.* (2000) investigated by classical morphometry and biochemistry populations of *Lu. longipalpis* from five Brazilian states, including Ceará (municipality of Canindé), and could not characterize one and two spots populations evaluating structures of head, thorax, and abdomen of insects. For the population from Ceará, only the length of a flagellomere (F14) was significantly different.

In the present study, no isometric size of morphospecies was significantly different, but when populations from two localities separated by 553,3 km and with an altitudinal difference of 643 m, a great difference between Caririaçu and Sobral populations was shown. Altitudinal variations may influence the size of structures (Dujardin, 2008, Lorenz *et al.* 2014), and previous studies on *Lu. longipalpis* (De la Riva *et al.*, 2001) and *Nyssomyia intermedia* (Marcondes *et al.*, 1999) have also shown significant variations associated to altitude and other factors.

When the shape was analyzed eliminating the effect of size in the canonical variables without allometry, the result was very significant and the Mahalanobis distance between morphotypes was 2.0198, indicating a proximity between them. Godoy *et al.* (2014) analyzed 13 landmarks among three previously described species of *Lutzomyia* involved in the transmission of *Leishmania braziliensis*: *Ny. intermedia*, *Ny. neivai* and *Ny. whitmani*, and found Mahalanobis distance of 1.64 between *Ny. intermedia* and *Ny. neivai*, considered as "cryptic species", and of 2.83 between *Ny. neivai* and *Ny. whitmani*. Vector insects of other groups difficult to differentiate by morphology also were successfully separated by geometric morphometry. Lorenz *et al.* (Lorenz *et al.*, 2012), utilizing 18 landmarks, found Mahalanobis distance of 3.50 entre *Anopheles cruzii* and *A. homunculus*, whose females are morphologically similar. The distance between *A. cruzii* and *A. bellator* was 4.58, and 4.32 between *A. homunculus* and *A. bellator*.

In the analysis by localities, Mahalanobis distances were a little greater (2.9416 for specimens 1S from Caririaçu and 2S from Sobral) and smaller distance was 2.0325, between Sobral 1S and Caririaçu 1S.

Genetically distinct populations of *Lutzomyia longipalpis* complex from Toro Toro (T) and Yuncas (Y), in Bolivia, to new populations from Bolivia (U and R) and Nicaragua (N), considering origin, behavior, pattern of abdominal spots and reports of *Leishmania infantum* transmission were compared by geometric morphometry, utilizing five landmarks. Mahalanobis distances between populations varied from 6.4 (N and Y/Re Y) to 22.1 (R and U) and discriminant analysis separated samples in two groups, N Y R and U T. The values of reclassification varied from 60% (N) to 76% (T), and the first group included samples with one or two abdominal spots, from localities in low and high altitudes and insects related or not to active transmission of *Leishmania*. While those in the second group had two spots, came from high altitude localities, and had no known epidemiological role, being less conflicting the genetic diagnosis for these populations (De la Riva *et al.*, 2001).

The superposition of canonical morphospace in our graphs for morphospecies and populations of *Lu. longipalpis* also was observed for species previously studied (Lorenz *et al.*, 2012, Godoy *et al.*, 2014). However, in the accuracy analysis, groups analyzed by reclassification indices through cross validation for morphospecies were between 70% and 83.33%, which are values near those observed for species recognized as distinct in *Anopheles* (Lorenz *et al.*, 2012), even with some superposition of canonical morphospace. This demonstrates that, even being very similar, as observed by Mahalanobis distances, these groups may be separated. *Nyssomyia intermedia* and *Ny. neivai* were wrongly identified (29/104), that is, only 73.12% were correctly identified after cross validation, while six and 11 of 104, respectively between *Ny. whitmani* and *Ny. neivai* and between *Ny. whitmani* and *Ny. intermedia* were wrongly identified after cross validation (Godoy *et al.*, 2014). Our values of reclassification could demonstrate similar or greater values than those for recognized of sand fly species of the same genus.

In Colombia, GM was unsuccessfully utilized to separate *Anopheles spp.* of *albitarsis* complex, since there were no significant results for allometry (P-value = 0.070) or to shape variation (P-value = 0.144 after Bonferroni correction). Groups were separated only through *COI* gene analysis, which evidenced two groups (I an

F) in different localities and both in sympatry in only one municipality (Gomez *et al.*, 2013).

The genetics analysis using 525 bp of *period* marker and Bayesian inference method showed a good differentiation between cryptic species of *Lu. longipalpis* in Sobral, with a better resolution than that previously obtained which used 266 bp and the Neighbor-joining method that was not capable to solve the separation of different genotypic groups (Bauzer *et al.*, 2002). As occurs with the *paralytic* gene (Lins *et al.*, 2008), *period* gene presents fixed polymorphisms differentiating two cryptic species found in Sobral-CE and Bodocó-PE (Costa Jr *et al.*, 2015).

Study using 21 nuclear loci involving sympatric (Sobral 1S and 2S) and allopatric populations of *Lu. longipalpis* ratified the quality of *period* gene as a marker of speciation to morphotypes from Ceará in what introgression was observed, and an association to environmental factors could be inferred, with possible epidemiological consequences, and the authors considered that visceral leishmaniasis has a tendency to urbanization (Araki *et al.*, 2013).

Based on clustering analysis results obtained in this study, the geometric morphometry was shown to corroborate results obtained in previous studies that indicate differences between cryptic species of sand flies from Ceará, as the molecular analysis.

Conclusion

Wing geometric morphometry showed, after clusterization analysis, a tendency to differentiation of sympatric cryptic species of *Lutzomyia longipalpis* complex found in municipalities of Sobral and Caririaçu, agreeing to phenotypic pattern of abdominal spots proposed by Mangabeira in 1969. This result emphasizes the relevance of pattern of spots as morphological markers of these and the importance of the relatively non-expensive technique of geometric morphometry as a good tool for their recognition, corroborating the analysis of the fragment of nuclear gene *period*.

Ethical approval

Ethical approval was not required for the current study

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. Authors' contributions: VQB and CBM designed and supervised the study; NCA, MTSF collected and identified the specimens; NCA and SSLPJ developed the GM and statistical analyses; MTSF, AMSS, NCA and LGS performed the bioinformatics analyses; NCA and CBM wrote the manuscript; CBM translated it to English; CBM and VQB revised the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (IBPG1165-2.02/11), and Ministério da Saúde, Brazil (TC 300/2013). VQB was supported by CNPq, Grant Number 309124/ 2012-3. We are also grateful to the Secretaria de Saúde dos Municípios de Sobral and Caririáçu for assistance and logistic support.

Author details

1 Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia S/N, Cidade Universitária, 50.740-600 Recife, Pernambuco, Brazil. 2 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

References

Agrela, I., Sanchez, E., Gómez, B., Feliciangeli, M.D. (2002) Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 39:440-45.

Araki, A.S., Ferreira, E.M., Mazzoni, C.J., Souza, N.A., Machado, R.C., Bruno, R.V., Peixoto, A.A. (2013) Multilocus analysis of divergence and introgression in sympatric and allopatric sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 7: e245.

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., Brasil, R.P., Peixoto, A. (2009) Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Neglected Tropical Disease*, 3:e365. doi: [10.1371/journal.pntd.0000365](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000365)

Arrivillaga, J.C., Feligiangelli, M.D. (2001) *Lutzomyia pseudolongipalpis*: The first new species within the *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 38:783-90.

[Arrivillaga, J.C.](#), [Norris, D.E.](#), [Feliciangeli, M.D.](#), [Lanzaro, G.C.](#) (2002) Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection Genetics and Evolution*, 2:83-95.

Azevedo, A.C., Monteiro, F.A., Cabello, P.H., Souza, N.A., Rosa-Freitas, M.G., Rangel, E.F. (2000) Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95:305-22.

Bauzer, L.G., Gesto, J.S., Souza, N.A., Ward, R.D., Hamilton, J.G., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A. (2002) Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Molecular Biology and Evolution*, 19:1624-27.

Costa Jr, C.R.L., Freitas, M.T.S., Figueirêdo Jr, C.A.S., Aragão, N.C., Silva, L.G., Marcondes, C.B., Dias, R.V., Leal-Balbino, T.C., Souza, M.B.R., Ramalho-Ortigão, M., Balbino, V.Q. (2015) Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites & Vectors*, doi 10.1186/s13071-015-0785-6.

Dalevi, D., Hugenholtz, P., Blackall, L.L. (2001) A multiple-outgroup approach to resolving division-level phylogenetic relationships using 16S rDNA data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 385-91.

De la Riva, J., Le Pont, F., Ali, V., Matias, A., Mollinedo, S., Dujardin, J.P. (2001) Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 1089-94.

Dujardin, J.P. (2008) Morphometrics applied to medical entomology. *Infection Genetic and Evolution*, 8:875. 890.

Dujardin, J.P., Kaba, D., Henry, A.B. (2010) The exchangeability of shape. *BMC Research Notes*, 3:266; doi: 10.1186/1756-0500-3-266.

Godoy, R.E., Galati, E.A., Cordeiro Estrela, P., Souza, N.A., Santos, T.V., Sousa, L.C., Rangel, E.F. (2014) Comparative study of the phlebotomine sand fly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the genera *Nyssomyia* Barretto, 1962, *Bichromomyia* Artemiev, 1991, and *Migonemyia* Galati, 1995, vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Zootaxa*, 3838:501-17. doi: 10.11646/zootaxa.3838.5.1.

[Gómez, G.](#), [Jaramillo, L.](#), [Correa, M.M.](#) (2013) Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the Albitarsis Complex from Colombia. *Molecular Ecology Research*, 13:1082-92. doi: 10.1111/1755-0998.12126.

[Gurgel-Gonçalves, R.](#), [Ferreira, J.B.](#), [Rosa, A.F.](#), [Bar, M.E.](#), [Galvão, C.](#) (2011) Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Medical and Veterinary Entomology*, 25:84-93; doi: 10.1111/j.1365-2915.2010.00920.x.

[Hamilton, J.G.](#), [Maingon, R.D.](#), [Alexander, B.](#), [Ward, R.D.](#), [Brazil, R.P.](#) (2005) Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 4:480-8.

Klingenberg, C.P. (2011) MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Research*, 11: 353-357.

Lainson, R., Ward, R.D., Shaw, J.J. (1977) Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*, 266: 628-30.

Lane PR, Ward RD. The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). *Cah ORSTOM, Série Entomologia médica et Parasitologia*. 1984; 22:245-9.

Lins, R.M.M.A., Souza, N.A., Peixoto, A.A. (2008) Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 736-40.

Lorenz, C., Marques, T.C., Sallum, M.A.M., Suesdek, L. (2014) Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 7:581. doi:10.1186/s13071-014-0581-8.

Lorenz, C., Marques, T.C., Sallum, M.A.M., Suesdek, L. (2012) Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasites & Vectors*, 5:257.

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

Mangabeira, O. (1938) Sobre duas novas especies de *Flebotomus* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 3:349-56.

Marcondes, C.B. (2007) A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News*, 118:351-356.

Marcondes, C.B., Lozovei, A.L., Falqueto, A., Brazil, R.P., Galati, E.A.B., Aguiar, G.M., Souza, N.A. (1999) Influence of altitude, latitude and season of collection (Bergmann's rule) on the dimensions of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94:693-700.

Martins, A.V., Falcão, A.L., Silva, J.E., Dias, E.S. (1984) Nota sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938) com a descrição da fêmea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 4:439-42.

Monteiro, L.R. & Reis, S.F. (1999) Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: Holos. pp189.

Mutebi, J.P., Alexander, B., Sherlock, I., Wellington, J., Souza, A.A., Shaw, J., Rangel, E.F., Lanzaro, G.C. (1999) Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 61:149-57.

Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A. (2007) Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11:1633-44.

Pennington, R.T., Prado, D.E., Pendry, C.A. (2000) Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal Biogeography*, 27:261-273.

Posada, D. (2008) jModel test: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25:1253-56.

Reigier, J.C., Fang, Q.Q., Mitter, C., Peigler, R.S., Friedlander, T.P., Solis, M.A. (1998) Evolution and phylogenetic utility of the period gene in Lepidoptera. *Molecular Biology and Evolution*, 15:1172-82.

Rong, L.A., [Yan-Zhou](#), Z., Hui-Jie, Q., [Wei-Feng](#), S.H.I., [Murphy](#), R.W., [Chao-Dong](#), Z.H.U. (2010) Outgroup selection in tree reconstruction: a case study of the family Halictidae (Hymenoptera: Apoidea). *Acta Entomologica Sinica*, 53:192-201.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) Mr. Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19:1572-1574.

Santos, M.F.C., Ribolla, P.E.M., Alonso, D.P., Andrade-Filho, J.D., Casaril, A.E., Ferreira, A.M., Fernandes, C.E., Brazzil, R.P., Oliveira, A.G. (2013) Genetic Structure of *Lutzomyia longipalpis* Populations in Mato Grosso do Sul, Brazil, based on microsatellite markers. *PLoS One*, 9:e74268. doi:10.1371/journal.pone.0074268.

[Souza, N.A.](#), [Vigoder, F.M.](#), [Araki, A.S.](#), [Ward, R.D.](#), [Kyriacou, C.P.](#), [Peixoto, A.A.](#) (2004) Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. [Journal of Medical Entomology](#); 5:906-13. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.906>.

[Tamura, K.](#), [Stecher, G.](#), [Peterson, V.](#), [Filipski, A.](#), [Kumar, S.](#) (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 12:2725-2729. doi: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197).

Vidal, P.O., Rocha, L.S., Peruzin, M.C. (2011) Wing diagnostic characters for mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 55: 134-37.

Vigoder, F.M., Araki, A.S., Bauzer, L.G.S.R., Souza, N.A., Brazil, R.P., Peixoto, A.A. (2010) Lovesongs and *period* gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infection Genetic and Evolution*, 6:734-39.

[Vigoder, F.M.](#), [Souza, N.A.](#), [Brazil, R.P.](#), [Bruno, R.V.](#), [Costa, P.L.](#), [Ritchie, M.G.](#), [Klaczko, L.B.](#), [Peixoto, A.](#) (2015) Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. [Parasites & Vectors](#), 8:290. doi: 10.1186/s13071-015-0900-8.

Ward, R.D., Ribeiro, A.L., Ready, P.D., Murtagh, A. (1983) 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*, 78:269-280.

Ward, R.D., Ribeiro, A.L., Ryan, L., Falcão, A.L., Rangel, E.F. (1985) The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2:145-148.

Watts, P.C., Hamilton, J.G.C., Ward, R.D., Noyes, H.A., Souza NA, Kemp SJ, Feligiangelli, M.D., Brazil, R., Maingon, R.D. (2005) Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73:734-43.

Young, D.G. & Duncan, M.A. (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). *Memories of the American Entomological Institute*, 54:1-881.

5. Capítulo II

RESEARCH

Open Access

Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene *period* among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil

César Raimundo Lima Costa Jr.¹, Moisés Thiago de Souza Freitas¹, Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Jr.¹, Nádia Consuelo Aragão¹, Lidiane Gomes da Silva¹, Carlos Brísola Marcondes², Raimundo Vieira Dias³, Tereza Cristina Leal-Balbino⁴, Manuella Barbosa Rodrigues Souza¹, Marcelo Ramalho-Ortigão⁵ and Valdir de Queiroz Balbino^{1*}

Abstract

Background: Even one hundred years after being originally identified, aspects of the taxonomy of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, the principal vector of *Leishmania infantum* in the Americas, remain unresolved for Brazilian populations of this vector. The diversity of morphological, behavioral, biochemical, and ethological characters, as well as the genetic variability detected by molecular markers are indicative of the presence of a complex of species.

Methods: In this study, a 525 bp fragment of the *period* gene was used to evaluate sympatric populations of *L. longipalpis*. A combination of probabilistic methods such as maximum likelihood and genetic assignment approach to investigate sympatric species of *L. longipalpis* were applied in three populations of Northeast Brazil.

Results: Fixed polymorphisms in geographically isolated populations of *L. longipalpis* from two localities in the state of Ceará and one in the state of Pernambuco, Brazil, was identified in a 525 bp fragment of the gene *period* (*per*). Our results suggest a direct relationship between the number of spots found in males' tergites and the genetic variation in cryptic species of *L. longipalpis*. The fragment used in this study revealed the nature of the ancestral morphotype 1S.

Conclusion: New polymorphisms were identified in the gene *per* which can be used as a genetic barcode to sympatric taxonomy of *L. longipalpis*. The *per* gene fragment confirmed the presence of two sibling species of *L. longipalpis* in Sobral and showed that these same species are present in two other localities, representing an expansion within the *L. longipalpis* species complex with regards to the states of Ceará and Pernambuco.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis* complex, *Period* gene, Fixed polymorphism

Background

A species complex is generally defined as a group of morphologically similar species that differ with regards to genetic and ethological aspects [1]. Low flight range and geographic isolation between populations are major drivers of allopatric speciation, contributing to constitution of cryptic species in Phlebotomine sand flies [2-4]. The occurrence of cryptic species is a fairly common

event in other disease vectors and have been described in *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens*, *Triatoma dimidiata* and phlebotomines [5-8].

Lutzomyia longipalpis, the principal vector of *Leishmania infantum*, the etiologic agent of American visceral leishmaniasis, has a discontinued distribution throughout the Neotropical region with different populations displaying aspects compatible with those of a species complex [9,10]. The existence of cryptic species in the *Lutzomyia longipalpis* complex was supported by studies using morphological and molecular markers in populations from Central and South America leading to the identification of *L. pseudolongipalpis* [11], formally recognized

* Correspondence: vcbalbino@gmail.com

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia S/N, Cidade Universitária, 50740-600 Recife, Pernambuco, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Lima Costa et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

as the first taxon of the *L. longipalpis* complex (reviewed by [12]). Later, it was also suggested that *L. cruzi* should be regarded as a cryptic species within the *L. longipalpis* complex [13].

In Brazil, the presence of a *Lutzomyia longipalpis* complex was first proposed by Mangabeira [14] and was based on the number of abdominal pale spots, one (1S) or two (2S), visible on abdominal tergites. Analyses of male sexual pheromones and courtship (mating) sounds, as well as microsatellite markers and speciation genes, have provided further evidence of a *L. longipalpis* species complex [10].

The gene *period* (*per*) controls biological rhythms and plays a central role in eclosion and insect locomotion activity [15,16]. *Per* has been used in studies of fruit flies (*Drosophilidae*) population genetics and has been shown to be a useful marker, especially when it comes to identifying cryptic species [17,18]. In sand flies, *per* has also been utilized in studies of population genetics to identify possible members of the *L. longipalpis* complex in Brazil. Combined with certain behavioral markers (e.g. male mating songs and the types of sexual pheromones produced), analysis of the variability of *per* suggested the existence of two major population groups of *L. longipalpis* in Brazil. One group, with at least five species, is found in most localities where *L. longipalpis* has been reported. This group displays a single spot (1S) on the abdominal tergites, but different pheromones and patterns of pulsating songs. The second group, with two spots (2S), is represented by a single species present in the North, Northeast and Southeast regions of Brazil. Males in this group produce Eurst-type songs and the pheromone *combretene-1* [19].

The NE region in Brazil is the region with the highest index of visceral leishmaniasis [20], and studies demonstrated the presence of at least two sister species within *L. longipalpis* complex [19,21,22]. In Sobral, State of Ceará, these species occur in sympatry and can be separated based either on their abdominal spots 1S or 2S, the different mating songs, the types of pheromones, or the genetic composition of males [25]. Hence, genetic markers related to the abdominal spots may indeed be an important tool for molecular taxonomy of the *L. longipalpis* complex, especially concerning eco-epidemiological studies to assess potential vectorial capacity between distinct populations.

Here, we investigated the presence of polymorphisms in the gene *per* and their relatedness to the number of abdominal spots in *L. longipalpis* males. Sand flies from three localities in the NE of Brazil, separated by distances ranging from 108 km to as much as 457 km from each other, were used for our analyses. Four novel fixed single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified, some able to separate between the 1S and 2S flies. In addition,

our results point to an ancestral origin of the morphotype 1S. This study contributes to the understanding of the natural history of *L. longipalpis* populations and provides new insights about the biogeography of this sand fly.

Methods

Field collection and identification of phlebotomine sand flies

Sand fly trappings were carried out in Sobral (3°41' 15"S; 40°21' 5"W) and Carriacú (07°02' 31"S; 39°17' 02"W) in the State of Ceará, and in Bodocó (07°46' 42"S, 39°56' 28"W) in the State of Pernambuco, Brazil. All locations included in this study have a BSwH' climate in accordance to the Köppen climate classification [24], with temperatures ranging from 23°C to 36°C and low annual rainfall (936 mm to 1100 mm). The localities included in this study are fully inserted in Caatinga biome, with vegetation composed mainly of ligneous and herbaceous species with high degree of xerophily [25].

Sand flies were trapped in the surrounding houses and domestic animal shelters using five CDC-type miniature light traps positioned at approximately 0.6 m from the ground. Sand flies were identified according to Young and Duncan [26], and *L. longipalpis* males were separated based on the number of abdominal spots into 1S and 2S.

DNA extraction, PCR and sequencing

Genomic DNA was extracted from each specimen using 100 µl of Chelex® resin (Bio-Rad, Hercules, CA) based on the protocol described by Solano et al. [27] with modifications. Briefly, each sand fly was homogenized using a hand held homogenizer and pestle in 10% Chelex solution followed by incubation at 56°C for an hour. Sample lysates were incubated at 95°C for 30 min, centrifuged for 6 min at 13,000 × g, and each supernatant was removed and stored at -4°C.

For each DNA sample isolated, a segment of 525 bp of *per* [28] was amplified by PCR using the Master Mix kit (Promega, Fitchburg, WI). PCRs were carried out using a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Ramsey, MN) as follows: 5 min at 95°C, and 30 cycles of 45°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. A 5 µl aliquot from each PCR product was separated on 0.5% agarose and the remainder was purified using the Genomic DNA Purification Wizard kit (Promega, Fitchburg).

Bi-directional sequencing reactions were performed on each purified PCR product using the BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed using an ABI3100 Sequence Analyzer (Applied Biosystems, Foster City). Each sample was sequenced in duplicate and the sequences obtained were

Table 1 Neutrality tests and intra-population genetic diversity measures for each sample

Samples	Tajima's <i>D</i>	N	Hd	$\pi \pm SE$	NS	h	k
Bodoó 1S	-1.00413	30	0.959	0.00584 ± 0.00094	20	20	3.595
Bodoó 2S	-0.48148	24	0.986	0.00885 ± 0.00089	20	21	4.649
Carriáçu 1S	-0.30285	28	0.997	0.01392 ± 0.00108	31	27	7.110
Carriáçu 2S	0.37792	31	0.994	0.01058 ± 0.00056	20	28	5.553
Sobral 1S	0.17037	35	1.000	0.01648 ± 0.00108	34	35	8.652
Sobral 2S	0.46447	23	0.996	0.01162 ± 0.00089	20	22	6.108
Total	-0.05022	171	0.997	0.01901 ± 0.01901	55	149	9.980

Tajima's *D*; Tajima test of neutrality; N; sample size; Hd; Haplotype diversity; $\pi \pm SE$; nucleotide diversity and standard error (SE); NS, Number of polymorphic sites; h, Haplotype; k, average number of nucleotide differences. *p < 0.05.

assembled and analyzed with the Staden package [29] based on the values of *Phred* 40 [30]. The high-quality sequences obtained were deposited in GenBank (accession numbers KF479047-KF479163 and KP013849-KP013902).

Population genetics

Sequence alignment was performed using the program ClustalW (MEGA v.5.1), and the conserved and variable sites (parsimony informative and singletons sites) also were verified using MEGA v.5.1 [31]. The analyses of polymorphisms and the neutrality tests were performed using DnaSP 5.10.1 [32]. For optimal viewing of polymorphisms, parsimony-informative sites

were exported to compose sequence logos obtained by Weblogo v. 3.2 [33].

The genetic structuring of the *L. longipalpis* populations was verified using sequences alignment throughout STRUCTURE v.2.3 [34], with model-based approach. This algorithm clusters individuals into populations. The assigned proportion of each individual belonging to each population (membership coefficient *Q*) was estimated using Bayesian statistics and Markov Chain Monte Carlo simulations (MCMC). MCMC simulations were performed with 100,000 interactions of burn-in period and followed by one million steps. For each value of *K* (1 to 10), 10 interactions were performed

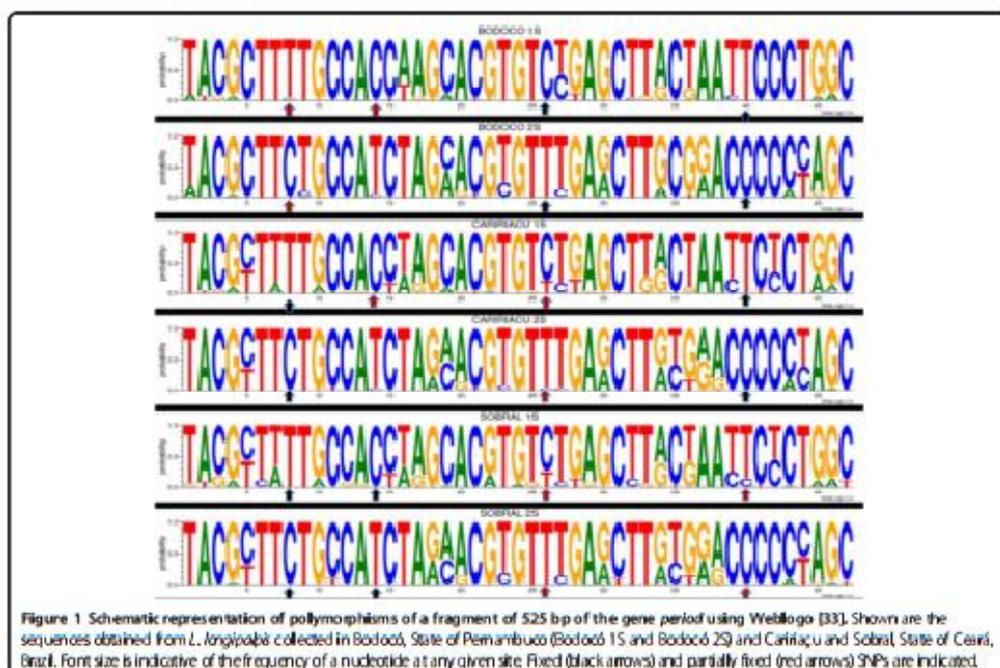
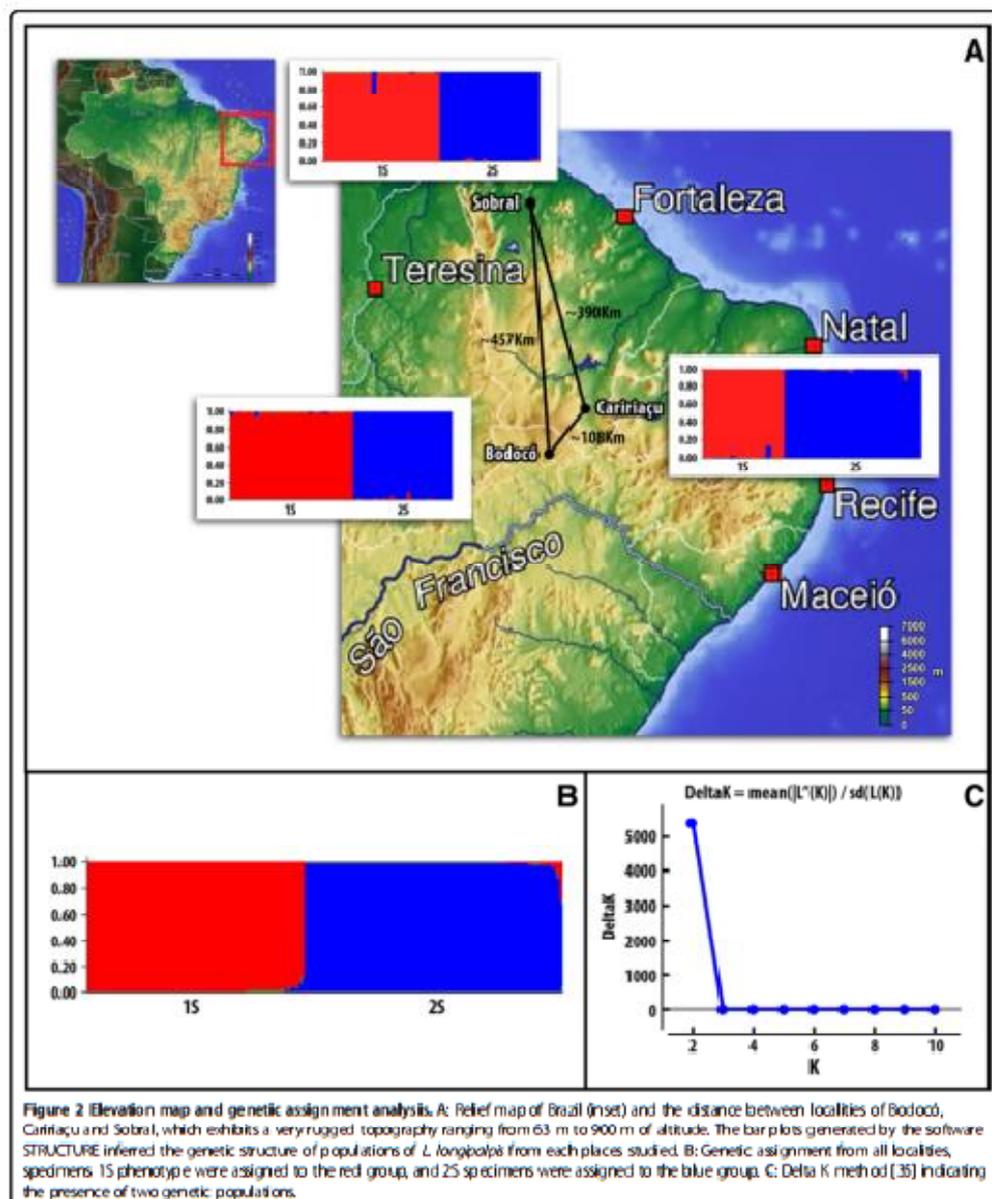


Figure 1 Schematic representation of polymorphisms of a fragment of 525 bp of the gene *period* using Weblogo [33]. Shown are the sequences obtained from *L. longipalpis* collected in Bodoó, State of Pernambuco (Bodoó 1S and Bodoó 2S) and Carriáçu and Sobral, State of Ceará, Brazil. Font size is indicative of the frequency of a nucleotide at any given site. Fixed (black arrows) and partially fixed (red arrows) SNPs are indicated.

in order to estimate the K values, and the most likely population (or cluster) number was determined by the ΔK analysis [35]. Matched F_{st} and M_N values [36] were obtained through the Arlequin v3.1 software [37], using 1000 random permutations. Population structure was verified by the utilization of AMOVA [37], based on the evaluation of different hierarchical groups.



Phylogenetic analysis

For the UPGMA tree, the F_{st} values were imported into MEGA V. 5.1 software. The jModeltest v.0.1.1 software was used to select the best-fit DNA substitution model for ML analysis based on the Akaike information criterion (AIC) algorithm [38]. The best-fit model for the *per* sequence analyzed was the $TVM + I + G$. The maximum likelihood (ML) tree for *per* sequences was calculated using PhyML v. 3.0 [39].

Results

Following identification and sequencing of the sand flies collected, we obtained a total of 171 sequences of the gene *per* from *L. longipalpis* males, being 58 (35 1S and 23 2S) from Sobral, 59 (28 1S and 31 2S) from Caririçu, and 54 (30 1S and 24 2S) from Bodocó. Tests such as Tajima's neutrality, haplotype diversity, nucleotide diversity, and average number of nucleotide differences for each population studied are summarized in Table 1. Analysis of the parsimony informational sites identified four fixed single nucleotide polymorphisms (SNP) within the 525 bp fragment of *per* used in our analyses. All SNPs can be utilized to separate phenotypes. The SNP identified on nucleotide position T124C (the first and second nucleotides occur in 1S and 2S phenotypes, respectively) located within exon 1, is fixed in *L. longipalpis* from both localities in Ceará. The SNP identified in position C424T (within exon 2) is fixed in the *L. longipalpis* from Bodocó and Caririçu. The SNP at position C171T also separates the two phenotypic forms (1S and 2S) and is fixed in *L. longipalpis* from Sobral only. In contrast, the SNP at position T256C, which also separates 1S from 2S, is present in the *L. longipalpis* from Bodocó only (Figure 1).

In the genetic assignment analyses of *L. longipalpis*, with each population assessed separately, two distinct genetic groups associated with abdominal spots were observed and each sequence possessing a probability (Q) greater than 80% to belong to each genetic group (Figure 2A). When sequences from all three places were combined, the genetic assignment test indicated the presence of two genetic groups associated with 1S and 2S morphotypes, as suggested by the peak of Δk indicating the presence of two genetically distinct populations (Figure 2B and 2C, respectively).

Similarly, when F_{st} was used to verify the genetic structuring in the three localities (Bodocó, Caririçu and Sobral), the presence of two morphotypes related to 1S and 2S were again observed. The *L. longipalpis* 1S populations of Bodocó, Caririçu and Sobral display low F_{st} values when compared to each other, forming a genetically similar group (Group 1S). A similar pattern was observed when comparing the 2S populations amongst themselves. However, the F_{st} value were the

highest when comparing different phenotypes, even from the same location (Table 2). The tree of distances obtained from F_{st} values exhibited a phylogeographic profile with Bodocó population more distant from Ceará populations, when comparing pairs of phenotypes (Figure 3). Utilizing these groups, AMOVA showed significantly the highest percentage of variation between 1S and 2S groups (Table 3).

The maximum likelihood tree showed a geographical separation between taxons. Although, the phenotypic groups were separated, indicating an ancestral nature of the 1S clade, supported by the monophylic nature of the 2S group with 55% bootstrap value (Figure 4).

Discussion

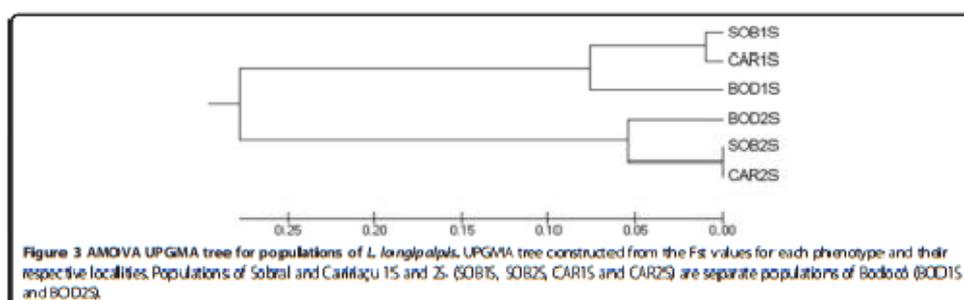
The composition of the *L. longipalpis* complex is still a rather controversial topic even though the distribution of this sand fly in Brazil strongly suggests the presence of at least five species as part of this complex [10,19].

Our assessment of polymorphism frequency in the *per* gene in different populations of *L. longipalpis* revealed for the first time the presence of two fixed polymorphisms (124 and 424) that can reliably be used to separate 1S and 2S phenotypes. The SNP at position T124C was previously reported in *L. longipalpis* populations collected in the town of Jaiba, Minas Gerais, located 1,347 km from Sobral and 1,040 km from Caririçu [19]. The SNP at position C424T was identified

Table 2 Genetic differentiation among samples

Populations	F_{st}	Nm	Dxy	Da	Ss	Sf
Sobral 1S Caririçu 1S	0.00892	2.86330	0.01549	0.00029	26	0
Sobral 1S Sobral 2S	0.90016	2.73255	0.02787	0.01382	11	2
Sobral 1S Caririçu 2S	0.48584	0.25225	0.02611	0.01258	9	1
Caririçu 1S Sobral 2S	0.53515	0.27071	0.02723	0.01445	9	3
Caririçu 1S Caririçu 2S	0.52220	0.28608	0.02542	0.01317	9	2
Sobral 2S Caririçu 2S	0.00000	27.22473	0.01097	0.00000	16	0
Bodocó 1S Sobral 1S	0.15423	0.51128	0.01379	0.00213	16	0
Bodocó 1S Caririçu 1S	0.15249	0.52877	0.01225	0.00187	16	0
Bodocó 1S Bodocó 2S	0.66122	0.54538	0.02317	0.01532	8	2
Bodocó 1S Sobral 2S	0.64012	0.41809	0.02566	0.01642	7	3
Bodocó 1S Caririçu 2S	0.62698	0.44627	0.02399	0.01528	6	1
Bodocó 2S Sobral 1S	0.90950	0.46142	0.02583	0.01316	7	1
Bodocó 2S Caririçu 1S	0.54926	4.08197	0.02527	0.01388	8	2
Bodocó 2S Sobral 2S	0.10863	4.21063	0.01149	0.00125	12	0
Bodocó 2S Caririçu 2S	0.10793	inf	0.01089	0.00118	12	0

F_{st} : pair-wise genetic differentiation; Nm: number of migrants per generation; Dxy: average number of nucleotide substitutions per site between populations; Da: number of net nucleotide substitutions per site between populations; Ss: number of shared polymorphisms between pairs of populations; Sf: number of fixed differences between pairs of populations.



in *L. longipalpis* populations from Bodocó and Caririáçu. Two additional SNPs, at positions C171T and T256C can be used as coadjuvants to separate between the 1S and 2S *L. longipalpis* morphotypes from Sobral and Bodocó, respectively. Although all polymorphisms are synonymous, the combined SNPs can be used as markers for cryptic species in *L. longipalpis*.

The importance of the ML method for the detection of recent speciation events also was previously shown [40–42]. The Bayesian and ML approaches for *L. longipalpis* collected in Bodocó, Caririáçu and Sobral indicate the presence of two genetically separated populations, and that each collected sample belongs to either 1S or 2S morphotype. Our analyses also indicated that these two genetically distinct populations are related to abdominal spots, as previously suggested for sympatric populations of *L. longipalpis* [21–23].

Analysis the 525 bp fragment of *per* in sand flies from Sobral showed greater separation between the two morphotypes, even when genetic distance methodology was used (Additional file 1: Figure S1). A Neighbor-joining tree added to the population genetic structure analyses confirmed the presence of cryptic species occurring in sympatry in Sobral, as noted by Bauzer et al. [23]. In that case, the presence of a haplotype shared by distinct

morphotypes was observed. In contrast, our analyses using a greater number of polymorphisms revealed patterns of total association between phenotypes and genotypes [22,43].

As the number of shared haplotypes observed was lower in the 525 bp fragment of *per* in comparison to the 266 bp fragment (15 shared haplotypes versus 26, Additional file 2: Table S1), it was suggestive of the ability of the 525 bp *per* to detect greater genetic variation in *L. longipalpis* populations. Analyses by AMOVA of the results obtained with the 525 bp fragment confirmed a greater variation between phenotypically distinct groups characterized by the association of a pattern of abdominal spots and the genetic marker not previously reported for *L. longipalpis* populations.

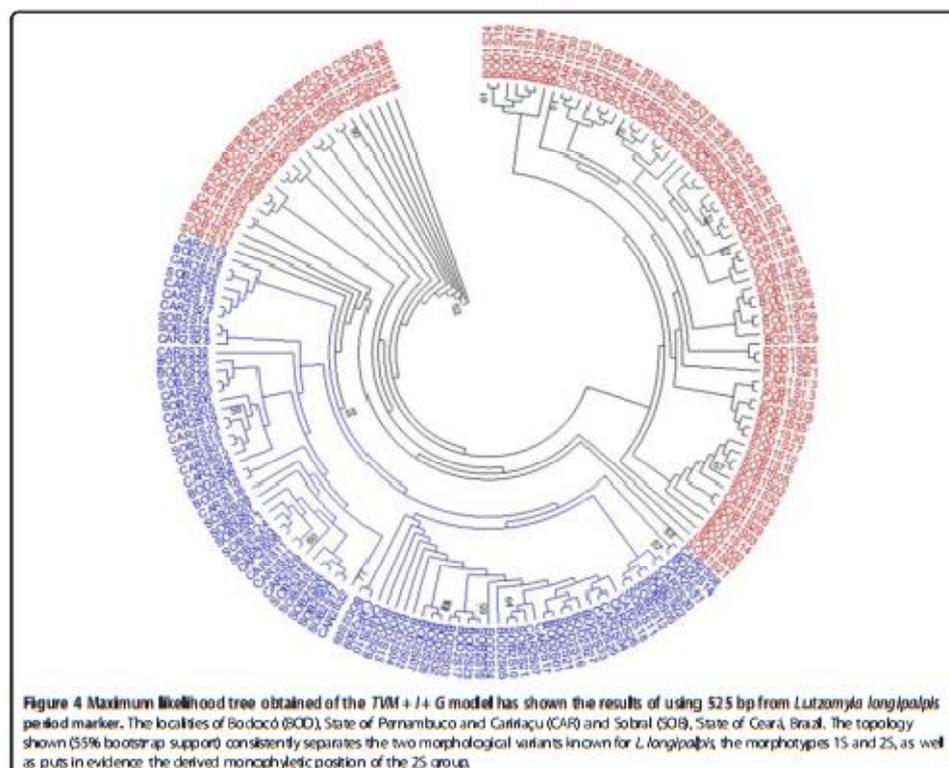
In Sobral, *L. longipalpis* is described as distinct populations of two sympatric species, and commonly separated by the 1S and 2S phenotypes. Genetic markers, copulatory sounds, and sex pheromones have been characterized for each of the *L. longipalpis* populations found in Sobral and have been used to confirm the separation conferred by the 1S/2S phenotypes [19,23,44,45]. Conversely, *L. longipalpis* collected in the localities of Bodocó and Caririáçu are, according to our data, two genetically distinct populations, and the results observed, match the pattern of abdominal spots described in the sympatric populations [22,23,43]. Thus, as *L. longipalpis* from Bodocó and Caririáçu exhibit the same phenotypic and genetic patterns of populations found in Sobral, it is likely that these two populations also share chemical and behavioral characteristics similar to what was previously described for the *L. longipalpis* found in Sobral.

Our group previously reported on a secondary contact between *L. longipalpis* populations that were separated by the original course of the São Francisco River [46]. This secondary contact between the 1S populations of the Brazilian SE and NE may have promoted the genetic diversity of 1S. It also further reinforced the hypothesis that 2S actually derives from 1S, in accordance to the maximum likelihood tree.

Table 3 AMOVA results for *L. longipalpis* populations

Source of variation	df.	Percentage of variation
Among groups	1	50.69
Among populations within groups	4	4.28
Within populations	166	45.04
Total	170	
F_{SC} (haplotypes/populations within group)		0.08672
F_{ST} (haplotypes/populations/groups)		0.54963
F_{CT} (populations/groups)		0.50067

Phenotype Groups: 1S (Bodocó 1S, Caririáçu 1S and Sobral 1S), and 2S (Bodocó 2S, Caririáçu 2S and Sobral 2S).



Conclusion

Understanding the complex population genetics of *L. longipalpis* and its pattern of distribution is critical in areas with high endemicity for the transmission of visceral leishmaniasis, such as the current situation in the state of Ceará in Brazil. The genetic analyses using the 525 bp fragment of the *per* gene revealed for the first time a moderate geographical structuring between the *L. longipalpis* populations, and a significant variability with regards to the 1S and 2S phenotypes. The results presented here also underscore the importance of the abdominal spots for the diagnosis of cryptic species of sympatric populations of the *L. longipalpis* complex in Brazil, and the use of *per* as an important barcode marker to populations of *L. longipalpis*. Further confirmation of the fixed SNPs identified in *per* and its application as taxonomic markers to differentiate sympatric *L. longipalpis* populations across Brazil is warranted.

Ethical approval

Ethical approval was not required for the current study.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Neighbour-joining phylogenetic tree of the *L. longipalpis*. Tree was constructed using the 525 bp fragment of the gene *per* obtained by PCR amplification of DNA extracted from *L. longipalpis* collected in Sobral, State of Ceará, Brazil. The tree shows the two phenotypic forms (1S and 2S) with bootstrap values of 67%. The parameters used for the reconstruction of the cladogram were the same as in Bauer et al. [23].

Additional file 2: Table S1. Haplotypes frequency. Frequency of haplotypes generated with the fragment of 265 and 525 base pairs.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VQB and CRJC designed and supervised the study; MTF, CASF, NCA, LGS, RWQ, TCLB performed the bioinformatics and molecular analyses. CBM, MBR,

MRO revised the manuscript; VQB, CRUCJ revised the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (APO-0651-2.02/10), and Ministério da Saúde, Brazil (TC 300/2013). VQB was supported by CNPq Grant Number 309124/2012-3. We are also grateful to the Secretaria de Saúde do Município de Sobral for assistance and logistic support.

Author details

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia S/N, Cidade Universitária, 50.740-600 Recife, Pernambuco, Brazil. ²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. ³Centro de Controle de Zoonoses, Rua Finlândia S/N, Parque Silvana II, 62010-970 Sobral, Ceará, Brazil. ⁴Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Avenida Professor Moraes Bogo S/N, Cidade Universitária, 50740-465 Recife, Pernambuco, Brazil. ⁵Department of Entomology, Kansas State University, W. Waters Hall 123, 66506-400 Manhattan, KS, USA.

Received: 31 October 2014 Accepted: 5 March 2015
Published online: 01 April 2015

References

- Bolford D, Lehman DJ, Sodhi RS, Ng PHL, Meier R, Winkler K, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol*. 2007;22:1-8-55. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Alexander JB. Diapers of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *J Med Entomol*. 1987;24:552-58.
- Morison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49:69-75.
- Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres AG, Ferro C, Munstmann IE. Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group venezuanum (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia). *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:13-22.
- Anderson TJ, Hautzold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Molinero R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of populational structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*. 2003;17:1467-82.
- Krzywicki J, Besansky NJ. Molecular systematics of *Anopheles* from subgenus to subpopulations. *Annu Rev Entomol*. 2003;48:111-39.
- Adler PH, Chéze RA, Post RL. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infect Genet Evol*. 2010;10:846-65. doi:10.1016/j.meegid.2010.07.003.
- Monteiro F, Paretolchini T, La zoski C, Harris K, Dotson E. Phylogeographic patterns and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas disease vector *Triatominae dimidiatus*. *PLoS One*. 2013;8:e70774.
- Lainson R, Rangil BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:811-27.
- Bauzer LGSR, Souza NA, Maigoni RDC, Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:1-12.
- Ambrillaga JC, Feldengell MD. *Lutzomyia psittaculipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curatigua, Lara State, Venezuela. *J Med Entomol*. 2001;38:783-90.
- Soares RP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc*. 2008;75:301-30.
- Vigoder FM, Anaki AS, Bauzer LGSR, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA. Lovesongs and perid od gene polymorphisms indicate *Lutzomyia ovalis* (Angaité, 1939) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect Gen Evol*. 2010;10:734-39. doi:10.1016/j.meegid.2010.05.004.
- Mangabeira O. Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Rev Bras Malariol Trop*. 1969;21:3-26.
- Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 1990;343:625-636-40.
- Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999;96:2971-90. doi:10.1016/S0092-8674(99)5666-8.
- Rosato E, Peixoto AA, Barbujani G, Costa R, Kyriacou CP. Molecular evolution of the period gene in *Drosophila* simuliids. *Genetics*. 1991;138:693-707.
- Sawyer LA, Sandrell F, Praseto C, Peixoto AA, Rosato E, Costa R, et al. The period gene *Trh-Gly* polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: implications for selection. *Genetics*. 2006;174:465-80.
- Anaki AS, Vigoder FM, Bauzer LGSR, Ferreira GBA, Souza NA, Araújo IB, et al. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;3:1-12.
- Ministério da Saúde. 2013. <http://portal.saude.sa.gov.br/images/pdf/2014/07/setembro/09LVCasos.pdf>.
- Uns RM, Souza NA, Brazil RP, Maigoni RDC, Peixoto AA. Fixed differences in the paralytic gene define two lineages within the *Lutzomyia longipalpis* complex producing different types of courtship songs. *PLoS One*. 2012;7:e41323.
- Silva MH, Nascimento MDSS, Leonardo PS, Rebelo JMM, Pereira SFF. Genetic differentiation in natural populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) with different phenotypic spot patterns on tarsi in males. *Neotrop Entomol*. 2011;40:501-6.
- Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Mol Biol*. 2002;11:315-23.
- Petell MC, Finlayson BL, McMahon TA. Updated world map of the Koppen Geiger climate classification. *Hydro Earth Syst Sci*. 2007;111:633-44.
- Pennington RT, Prado DE, Peadar CA. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *J Biog*. 2002;29:261-73.
- 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). *Memphis of the Am Entomol Inst*. 1994;45:1-881.
- Solano P, Duvallat G, Dumais V, Guisance D, Cury G. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Trop*. 1997;51:75-80.
- Mazzoni CL, Gomes CA, Souza NA, De Queiroz RG, Justinián SCE, Ward RD, et al. Molecular evolution of the period gene in sandflies. *J Mol Evol*. 2002;55:53-62.
- Stamden R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*. 1996;5:233-41.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequence traces using Phred? I. Error probabilities. *Genome Res*. 1998;8:186-94.
- 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*. 2011;1:21273-38. doi:10.1093/molbev/mtr121.
- Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*. 1999;15:747-5.
- Crooks GE, Hon G, Chandra JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. 2004;14:1188-90.
- Pritchard JK, Stephens P, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2003;157:945-59.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14:2611-20.
- Raymond F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F statistics under isolation by distance. *Genetics*. 1993;145:1219-28.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *EvoBiol Inform Online*. 2005;1:47-50.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253-56.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003;52:696-704.
- Passamonti M, Mantovani B, Scali V. Phylogeny and karyotype evolution of the Iberian *Leptomyzomys* species complex (Insecta: Phlebotomidae). *Mol Phylogenet Evol*. 2004;30:87-96.

41. Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn E. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albivittatus* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between random amplified polymorphic dna-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Ann Entomol Soc Am*. 2005;98:908–17.
42. Wilkerson RC, Foster PG, Li C, Sallum MAM. Molecular phylogeny of neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albivittatus* species complex (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am*. 2005;98:918–25.
43. Lins RMM, Souza NA, Peixoto AA. Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and love song production. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:736–40.
44. Hamilton JGC, Maingon R, Alexander B, Ward R, Brail RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol*. 2005;19:80–88.
45. Souza NA, Magder FA, Araújo AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto A. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *J Med Entomol*. 2004;41:906–13.
46. Coutinho-Abreu M, Sonoda M, Fonseca JA, Malo MA, Balbino MQ. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *Parasit Vectors*. 2008;1:16.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6. Discussão geral

O uso exclusivo da taxonomia tradicional, não permite a correta identificação das espécies formadoras do complexo *Lu. longipalpis* (Araki *et al.*, 2009), apesar das diferentes populações brasileiras apresentarem um bom isolamento reprodutivo (Ward *et al.*, 1983).

As espécies crípticas são, em geral, propostas pelo reconhecimento de linhagens geneticamente distintas de espécies que foram tradicionalmente definidas a partir de caracteres morfológicos. Dessa forma, abordagens multidisciplinares em que dados morfológicos, bioquímicos, etológicos e genéticos pudessem ser avaliados conjuntamente, melhorariam o entendimento a respeito do confuso status taxonômico das espécies analisadas e apoiariam a confiabilidade dos resultados apresentados (Tan *et al.*, 2009).

A primeira espécie do complexo *Lu. longipalpis* descrita, *Lu. pseudolongipalpis*, da Venezuela, foi caracterizada por divergência na genitália dos exemplares do sexo feminino. Embasaram também esta descrição pesquisas que envolveram genes mitocondriais e caracteres morfológicos, etológicos e reprodutivos (Arrivillaga e Feligiangeli, 2001).

Para o Brasil, em função dos estudos, até o momento, desenvolvidos, a literatura aponta para a existência de uma alta complexidade na divergência e um possível fluxo gênico entre as populações de *Lu. longipalpis*. As espécies irmãs que produzem sons de corte tipo *Burst* e feromônio *cembrene-1* estão distribuídas principalmente nas regiões costeiras do Nordeste até Pancas, no Sudeste; enquanto as populações que produzem diferentes tipos de sons de *Pulse*

e diferentes feromônios são muito mais heterogêneas, e, provavelmente, representam cinco espécies incipientes com diferentes níveis de divergência (Araki *et al.*, 2009).

A morfologia sempre foi um impasse para a descrição das espécies crípticas brasileiras de *Lu. longipalpis* e informações extraídas a partir de caracteres morfológicos das asas tem sido bastante úteis para a entomologia médica (Dujardin *et al.* 2008, Gurgel *et al.* 2011, Vidal *et al.* 2011). Nesse contexto, o presente trabalho demonstrou, pela análise de clusterização dos resultados da análise morfométrica alar, que existe uma forte tendência de separação das espécies crípticas simpátricas do complexo *Lu. longipalpis* dos municípios de Sobral e Caririáçu, em concordância com o critério de separação pelo mesmo padrão de manchas abdominais proposto pela literatura (Mangabeira, 1969).

Amostras populacionais de exemplares 1S e 2S provenientes do município de Sobral demonstram, pelas análises já realizadas, que as duas espécies-irmãs simpátricas que lá se encontram podem ser discernidas pelos caracteres fenotípicos das manchas abdominais primariamente diagnosticados nos machos (Mangabeira, 1969), por meios moleculares (genes *period* e *paralytic*), bioquímicos (tipos de feromônios) e pelo padrão dos sons de corte, além de demonstrarem um importante isolamento reprodutivo (Ward *et al.* 1983, Bauzer *et al.* 2002, Lins *et al.*, 2008, Araki, 2009).

Pesquisas demonstram, inclusive, que a situação do complexo *Lu. longipalpis* no Brasil é mais bem definida nos locais onde esses exemplares se encontram em simpatria (Araki, 2009, Araki *et al.*, 2013) e ratificam a eficiência do marcador *period* como marcador de especiação (Araki, 2009, Araki *et al.*, 2013, Freitas *et al.* 2015).

Nossas pesquisas ampliaram o conhecimento das espécies simpátricas de *Lu. longipalpis* demonstrando fixação de polimorfismos SNP (124 e 424) nos exemplares de Sobral e Caririaçu-CE e ampliando essa condição aos encontrados no município de Bodocó-PE.

Em recente análise multilocus realizada por Araki et al. (2015) os valores de F_{ST} alcançados com 266 pb do gene *period* para as morfoespécies de Sobral foi de 0,395 e não encontra sítios fixados. Em nossa pesquisa, com 525 pb, para os morfotipos simpátricos, esse valor aumenta para 0,50016 e são apresentados dois polimorfismos fixados, fato que também se repete para as localidades de Caririaçu e Bodocó informando um maior nível de estruturação genética entre os morfotipos, e nesta última, o valor de F_{ST} é de 0,66122. Para as populações de *Lu. umbratilis* avaliadas por Freitas et al. (2015) os valores de F_{ST} entre as populações analisadas é de 0,89677 entre Manacapuru e Rio Preto da Eva (separadas geograficamente pelo rio Amazonas), com 17 polimorfismos fixados, e 0,89357 entre Manacapuru e Recife, com 16 polimorfismos fixados. Já entre Recife e Rio Preto da Eva este valor diminui para 0,00261 e nenhum polimorfismo fixado. Nesse último trabalho, existe isolamento geográfico entre as populações analisadas e a existência de um complexo de espécies para *Lu. umbratilis* é sugerida.

A eficiência do gene *period* também foi confirmada por nossos trabalhos, além de uma moderada resolução da máxima verossimilhança e da inferência bayesiana para geração de árvores filogenéticas em que os grupos analisados foram individualizados conforme o padrão de manchas abdominais proposto. Além disso, o software Structure também demonstrou que essas espécies estão geneticamente bem estruturadas.

Pesquisadores, entomólogos especializados em flebotomíneos e outros insetos vetores defendem que já existem evidências suficientes para nominar essas espécies irmãs (Brandão-Filho *et al.*, 2009) e os trabalhos publicados já demonstram que essas espécies foram submetidas a abordagem multidisciplinar com resultados satisfatórios.

A distinção entre as espécies do complexo *Lu. Longipalpis* existentes no Brasil viabilizará a análise de possíveis diferenças biológicas, como as constatadas para *Lu. longipalpis* e *Lu. pseudolongipalpis*, além da eficiência vetorial dessas espécies na transmissão da leishmaniose visceral, a exemplo do que ocorre com os membros do complexo *Anopheles gambiae* em que apenas *Anopheles gambiae* s.s. e *Anopheles arabiensis*, entre sete espécies crípticas reconhecidas, são importantes vetores de *Plasmodium* na África (White, 1974).

7. Conclusões

- A análise morfométrica geométrica realizada a partir dos caracteres morfológicos das asas, demonstra, por meio da análise de clusterização, uma tendência de separação das espécies crípticas simpátricas do complexo *Lu.longipalpis*, encontradas nos municípios de Sobral e Caririaçu-CE, confirmando, portanto, a importância dessa técnica como ferramenta de apoio na solução desses impasses morfológicos.
- O fragmento do gene nuclear *period* com 525pb, por meio de inferência bayesiana e da máxima verossimilhança, apresenta-se como um bom marcador taxonômico para caracterizar estas espécies crípticas do complexo *Lu. longipalpis*.
- As análises realizadas com o software Structure demonstraram uma boa estruturação genética entre as amostras dos municípios do Ceará e de Pernambuco, evidenciando uma boa distinção entre as morfoespécies analisadas.
- As metodologias empregadas em nossos estudos conseguiram demonstrar tendência de separação dos morfotipos avaliados pelo padrão fenotípico de manchas abdominais proposto por Mangabeira, em 1969, demonstrando que este é um critério importante para a separação morfológica das espécies crípticas simpátricas analisadas.

Referências Bibliográficas

- Aguiar GM and Medeiros VM (2003) Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel E F and Lainson R (eds) *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, pp 207-255.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LGSR, Ferreira GEM, Souza NA, Araujo IB, Hamilton JGC, Brazil RP and Peixoto AA (2009) Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis* 3:1-12.
- Araki AS, Ferreira EM, Mazzoni, CJ, Souza NA, Machado RC, Bruno RV and Peixoto AA (2013) Multilocus analysis of divergence and introgression in sympatric and allopatric sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 7: e245
- Arrivillaga JC and Feliciangeli MD (2001) *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *J Med Entomol* 38: 783-790.
- Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD and Lanzaro GC (2002) Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infect Genet Evol* 2: 83-95.
- Arrivillaga JC e Marrero, R. (2009) Dos Nuevas Poblaciones de *Lutzomyia pseudolongipalpis* Arrivillaga y Feliciangeli (Diptera: Phlebotominae) Vector de Leishmaniasis Visceral en Venezuela. *Neotrop Entomol*, 38: 56-559.
- Azevedo ACR, Monteiro FA, Cabello PH, Souza, NA, Rosa-Freitas MG and Rangel EF (2000) Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 305-322.
- Bauzer LG, Gesto JS, Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP and Peixoto AA (2002) Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Mol Biol Evol* 19: 1624-1627.
- Bauzer LGSR, Souza NA, Maigon RDC and Peixoto AA (2007) *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 1-12.
- Bonnefoy S, Tibayrenc M, Le Pont F, Dujardin J, Desjeux P, Ayala F (1986) An isozymic study of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) the vector of visceral leishmaniasis in the Yungas (Bolivia). *Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol* 24:213-217
- Bookstein, FL. (1997) Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Med Image Anal* 1: 225. 243.
- Brandão-Filho SP, Balbino VQ, Marcondes CB, Brasil RP, Hamilton JG, Shaw JJ. (2009) Should reproductively isolated populations of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato receive taxonomically valid names? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1197-1200.
- Brasil RP (2013) The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop* 46:263-264.

- Brasil (2003) Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde pp122.
- Brasil (2016) Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais Brasília: Ministério da Saúde pp121
- Chagas E (1936) Primeira verificação em individuo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. Nota prévia. Brasil med 50: 221-222.
- Gontijo CMF e Melo MN (2004) Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 7:338-349.
- Costa Júnior CRL, Freitas MTS, Santiago Figueirêdo CA, Aragão NC, da Silva, LG, Marcondes CB, Dias RV, Balbino TCL, Souza MBR, Ortigão MR and Balbino VQ (2015) Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene *period* among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. Parasit Vectors 8:193
- Costa CHN, (2008). Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil, Cad. Saúde Pública 24: 2959-2963.
- Cutolo AA and Von-Zuben CJ. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de cerrado no município de Corumbataí, centro-leste do estado de São paulo, BRASIL. Rev Bras.Parasitol Vet 17: 45-49, 2008.
- Dantas-Torres F, Andrade AJ, Tenório KER, Andrade Filho JD, Balbino VQ, Brandão-Filho SP (2010) Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco Rev Soc Bras Med Trop 43:733-736.
- Deane LM and Deane MP (1957) "Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no noroeste do Estado do Ceará." Rev Bras Malar Doen Trop 9: 225-246.
- Dujardin JP (2008) Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 8:875. 890.
- Dujardin JP, Kaba D, Henry AB (2010) The exchangeability of shape. BMC Res Notes. 3:266.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14: 2611. 2620.
- Freitas MTS, Ríos-Velasquez CM, Silva LG, Costa CRJr, Marcelino A, Leal-Balbino TC, Balbino VQ, Pessoa FA (2015a) Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the *period* clock gene. Acta Trop 154:149-54. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.11.014.
- Freitas MTS, Costa Jr CRL, Silva LG, Leal-Balbino TC, Balbino VQ (2016) Cytochrome Oxidase I as Tool to Evaluate the *Lutzomyia longipalpis* Complex: Useful Molecular Marker or Not?. Vector Biol J 1:3.
- Freitas VC, Parreiras KP, Duarte APM, Secundino NFC, Pimenta PFP (2012) Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Its Natural Sandfly Vector *Lutzomyia longipalpis*. Am J Trop Med Hyg.86:606-612. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0386
- Gajapathy A, Peiris LBS, Goodacre LS, Silva A, Pavilupillai J Jude and Surendran NS (2013) Molecular identification of potential leishmaniasis vector species within the *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes* species complex in Sri Lanka. Parasit Vectors DOI: 10.1186/1756-3305-6-302.

- Galati EAB (2003) Classificação de Phlebotominae. In: Rangel E F and Lainson R (eds) Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro, pp 23-52.
- Galati EAB. (2016) Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil, pp 127. Available from: http://www.fsp.usp.br/~egalati/ApostilaPhlebotominae_2016_VOL_I.pdf (September 10, 2016).
- Gurgel-Gonçalves R, Ferreira JB, Rosa AF, Bar ME, Galvão C (2011) Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Med Vet Entomol* 25: 84-93; doi: 10.1111/j.1365-2915.2010.00920.x.
- Hamilton JG, Hooper AM, Mori K, Pickett JA, Sano A (1999a) 3-Methyl-a -himachalene confirmed, and the relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. *Chem Commun* pp 355. 356.
- Hamilton JG, Hooper AM, Ibbotson HC, Kurosawa S, Mori K, Mutoc S and Pickett JA (1999b) 9-Methylgermacrene-B confirmed by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as 9S. *Chem Commun* pp 2335. 2336.
- Hamilton JG, Maingon RD, Alexander B, Ward RD, Brazil RP (2005) Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol*. 19:480-8.
- Holder M, Lewis PO (2003) Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat Rev Genet* 4:275-284.
- Jirakanjanakit N and Dujardin JP (2005) Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 858-61.
- Konopka J and Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2112. 2116.
- Lainson R, Ward RD and Shaw JJ (1977) Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sand' y *Lutzomyia longipalpis*. *Nature* 266: 628-30.
- Lane PR, Ward RD (1984) The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). *Cah ORSTOM, Ser Entomol med Parasitol* 22:245-249.
- Lins RMMA, Souza NA, Peixoto AA (2008) 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* 103: 736-40.
- Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L (2012) Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors* 5:257.
- Mangabeira, O. (1938) Sobre duas novas especies de Flebotomus (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 33: 349-356.
- Mangabeira, O. (1969) Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Rev Bras Malar Doenç Trop* 12: 3-26.

- Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ and Watts PC (2003) Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. *Mol Ecol* 12: 1879-1894.
- Marcondes CB (2011) *Entomologia médica e veterinária*. São Paulo: Atheneu pp 526.
- Martins AV, Falcão AL, Silva JE, Dias ES (1984) Nota sobre *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* (Mangabeira, 1938) com a descrição da fêmea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79:439-42
- Missawa NA, Lima GBM, (2006) Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 337-340.
- Monteiro LR, Reis SF (1999) *Princípios de morfometria geométrica*. Ribeirão Preto: Holos pp 189.
- Müller MJ (2009) Caracterização do comportamento sexual, do som de corte e de um fragmento do gene *period* (*per*) de populações de *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae). <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17821/000722201.pdf?sequence=1> (september 2, 2016).
- Mutebi JP, Alexander B, Sherlock I, Wellington J, Souza AA, Shaw J, Rangel EF, Lanzaro GC (1999) Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 61:149-57.
- Peña C (2011) Métodos de inferencia filogenética. *Rev peru biol* 18: 265-267.
- OPAS/OMS Informe Leishmanioses Nº 4 - Julho de 2016(Acesso, 23/11/2016) file:///C:/Users/Fam%C3%ADlia/Downloads/2016-cha-leish-informe-epi-das-americas%20(1).pdf
- Quezada-Euán JJG, Sheets HD, De Luna E (2015) Identification of cryptic species and morphotypes in male *Euglossa*: morphometric analysis of forewings (Hymenoptera: Euglossini). *Apid* 46: 787.
- Rangel EF and Vilela ML (2008) *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 24: 2948-2952.
- Regier JC, Fang QQ, Mitter C, Peigler RS, Friedlander, TP and Solis MA (1998) Evolution and phylogenetic utility of the *period* gene in Lepidoptera. *Mol Biol Evol* 15: 1172. 1182.
- Rispail P, Léger N (1998) Numerical taxonomy of the Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 1. Considerations of morphological characters in the genus *Phlebotomus* Rondani & Berté 1840. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 773-785.
- Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, et al. (2004) Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *J Med Entomol* 41: 906. 913.
- Tan DSH, Ang Y, Lim GS, Bin Ismail MR, Meier R (2010) From cryptic species to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). *Zoologica Scripta* 39: 51. 61.

- Vidal PO, Peruzin MC, Suesdek, L. (2011) Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). Rev Bras Entomol 55:134-137.
- Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LGSR, Souza, NA, Brazil RP and Peixoto AA (2010) Lovesongs and *period* gene polymorphisms indicate *Lutzomyiacruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyialongipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. Infect Gen Evol 10: 734. 739.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ready, PD, Murtagh A. (1983) 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. 78 :269-80.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ryan L, Falcão AL and Rangel EF (1985) The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 80: 145-148
- Watts PC, Hamilton JGC, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R and Maingon RDC (2005) Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. Am J Trop Med Hyg 73: 734-743.
- White GB (1974) *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 68: 278-301.
- Wilke ABB, Christe RDO, Multini LC, Vidal PO, Wilk-da-Silva R, de Carvalho GC, Marreli MT (2016) Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. PLoS One 11: e0161643. doi:10.1371/journal.pone.0161643
- Young DC and Duncan NA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Entomol Inst 54: 1-881.

Anexo 1: Regras submissão de pesquisa no Systematic Entomology

Download the FREE Journal
Apps from the Royal
Entomological Society



Systematic Entomology

© Royal Entomological Society



Edited By: Shaun L. Winterton, Christiane Weirauch, Thomas J. Simonsen and Peter S. Cranston (Reviews Editor)

Impact Factor: 3.343

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 4/94 (Entomology), 16/46 (Evolutionary Biology)

Online ISSN: 1365-3113

Associated Title(s): [Agricultural and Forest Entomology](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1461-9563/home) ([/doi/10.1111/\(ISSN\)1461-9563/home](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1461-9563/home)), [Ecological Entomology](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-2311/home) ([/doi/10.1111/\(ISSN\)1365-2311/home](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-2311/home)), [Insect Conservation and Diversity](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1752-4598/home) ([/doi/10.1111/\(ISSN\)1752-4598/home](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1752-4598/home)), [Insect Molecular Biology](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-2583/home) ([/doi/10.1111/\(ISSN\)1365-2583/home](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-2583/home)), [Medical and Veterinary Entomology](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-2915/home) ([/doi/10.1111/\(ISSN\)1365-2915/home](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-2915/home)), [Physiological Entomology](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-3032/home) ([/doi/10.1111/\(ISSN\)1365-3032/home](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1365-3032/home))

Author Guidelines

****No page charges****

Systematic Entomology publishes original papers on insect systematics, phylogenetics and integrative taxonomy, with a preference for general interest papers of broad biological, evolutionary or zoogeographical relevance. Papers submitted must not have been published or accepted for publication elsewhere.

Papers may be of any length up to about 50 printed pages but should be in clear, concise English. The editors reserve the right to make minor textual corrections and changes that do not alter the author's meaning. Detailed lists of examined material are welcome at any length, but will be included as freely available electronic supplements on Synergy. This also applies to additional tables and detailed information not specifically addressing aspects of the text. Concise lists and all details of the type material will be printed.

Manuscripts should be submitted electronically via the [ScholarOne portal](https://mc.manuscriptcentral.com/syen) (<https://mc.manuscriptcentral.com/syen>). The text should be in Word or RTF format. Figures should be submitted separately in EPS, TIFF, Powerpoint or Excel formats. Further information on artwork preparation can be found below. Examine recent issues of the journal,

and the journal's and Wiley Blackwell's web pages for details of acceptable style and format. Avoid capitalization except for abbreviations of depositories and the names of countries indicated for material examined.

The title of the paper should be informative but concise. A short title (for page headlines) should be given. The abstract should be a concise summary of the significant content and salient conclusions of the work. Tables should be used sparingly and should be self-explanatory and must be formatted according to the journal's style (consult a current issue).

Figures should be of publishable quality and about twice their published size, labelled large enough to allow reduction and numbered consecutively in the sequence referred to in the text. See current issues for style and format. Drawings and photographs that make up separate parts of the same figure must be mounted together and labelled consecutively (preferably left to right, top to bottom) with capital letters. Reference in the text should be: Fig. 1, Figs 2, 3 and Figs 1; 2A, C. Figure legends should be grouped together on a separate sheet. The format for figure legends is: Fig. 1. Genus species. A, Habitus; B, C, male genitalia; D-F, head (D), thorax (E) and abdomen (F).

Colour illustrations are welcome.

Graphical Abstracts

Systematic Entomology presents its table of contents online in graphical form with a brief abstract. A Graphical Abstract is a mandatory element of submission to this journal for all article types with an exception of Opinion articles. The authors are required to provide a Graphical Abstract upon submission of REVISED MANUSCRIPTS only.

Graphical Abstract entries must be submitted to ScholarOne and uploaded with the file designation 'Graphical Abstract' during the revised manuscript submission process. The caption should be uploaded in an editable Word file including the article title, the authors' names (with the corresponding author indicated by an asterisk). Abstract caption must include three highlights, 30 words or fewer for each, summarising the key findings presented in the paper and a figure that best represents the scope of the paper. The image should be included in the caption Word file or supplied as a TIF, EPS or PDF file. Ideally the figure should be eye-catching and colourful. It does not need to be a figure used in the main article, however if no figure is provided by the authors then Figure 1 will be used by default. It must be in high resolution, at least 300 dpi, it must fit within the dimensions of 50mm x 60mm and be fully legible at this size.

Please do not hesitate to contact the Editorial Office at syst.ent@wiley.com (<mailto:syst.ent@wiley.com>) if you have any further queries about Graphical Abstracts.

Conflict of Interest

Systematic Entomology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter (if applicable) to the Editor-in-Chief, in the manuscript (in the footnotes, Conflict of Interest or Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

In addition a statement is required that confirms that there are no disputes over the ownership of the data presented in the paper and all contributions have been attributed appropriately, via coauthorship or acknowledgement, as appropriate to the situation.

All submissions to this journal are required to comply with the above statements. At the Editor's discretion, clarification and further undertaking may be required from all submitting authors. Notwithstanding which, the interpretation of compliance with all of the above statements shall be reserved to the Editors of this Journal and the Editorial Officer of the Society, whose decision on all matters relating to and arising from the above statements shall be final.

Systematic Entomology is a member of and subscribes to the principles of the Committee on Publication Ethics.

Ethical Guidelines

The journal expects authors to abide by the guidelines of those statutory bodies, or, discipline that are specific to the country of origin, or, execution of the research.

Preparation of electronic artwork

We would like to receive your artwork electronically in addition to hard copy. Please prepare your figures according to the publisher's [Electronic Artwork Guidelines](https://authorservices.wiley.com/asset/photos/electronic_artwork_guidelines.pdf) (https://authorservices.wiley.com/asset/photos/electronic_artwork_guidelines.pdf).

- Create EPS files for images containing lineart. EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). The following packages can be used to create EPS files: Adobe Illustrator 7.0 and above, Deneba Canvas 6.0 and above, CorelDRAW 7.0 and above, SigmaPlot 8.01 and above. Other programs may also be able to create EPS files - use the SAVE AS or EXPORT functions. EPS files can be produced from other applications (e.g. PowerPoint, Excel) BUT results can be unpredictable (e.g. fonts and shading not converted correctly, lines missing, dotted lines becoming solid).
- Create TIFF files images containing half-tones/photographs. For scanned images, the scanning resolution (at final image size, see above for a guide to sizes) should be as follows to ensure adequate reproduction: lineart, >800 d.p.i.; half-tones, >300 d.p.i. Figures containing both half-tone and line images, >600 d.p.i. The following programs can be used to create TIFF files: Adobe Photoshop 4.0 and above, Adobe Illustrator 9.0 and GraphPad Prism 3. Other programs may also be able to create TIFF files - use the SAVE AS or EXPORT functions.
- Black and white images should be supplied as 'grayscale'; colour images should be supplied as CMYK.
- Multipart figures should be supplied in the final layout in one file, labelled as (A), (B) etc.
- Supply figures at final size widths if possible: 19 picas (single column) or 40 picas (double column).
- Use sans serif, true-type fonts for labels if possible, preferably Arial or Helvetica, or Times (New) Roman if serif fonts required.
- Ensure all lines and lettering are clear.

Colour Work Agreement forms

It is the policy of *Systematic Entomology* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley Blackwell require you to complete and return a [Colour Work Agreement form \(SYEN_CWA.pdf\)](#) before your paper can be

published. This form can be downloaded as a PDF* from the internet. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor at: sven@wiley.com (<mailto:sven@wiley.com>) and they will be able to email or FAX a form to you.

Please post or courier all pages of your completed form to Customer Services. Note that electronic or faxed copies cannot be accepted in compliance with Payment Card Industry Data Security Standard (PCI DSS) requirements.

Once completed, please return the original form to Customer Services at the address below:

Customer Services (OPI)
John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre
New Era Estate
Oldlands Way
Bognor Regis
West Sussex
PO22 9NQ

Any article received by Wiley Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned. For queries, please contact the production editor of the journal.

*To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> (<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>). Please note this links to an external website. The journal accepts no responsibility for the content of external sites.

References in the text should be in the form (Allis & Webb, 1972a, b; Brown, 1981) and should be collated at the end of the paper with periodical titles in full.

New Nomenclatural Acts

Please note that for papers containing new nomenclatural acts that are made available electronically, all new nomenclatural acts need to be registered in ZooBank and citation of such registrations included in to the text of the paper. Authors are responsible for registration of the paper and all new acts at the time of manuscript acceptance.

Papers must conform to the articles and recommendations of the *International Code of Zoological Nomenclature*. New taxa must be clearly differentiated from existing taxa. Holotypes, lectotypes and neotypes must be deposited in a recognized scientific or educational institution that maintains a research collection, with proper facilities for preserving name-bearing types, and makes the accessible for study. New distributional and other noteworthy records should be documented by voucher specimens deposited in a museum or similar institution. The abbreviations gen.n., sp.n., syn.n. and comb.n. should be used to distinguish all new taxa, synonymies or new combinations. An author's name must follow the name of a taxon without any intervening punctuation, and a comma must be inserted between the name of the author and the date of publication. If a species is transferred from its original genus, the author's name must then be placed in parentheses. The name of a subsequent user of a scientific name must be separated from that of the original author by a semicolon or the word 'of'.

In describing new species, one specimen must be designated as the holotype; other specimens mentioned in the original description are to be designated as paratypes. Any additional specimens considered but not regarded as paratypes should be listed separately. For lectotype designations, please consider Declaration 44, Bulletin of Zoological Nomenclature, 60(4), Dec. 2003, 263. The complete data of the holotype and paratypes, and the institutions in which they are deposited, must be recorded in the original description, e.g.:

Holotype, ♂, GREAT BRITAIN: Essex, Rainham, Warwick Wood, 22.vi.1977 (*Morris*) (BMNH).

Paratypes, NEPAL: 1 ♂, 1 ♀, Chautara Dist., Choche Ridge, 2500 m, ex *Quercus*, 17.vii.1983 (*Brendell*) (BMNH); 1 ♂, 2 ♀, Katmandu, 1350 m, 6.vii.1982 (*Allen*) (BMNH; NMNH).

All material examined should be listed in similar format: localities should be cited in order of increasing precision as in the examples; names of countries should be in capitals. Sex symbols should be used rather than 'male' and 'female'.

Papers not conforming with these directives are liable to be returned to the author.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html (http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html)

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreement, please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html (http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html> (<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>).

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements.

For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Early View

Systematic Entomology is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue

or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html> (<http://www.doi.org/faq.html>).

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication. If you want your article to be open access please choose the appropriate license agreement when you log in to Wiley's Author Services system. Click on 'Make my article OnlineOpen' and choose the appropriate license by clicking on 'Sign license agreement now' when you log in to Wiley's Author Services system.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Paper

Wiley Blackwell's policy is to use permanent paper from mills that operate a sustainable forestry policy, and which has been manufactured from pulp that is processed using acid-free and elementary chlorine-free practices. Furthermore, Wiley Blackwell ensures that the text paper and cover board used in all our journals has met acceptable environmental accreditation standards.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> (<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>). This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Author Services

Online production tracking is now available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track articles--once they have been accepted--through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production so they do not need to contact the production editor to check on progress. Visit <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/index.html>

<https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/index.html> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission, and more.

Anexo 2: comprovação da submissão do artigo

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to
Systematic EntomologyManuscript ID
SYEN-2017-04-049Title
Wing geometric morphometry and period gene phylogenetic analysis of *Lutzomyia longipalpis* sand fly from Ceará, BrazilAuthors
Aragão, Nádia
de Sá Leite Peixe Junior, Sérgio
de Souza Freitas, Mônica
Lima Costa Jr, César
Marcelino dos Santos Silva, Abigail
Gomes da Silva, Lidiane
de Queiroz Salbino, Valdir
Brisola Marcondes, CarlosDate Submitted
17-Apr-2017[Author Dashboard](#)

Anexo 3: Currículo Lattes

Nádia Consuelo Aragão

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Nádia Consuelo Aragão

Nome em citações bibliográficas ARAGÃO, N. C.; Aragão, Nádia Consuelo

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Estudo de populações de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) do Estado do Ceará, Brasil, por meio de morfometria geométrica alar e do marcador nuclear period
Orientador: Carlos Brisola Marcondes
Co-orientador: Valdir de Queiroz Balbino
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2010 - 2012** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Padrões de Divergência do Gene period em populações de *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:PSYCHODIDAE) do Estado do Ceará Brasil, Ano de obtenção: 2012
Orientador: Carlos Brisola Marcondes
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Áreas do conhecimento : Genética
- 2009 - 2012** Graduação em Licenciatura em Ciências Agrícolas.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2002 - 2009** Graduação em Medicina Veterinária.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
Título: Avaliação do monitoramento do *Aedes aegypti* por meio de ovitrampas e uso de aspirador de mosquitos alados no Palácio do Campo das Princesas Recife-PE
Orientador: Jean Carlos Ramos Silva e Ridelane Veiga Acioli

Formação complementar

- 2012 - 2012** Curso de curta duração em I Workshop de Morfometria Geométrica Alar. (Carga horária: 35h).
Instituto Butantan, IBU, Sao Paulo, Brasil
Palavras-chave: Morfometria Geométrica, Insetos Vetores, Diptera, Culicidae
- 2010 - 2010** III Curso de Gen. e Biol. Mol. de Insetos Vetores. . (Carga horária: 75h).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ - CPQAM, Brasil
Palavras-chave: Insetos Vetores, Doenças Tropicais, Genética
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Mini-Cursos de Saúde Pública. (Carga horária: 24h).
Conselho Regional de Medicina Veterinária de Pernambuco, CRMV/PE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Departamento de Genética - UFPE - CCB/UFPE

Vínculo institucional

- 2012 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pesquisa e desenvolvimento , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
 Outras informações:
 Estudo de genética de populações em populações de "Lutzomyia longipalpis" (Diptera: Psychodidae) isoladas pela Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil, utilizando os marcadores cyt b, cox 1, period e paralytic. Uso de ferramentas de Biologia Molecular no estudo dos padrões de transmissão vetorial da leishmaniose visceral canina em uma área de transmissão ativa no Sertão do Estado de Pernambuco, Brasil
- 2009 - 2009** Vínculo: Estágio Extra Curricular , Enquadramento funcional: Médica Veterinária , Carga horária: 20, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividade nos Projetos de Genética de Populações de "Lutzomyia longipalpis" (Diptera: Psychodidae) vetor da Leishmania infantum chagasi na Região Neotropical, financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), e variabilidade genética de genes que codificam proteínas salivares de "Lutzomyia longipalpis" (Diptera: Psychodidae) vetor da Leishmania infantum chagasi.

6. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

Vínculo institucional

- 2014 - 2014** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 40, Regime: Integral
 Outras informações:
 Estágio Extra-curricular realizado no Laboratório de Flebotomíneos da FSP/USP para aprendizagem de técnicas de montagem e identificação de flebotomíneos e morfometria tradicional sob a orientação da Profª Drª Eunice Aparecida Bianchi Galati.

Áreas de atuação

1. Entomologia Médica
 2. Genética de Populações
 3. Saúde Coletiva
-

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LIMA COSTA, CÉSAR RAIMUNDO; FREITAS, MOISES THIAGO DE SOUZA; SANTIAGO FIGUEIRÉDO, CARLOS ALBERTO; **Aragão, Nádia Consuelo**; DA SILVA, LIDIANE GOMES; Marcondes, Carlos Brisola; DIAS, RAIMUNDO VIEIRA; BALBINO, TERESA CRISTINA LEAL; SOUZA, MANUELA BARBOSA RODRIGUES; ORTIGÃO, MARCELO RAMALHO; BALBINO, VALDIR DE QUEIROZ

Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites & Vectors.* , v.8, p.8:193 - , 2015.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1186/s13071-015-0785-6]

2. DE SOUZA FREITAS, MOISES THIAGO; RÍOS-VELASQUEZ, CLAUDIA MARIA; COSTA, CÉSAR RAIMUNDO LIMA; FIGUEIRÊDO, CARLOS ALBERTO SANTIAGO; **Aragão, Nádia Consuelo**; DA SILVA, LIDIANE GOMES; DE ARAGÃO BATISTA, MARCUS VINICIUS; BALBINO, TERESA CRISTINA LEAL; PESSOA, FELIPE ARLEY COSTA; DE QUEIROZ BALBINO, VALDIR Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasites & Vectors.* , v.8, p.448 - , 2015.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1186/s13071-015-1051-7]

3. ARAGÃO, N. C.; Müller, Gerson Azulim; Balbino, Valdir Queiroz; Costa Junior, César Raimundo Lima; Figueirêdo Júnior, Carlos Santiago; Alencar, Jerônimo; Marcondes, Carlos Brisola A list of mosquito species of the Brazilian State of Pernambuco, including the first report of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), yellow fever vector and 14 other species (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso).* , v.43, p.458 - 459, 2010.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1590/s0037-86822010000400024]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **ARAGÃO, N. C.**; ROCHA, P. K. L.; SANTOS, M. A. O.; SILVA, L. G.; MARCONDES, C. B.; BALBINO, V. Q.

Primeira parte do genoma mitocondrial de 'Psorophora ferox' (Diptera: Culicidae) In: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2012, Curitiba.

Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://Primeira parte do genoma mitocondrial de Psorophora ferox (Diptera: Culicidae)]

2. SILVA, L. G.; Costa Junior, César Raimundo Lima; **ARAGÃO, N. C.**; Freitas, M. T. S.; OKUYAMA, F. Y. U.; VELASQUEZ, C. M. R.; PESSOA, F. A. C.; BALBINO, V. Q.

Using Molecular Marker for the Determination of Taxonomic Status of *Lutzomyia umbratilis*. In: Simposio Brasileiro de Identificação Molecular de espécies, 2012, Foz do Iguassu.

58º Congresso Brasileiro de Genética. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português.

3. **ARAGÃO, N. C.**; MULLER, G. A.; SANTOS, H. M. B.; Freitas, M. T. S.; LIMA, T. L. D.; BALBINO, V. Q.; MARCONDES, C. B.

NOVOS RELATOS DE CULICÍDEOS (DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DE PERNAMBUCO In: X Congresso de Ecologia do Brasil, 2011, São Lourenço-MG.

Anais do X Congresso de Ecologia do Brasil. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Home page: [http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/1711.pdf]

4. NUNES, V. M. N.; ARAGÃO, N. C.; FERREIRA, V. M. H.; SILVA, J. C. R.

LEVANTAMENTO AMOSTRAL DE IMÓVEIS COM CRIATÓRIOS POSITIVOS O GÊNERO Aedes, ENCONTRADOS EM 94 BAIRROS DA CIDADE DO RECIFE In: XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007

Anais do XX Congresso Brasileiro de Parasitologia. , 2007.

Palavras-chave: Aedes, Criatórios, Recife

Áreas do conhecimento : Saúde Pública, Epidemiologia

Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ARAGÃO, N. C.**

Estudo Genético de Populações de 'Lutzomyia longipalpis' Isoladas pela Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil, utilizando os Marcadores 'cyt b', 'cox 1', 'period' e 'paralitic', 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Genética de Populações, Entomologia Médica

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Auditório do Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: II Jornada de Pós-graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: UFPE

2. **ARAGÃO, N. C.**; ROCHA, P. K. L.; SANTOS, M. A. O.; SILVA, L. G.; MARCONDES, C. B.; BALBINO, V. Q.

Primeira Parte do Genoma Mitocondrial de 'Psorophora ferox' (Diptera: Culicidae), 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Entomologia Médica, Mitocôndria, "Psorophora ferox"

Áreas do conhecimento : Genética de Populações,Entomologia Médica

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: http://www.cbe2012.com.br/_apps/trabalhos/1643/1643_1.pdf; Local: Expo Unimed Curitiba; Cidade: Curitiba; Evento: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Entomologia

3. **ARAGÃO, N. C.**; BALBINO, V. Q.; MARCONDES, C. B.

Padrões de Divergência do gene 'period' de 'Lutzomyia longipalpis' (diptera:Psychodidae) no Município de Caririçá-CE, 2011. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Genética de Populações, Lutzomyia longipalpis

Áreas do conhecimento : Genética de Populações,Entomologia Médica

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Auditório do CCSA/UFPE; Cidade: Recife; Evento: I Jornada de Pós-graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: UFPE

4. **ARAGÃO, N. C.**

Ordem Diptera - Morfologia e Classificação, 2009. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Ordem Diptera, Morfologia , Dipteros de Importância Médica

Áreas do conhecimento : Entomologia

Setores de atividade : Educação

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Laboratório de Entomologia da Área de Zoologia/UFRPE; Cidade: Reife; Inst.promotora/financiadora: Área de Zoologia/UFRPE

Educação e Popularização de C&T

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ARAGÃO, N. C.**; ROCHA, P. K. L.; SANTOS, M. A. O.; SILVA, L. G.; MARCONDES, C. B.; BALBINO, V. Q.

Primeira Parte do Genoma Mitocondrial de 'Psorophora ferox' (Diptera: Culicidae), 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Entomologia Médica, Mitocôndria, "Psorophora ferox"

Áreas do conhecimento : Genética de Populações,Entomologia Médica

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: http://www.cbe2012.com.br/_apps/trabalhos/1643/1643_1.pdf; Local: Expo Unimed Curitiba; Cidade: Curitiba; Evento: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Entomologia

2. **ARAGÃO, N. C.**; BALBINO, V. Q.; MARCONDES, C. B.

Padrões de Divergência do gene 'period' de 'Lutzomyia longipalpis' (diptera:Psychodidae) no Município de Caririçá-CE, 2011. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Genética de Populações, Lutzomyia longipalpis

Áreas do conhecimento : Genética de Populações,Entomologia Médica

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Auditório do CCSA/UFPE; Cidade: Recife; Evento: I Jornada de Pós-graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: UFPE

3. **ARAGÃO, N. C.**

Ordem Diptera - Morfologia e Classificação, 2009. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Ordem Diptera, Morfologia , Dipteros de Importância Médica

Áreas do conhecimento : Entomologia

Setores de atividade : Educação

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Laboratório de Entomologia da Área de Zoologia/UFRPE; Cidade: Reife; Inst.promotora/financiadora: Área de Zoologia/UFRPE

Eventos

Participação em eventos

1. **V Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais**, 2012. (Encontro)
.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXVI Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2012. (Congresso)
Primeira Parte do Genoma Mitocondrial de "Psorophora ferox" (Diptera: Culicidae).
3. **I Workshop Pernambucano de Bioinformática**, 2010. (Encontro)
.
4. **II Simpósio Satélite Sobre o Status Taxonômico de "Lutzomyia longipalpis"**, 2010. (Simpósio)
.
5. **IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais**, 2010. (Encontro)
.
6. **Concepções e Práticas do Educador e Ciências Agrícolas**, 2009. (Outra)
.
7. **I Seminário de Saúde Pública Veterinária**, 2009. (Seminário)
.