

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

RODRIGO ESPÍNDOLA GODOY

**Taxonomia integrativa de espécies, com fêmeas morfológicamente similares, do gênero  
*Psychodopygus* (Diptera, Psychodidae), Série Chagasi, registradas no Brasil**

São Paulo  
2018

RODRIGO ESPÍNDOLA GODOY

**Taxonomia integrativa de espécies, com fêmeas morfologicamente similares, do gênero  
*Psychodopygus* (Diptera, Psychodidae), Série Chagasi, registradas no Brasil  
Versão Original**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em  
Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da  
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Aparecida Bianchi  
Galati

São Paulo  
2018

GODOY R. E. **Taxonomia integrativa de espécies morfológicamente indistinguíveis do gênero *Psychodopygus* (Diptera, Psychodidae), Série Chagasi, registradas no Brasil** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018

## RESUMO

**Introdução.** A identificação dos flebotomíneos baseia-se principalmente na morfologia do adulto, o que pode ser problemático quando as espécies são morfológicamente muito semelhantes. *Psychodopygus* é um gênero de flebotomíneos de grande interesse em saúde pública devido ao papel de algumas espécies na veiculação de *Leishmania* spp. no Brasil. No entanto, este gênero inclui espécies com fêmeas morfológicamente indistinguíveis que pertencem à Série Chagasi, sendo elas: *P. chagasi*, *P. complexus*, *P. squamiventris maripaensis*, *P. squamiventris squamiventris* e *P. wellcomei*. **Objetivos.** Investigar a possibilidade de distinguir essas espécies por meio de análises morfométrica e molecular, além de produzir uma distribuição geográfica atualizada para o grupo analisando a probabilidade de ocorrência das espécies através da análise de modelagem de nicho ecológico. **Material e Métodos.** Foi realizada a análise discriminante na morfometria geométrica (cabeça e asa) e linear, morfologia (usando microscopia óptica e eletrônica de varredura) e a análise do *citocromo c oxidase subunidade 1 (COI)*, avaliando-se um total de 752 espécimes (460 fêmeas e 292 machos) dos seguintes estados Amapá, Amazonas, Ceará, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Mapas de distribuição foram produzidos através de dados obtidos do material analisado e de revisão bibliográfica. **Resultados.** A análise discriminante usando caracteres morfométricos lineares mostrou-se capaz de diferenciar todas as espécies, exceto *P. complexus*, que apresentou 2,2% de erro de identificação. A morfometria geométrica das asas foi incapaz de separar completamente as espécies através da conformação, mas o tamanho do centróide dos espécimes fêmeas falhou apenas em distinguir *P. complexus* de *P. s. maripaensis*. Por outro lado, a morfometria geométrica das cabeças foi capaz de distinguir todas as espécies com grande eficiência ao usar tanto a forma como o tamanho do centróide. A análise morfológica revelou que a coloração torácica, principalmente do pronoto e do pós-noto, pode ser usada para separar as cinco espécies em três grupos: *P. chagasi*, *P. wellcomei* / *P. complexus* e *P. s. mariapaensis* / *P. s. squamiventris*. Os resultados da análise de DNA *Barcoding*, mostraram um agrupamento semelhante ao observado na morfologia; embora os espécimes de *P. wellcomei* do estado do Ceará mostrem uma grande distância genética da população do estado do Pará, evidenciando que essa espécie possa representar um complexo. Quanto à microscopia eletrônica de varredura, foram avaliadas

detalhadamente as estruturas das antenas, tórax e genitália masculina. Salientamos que no anepímero (tórax) foi observada uma escama tipo "raquete" modificada apenas em *Psychodopygus s. squamiventris*. A revisão da distribuição geográfica mostrou que as espécies possuem uma distribuição cis-andina, ocorrendo principalmente no bioma Amazônico. A nítida separação de algumas espécies pelo rio Amazonas, sugere que o surgimento do grupo ocorreu no período que se estende da orogênese dos Andes até a formação deste rio. **Conclusões.** O estudo possibilitou diferenciar completamente as fêmeas das cinco espécies da Série Chagasi utilizando o conjunto de dados obtidos por morfometria linear e geométrica e análises morfológicas e também apresentar novos caracteres morfológicos e padrões distribucionais que facilitarão a identificação de machos e fêmeas dessas espécies.

Palavras-chave: morfometria linear e geométrica. flebotomíneos. *citocromo c oxidase subunidade 1*. Análise discriminante. padrão de pigmentação. Distribuição da Série Chagasi, Modelagem de nicho ecológico.

GODOY R. E. **Integrative taxonomy of morphologically indistinguishable species of the genus *Psychodopygus* (Diptera, Psychodidae), Chagasi series, registered in Brazil** [Doctoral Thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018

#### ABSTRACT

**Introduction.** The identification of sand flies is mainly based on adult morphology, which can be problematic when species are morphologically very similar. *Psychodopygus* is one of the sand fly genera of great interest in public health, due to the role of some species in the transmission of *Leishmania* spp. in Brazil. However, this genus includes species with morphologically indistinguishable females that belong to the Chagasi series, which includes: *P. chagasi*, *P. complexus*, *P. squamiventris maripaensis*, *P. squamiventris squamiventris* and *P. wellcomei*. **Objectives.** To investigate the possibility of distinguishing among these species by means of morphometric and molecular analyses in addition to producing an updated geographical distribution for the group, analyzing the probability of the occurrence of the species by the analysis of ecological niche modeling. **Material and methods.** The analyses of the *cytochrome c oxidase subunit 1 (COI)*, geometrical (head and wing) and of linear morphometry and morphology (using optical microscopy and scanning electron microscopy) were carried out using a total of 752 specimens (460 females and 292 males) from the following states: Amapá, Amazonas, Ceará, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Distribution maps were produced on the basis of data obtained from the material analyzed and a bibliographical review. **Results.** The discriminant analysis using linear morphometric characters was able to differentiate among all the species, except for *P. complexus*, which presented a 2.2% error of identification. The geometric morphometry of the wings was unable to completely separate the species by means of the shape analyses, but the centroid size of the female specimens only failed to distinguish *P. complexus* from *P. s. maripaensis*. Otherwise, the geometric morphometry of the heads was sufficient to distinguish all the species with great efficiency, when using both the head-shape and the centroid size. The morphological analysis revealed that the thoracic coloration, mainly of the pronotum and the post-notum, can be used to separate the five species into three groups: *P. chagasi*, *P. wellcomei* / *P. complexus*, *P. s. mariapaensis* / *P. s. squamiventris*. The results of the Barcoding DNA analyses showed a cluster similar to that observed in the

morphology; however, *P. wellcomei* specimens from the Ceará population showed a great genetic distance from the population of Pará, evidencing that this species may represent a complex. As for the scanning electron microscopy, the structures of the antennae, thorax and male genitalia were evaluated in detail. In the anepimerum (thorax) a modified “racket”-type scale was observed only in *Psychodopygus s. squamiventris*. The review of the geographical distribution showed that the species have a cis-Andean distribution, occurring mainly in the Amazonian biome. The separation of some species from the others by the Amazon river suggests that the appearance of the Chagasi series occurred in the period from the orogenesis of the Andes to the formation of this river. **Conclusions.** The results clearly differentiate the females of the five species of the Chagasi series using the data set of linear and geometric morphometry and morphological analyses, providing new morphological and distributional data that will facilitate the identification of the males and females of this group.

Keywords: linear and geometric morphometry. sand fly. *cytochrome c oxidase subunit 1*. Discriminant analyses. pigmentation pattern. Chagasi series distribution, Ecological niche modelling.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. FLEBOTOMÍNEOS

### 1.1.1 Características Gerais

Flebotomíneos são dípteros pertencentes à família Psychodidae, sub-família Phlebotominae que se apresentam como importantes vetores naturais de patógenos de doenças humanas e de animais, especialmente protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 e outros tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* Strong Tyzzer, Sellards, Brues & Gastiaburu, 1915 e numerosos arbovírus (PETERSON; SHAW, 2003; LAINSON; SHAW, 2010). Somente as fêmeas praticam a hematofagia, condição necessária para que ocorra a maturação de seus ovários e o que as capacitam como vetores de patógenos (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Ao todo são conhecidas pouco mais de 1000 espécies de flebotomíneos no mundo e de 500 nas Américas (SHIMABUKURO; ANDRADE; GALATI, 2017). Embora os estudos dos flebotomíneos venham sendo realizados desde a descrição da primeira espécie do grupo no final do século XVIII, a taxonomia e sistemática do grupo têm sido alvo de grande debate, principalmente no Novo Mundo, onde a maior parte da diversidade desses insetos se encontra.

As primeiras descrições de flebotomíneos nas Américas foram feitas por Coquillett em 1907, apenas 5 anos depois, Summers (1912) descreveu a primeira espécie brasileira *Phlebotomus rostrans* Summers 1912 (*Trichophoromyia rostrans*), espécie que viria a ser alvo de grande debate devido a descrição com poucos elementos e o pouco conhecimento da morfologia desses insetos à época. No mesmo ano Lutz & Neiva (1912) descreveram três espécies de flebotomíneos que viriam a ser consideradas posteriormente umas das mais importantes espécies na veiculação da leishmania no Brasil, sendo elas: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), além de *Psychodopygus squamiventris squamiventris* (Lutz & Neiva, 1912), na época descritas como *Phlebotomus*, mesmo gênero adotado para as espécies da Eurásia (GALATI, 2003).

Para os flebotomíneos das Américas, a classificação mais utilizada por muito tempo, foi a proposta por Lewis et al. (1977) e revisada por Young & Duncan (1994), que incluía as 400 espécies neotropicais descritas até a época em 3 gêneros: *Lutzomyia* França & Parrot, 1924 (onde se encontram as espécies de importância médica) composto por 15 subgêneros e 11 grupos de espécies, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1940. Apesar de ser a classificação adotada pela maioria dos pesquisadores que trabalham com o grupo, a

falta de uma avaliação que possa determinar as relações evolutivas dessas espécies, ainda é objeto de muita discussão.

Um estudo mais recente e que vem sendo amplamente utilizado por taxonomistas desse grupo de insetos foi publicado por Galati (1995), no qual através de uma análise filogenética, com base nos postulados de Hennig, as 464 espécies de flebotomíneos neotropicais foram classificadas em 2 tribos, 5 subtribos, 22 gêneros (atualmente 23), 20 subgêneros, 30 séries e 3 grupos de espécies. Nessa classificação, as espécies vetoras de patógenos, que antes estavam incluídas apenas no gênero *Lutzomyia*, passam a ser distribuídas em 3 subtribos diferentes, *Sergentomyiina* Artemiev, 1991, *Lutzomyiina* Abonnenc & Leger, 1976 e *Psychodopygina* Galati, 1995, e em vários gêneros (GALATI, 2003). Contudo, as espécies que apresentam importância médica veterinária estão inseridas apenas nas últimas subtribos.

Embora o estudo taxonômico tenha avançado nos últimos anos de flebotomíneos, estes estudos continuam sendo baseados principalmente na morfometria linear e na morfologia dos insetos adultos, devido à grande dificuldade de se criar os flebotomíneos em laboratório. Esse fato se apresenta como um dificultador quanto ao diagnóstico de espécies, principalmente em relação à identificação de espécimes fêmea, que em alguns grupos apresentam pouca diferenciação morfológica entre as espécies. Nas Américas, de um total superior a 500 espécies, mais de 150 necessitam do espécime macho para a determinação específica. Além disso, a presença de complexos de espécies se traduz como um complicador a mais para a identificação taxonômica em alguns gêneros.

Nesse contexto, o gênero *Psychodopygus* (Mangabeira, 1941), no qual se encontram vetores associados à veiculação de *Leishmania* spp., agentes da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil, apresenta espécies que possuem fêmeas morfológicamente indistinguíveis.

As leishmanioses são antropozoonoses, que no Continente Americano representam um espectro de doenças com diferentes manifestações clínicas, estando amplamente distribuídas (LAINSON; SHAW, 2010). Nas últimas décadas, vêm aumentando sua incidência e expansão geográfica, revelando novos cenários ecoepidemiológicos no Brasil, onde estão registradas em todas as Unidades Federadas (WHO 2010, BRASIL 2014, 2017). Esse fato faz com que o conhecimento da morfologia e consequente diferenciação de espécies morfológicamente semelhantes, seja de suma importância para as estratégias de prevenção dessa enfermidade, especialmente para a vigilância entomológica.



## 1.2 HISTÓRICO DO GÊNERO *PSYCHODOPYGUS* SÉRIE CHAGASI

Dentre as primeiras descrições de espécies de flebotomíneos no Brasil, *P. s. squamiventris*, foi feita apenas por observação de espécimes fêmeas e assim denominada devido à presença de escamas no abdômen dos espécimes observados por Lutz & Neiva (1912). Característica esta que depois se mostrou não ser exclusiva desta espécie. Em todo caso, as descrições àquela época se davam basicamente pela morfologia e morfometria de estruturas externas. As internas, como espermateca e cibário, só começaram a ser utilizadas em 1926 por Adler e Theodor (COSTA LIMA, 1941). Essa limitação nos caracteres utilizados para a descrição gerou inúmeros problemas de identificação/descrição de espécies posteriormente, como salientado por diversos autores (READY et al., 1982). Costa Lima (1941) avaliando o material tipo de *P. s. squamiventris* e espécimes de Rio Negro os quais haviam sido identificados como *P. s. squamiventris*, observou que os espécimes dessa última localidade apresentavam diferenças no comprimento dos palpos em relação aos da série tipo; considerando-a, portanto, uma nova espécie, a qual denominou de *Flebotomus chagasi* (*Psychodopygus chagasi*).

Em 1941, Mangabeira (1941) propôs o subgênero *Psychodopygus* com a descrição de três espécies do mesmo grupo; duas delas, mais tarde incluídas na Série Chagasi: *Flebotomus* (*Psychodopygus*) *unisetosus* e *Flebotomus* (*Psychodopygus*) *complexus*. Estas duas espécies foram descritas apenas com base em exemplares machos, provenientes do município de Abaeté, Pará. *Flebotomus unisetosus* foi colocada posteriormente na sinonímia de *P. chagasi*, por Martins, Maciel e da Silva (1968), ao observar um macho de *F. unisetosus* e fêmeas de *P. chagasi*, em material proveniente de uma localidade de Roraima, próxima à da localidade-tipo de *P. chagasi*. Fato que foi provado ser verdadeiro por Fraiha et al. (1974), após criar em laboratório espécimes de *P. chagasi* coletados próximos a localidade do material utilizado por Martins, Maciel e da Silva (1968).

Floch & Abonnenc (1946) descrevem um macho proveniente da Guiana Francesa, denominando-o *Phlebotomus maripaensis* (*Psychodopygus squamiventris maripaensis*). Fairchild e Hertig (1951), a partir de material coletado em Villavicencio, Meta, Colômbia, fazem redescrição da fêmea de *P. s. squamiventris* e descrevem um macho que acreditam ser dessa mesma espécie. Correlação que se descobriu errônea, após o estudo de Martins, Maciel e da Silva (1968), que avaliou os tipos das espécies do grupo descritas até então e redescrivendo os tipos de *P. chagasi* e *P. s. squamiventris*. Esse estudo levou Martins (1970) a descrever os espécimes da Colômbia como uma nova espécie denominada à época como *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *fairtigi* (*Psychodopygus fairtigi*).

Barretto (1961, 1962) propõe chamar o grupo formado pelas cinco espécies descritas, até então, de Série Unisetosa, proposta seguida por Theodor (1965). Osorno-Mesa, Morales-Alarcón, Osorno (1967) descreveram a partir de dois exemplares de macho, *Phlebotomus (Psychodopygus) bernalei*, uma nova espécie proveniente de Caquetá, Colômbia.

Martins, Maciel e da Silva (1968), avaliando as espécies do grupo, decidem alterar o nome do grupo, proposto por Barretto (1961), de Unisetosa para Squamiventris. Além disso, concluíram que: *P. s. squamiventris* seria a fêmea de *P. complexus* e com isso a segunda espécie era sinônima, hipótese sugerida anteriormente por outros autores, (FAIRCHILD; HERTIG, 1951, BARRETTO, 1961). Essa hipótese não foi seguida por Forattini (1971), em que esse considerou *P. s. maripaensis* espécie sinônima de *P. s. squamiventris*, devido ao encontro de machos da primeira espécie associados a fêmeas com a mesma característica morfológica de *P. s. squamiventris*, em capturas feitas no Amapá. No mesmo ano, Fraiha, Shaw e Lainson (1971) descrevem *Psychodopygus wellcomei* baseado em dados de machos e fêmeas coletados na Serra dos Carajás, Marabá, Pará e mantém a sinonímia de *P. complexus* proposta por Martins, Maciel e da Silva (1968).

Em estudo realizado na rodovia Transamazônica, buscando identificar a fauna flebotomínica nas áreas adjacentes ao empreendimento, Fraiha et al. (1978) concluíram, com base no material coletado, que *P. complexus* seria uma espécie distinta de *P. s. squamiventris*. Além disso, identificaram uma nova espécie do grupo, sendo essa descrita posteriormente como *Psychodopygus leonidasdeanei* por Fraiha et al. (1986).

Ready et al. (1982) capturaram e criaram em laboratório espécimes de *P. s. squamiventris* e *P. s. maripaensis* de diferentes estados brasileiros (incluindo a localidade tipo da primeira espécie) e da Guiana Francesa. Com isso, pela primeira vez os autores evidenciam as características distintas entre os machos de *P. s. squamiventris* e *P. s. maripaensis*, mostrando que seriam então espécies distintas, e devido à sua grande semelhança e serem espécies alopátricas deveriam ser designadas como subespécies. Mesmo com todas as análises e a presença de ilustrações, os autores não fazem uma descrição formal dos espécimes machos de *P. s. squamiventris*.

Em 1988, Feliciangeli, Ramirez-Perez e Ramirez descrevem *Lutzomyia killicki* (*Psychodopygus killicki*), de material proveniente do Território Federal Amazonas, Venezuela, incluindo essa espécie na Série Squamiventris. Dez anos após, Fé, Freitas e Barrett (1998) descrevem *Lutzomyia douradoi* (*Psychodopygus douradoi*), baseados em fêmeas e machos coletados no estado do Amazonas. Após a revisão de Alves (2013), essa mesma espécie foi colocada na sinonímia de *P. fairtigi*, apoiada no fato de que características de *P. douradoi* que as diferenciavam de *P. fairtigi*, na verdade, eram artefatos de montagem.

Galati (2003), em trabalho demonstrando a filogenia dos flebotomíneos da América, abandona a nomenclatura de Série Squamiventris (Martins, Maciel e da Silva, 1968) e segue a proposta de Barretto (1961), referindo-se a ela como Série Chagasi e não como Unisetosa devido a sinonímia de *P. unisetosus* com *P. chagasi*.

Atualmente o gênero *Psychodopygus* criado por Mangabeira em 1941 é composto por 35 espécies, onde 14 delas só podem ser definidas especificamente com a presença de um espécime macho associado. Dentre essas espécies, as incluídas na Série Chagasi (Barretto, 1962), denotam grande importância médico-veterinária devido à associação delas com a transmissão de agentes da LTA, como *Psychodopygus complexus* (Mangabeira, 1941) e *P. wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971) em relação à *Leishmania (Viannia) braziliensis*, principalmente na região Norte. Segundo Alves (2013), integram ainda esta série mais sete espécies de flebotomíneos: *Psychodopygus chagasi* (Costa Lima, 1941), *Psychodopygus fairtigi* (Martins, 1970), *Psychodopygus killicki* (Feliciangeli, Ramirez-Pérez & Ramirez, 1988), *Psychodopygus squamiventris maripaensis* (Floch & Abonnenc, 1946), *Psychodopygus squamiventris squamiventris* (Lutz & Neiva, 1912), *Psychodopygus leonidasdeanei* (Fraiha, Ryan, Ward, Lainson & Shaw, 1986) e *Psychodopygus bernalei* (Osorno-Mesa, Morales & Osorno, 1967). No entanto, apenas as duas últimas apresentam fêmeas com características que as diferenciam das demais espécies da série (GALATI, 2003).

### 1.2.1 Importância epidemiológica da Série Chagasi

*Psychodopygus complexus* possui hábitos silvestres, estando diretamente ligada a áreas de floresta primária, onde a sua densidade é alta, seguindo o padrão comportamental do gênero (AZEVEDO et al., 2002; GIL et al., 2003; GARCEZ et al., 2009; RANGEL; LAINSON, 2009). É importante salientar que essa espécie, assim como as demais do grupo, apresenta grande atratividade por humanos, praticando avidamente hematofagia, quando estes adentram a mata em horários de atividade dessas espécies.

Ward, Lainson e Shaw (1973), em Serra dos Carajás, estado do Pará, realizaram investigações entomológicas, onde verificaram que a maioria dos 52 casos humanos de LTA estiveram associados à presença de *P. complexus*, indicando-a como potencial espécie transmissora da *Leishmania (V.) braziliensis* na região. Estudos no município de Paragominas, ainda no Pará, De Souza et al. (1996) identificaram inúmeras fêmeas do subgênero *Psychodopygus* em uma área onde *P. wellcomei* (também considerada um importante vetor de *L. (V.) braziliensis* não era encontrada. Os machos capturados desse

subgênero pertenciam à espécie *P. complexus*, levando a incriminação desta, como transmissora de LTA pelo achado de infecção natural por *L. (V.) braziliensis* (Souza et al., 1996). Testes realizados em pacientes com LTA para identificação da espécie de *Leishmania* e estudos de vigilância entomológica no município de Juruti, Pará, realizados por Garcez et al. (2009), concluíram que 75% dos indivíduos que apresentaram testes positivos para LTA, foram infectados por *L. (V.) braziliensis* e que pelas características da área de estudo e o comportamento de *P. complexus*, esta espécie seria o potencial vetor.

Andrade et al. (2005) fizeram um levantamento da fauna flebotomínica em uma área de treinamento militar na “Zona da Mata”, Pernambuco, onde foram relatados casos de LTA em humanos. As capturas mostraram a predominância de *P. complexus*, tanto nas capturas realizadas com armadilha de luz tipo CDC, quanto naquelas realizadas com armadilha de Shannon. Como resultado da dissecação de fêmeas capturadas, um espécime de *P. complexus* foi encontrado infectado supostamente por *Leishmania* sp., porém a sua identificação não foi possível. Mesmo sem a análise positiva da identificação do parasito, *P. complexus* foi sugerida como potencial vetor de *L. (V.) braziliensis*, pelas características epidemiológicas da região e pela alta frequência dessa espécie de flebotomíneo na área.

Vilela et al. (2013) demonstraram que em Guaraí/TO a presença de *P. complexus* em áreas onde ocorrem casos de LTA e o achado de espécimes naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* pode sugerir a participação dessa espécie no ciclo de transmissão desse agente etiológico fora da Amazônia.

*Psychodopygus wellcomei* é o principal vetor de *L. (V.) braziliensis* na região norte do país (Amazônia Legal). Todavia, tem sido registrado em áreas fora dessa região (SILVA; VASCONCELOS, 2005; RANGEL; LAINSON, 2009; REBÊLO et al., 2010; PINHEIRO et al., 2013). Ready et al. (1991) conseguiram através de análises moleculares separar espécimes, de localidades diferentes, de *P. wellcomei* e *P. complexus*, porém nenhum outro estudo foi realizado com as demais espécies da Série Chagasi para validar a metodologia utilizada para diferenciar todas as espécies desse grupo.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

Phlebotominae representa um dos grupos de insetos de grande importância médica, especialmente para o Brasil, estando associado à transmissão de agentes das leishmanioses tegumentar e visceral. A complexidade que envolve um conhecimento mais apurado sobre a eco-epidemiologia destas doenças está especialmente no fato de que as cadeias de transmissão

das leishmanioses têm uma diversidade dos seus componentes: parasitos, vetores e reservatórios, especialmente em relação à LTA, hoje dispersa por todos os Estados.

Nesse sentido, espécies que possuem fêmeas morfologicamente muito semelhantes trazem um problema ainda maior quando estas têm importância epidemiológica, tal como no gênero *Psychodopygus*, considerando que a correta identificação de espécies é de fundamental importância no planejamento das ações de controle e vigilância, preconizadas pelo Ministério da Saúde. A identificação específica errônea poderá levar a ações falhas ou pouco efetivas no controle da LTA, em áreas de ocorrência de espécies com fêmeas indistinguíveis.

Em termos da Vigilância Entomológica (VE) da LTA, e considerando que a transmissão de *Leishmania* spp. está exclusivamente ligada às fêmeas, a correta identificação dos espécimes assume um papel de suma relevância, pois alguns dos objetivos da VE estão associados com a identificação das espécies de flebotomíneos em áreas novas de transmissão, em áreas endêmicas, inclusive no ambiente antrópico. Destaca-se, neste contexto, a pesquisa entomológica em foco, que busca verificar a presença e identificar os potenciais vetores, o que é fundamental na investigação epidemiológica, que pode confirmar autoctonia de casos humanos. Na perspectiva da vigilância e controle da LTA, tais aspectos assumem um papel importante na definição das ações a serem empregadas (BRASIL, 2017).

A existência de fêmeas morfologicamente muito semelhantes representa um grande desafio para a taxonomia e consequente sistemática de grupos de insetos, o que torna o emprego de diferentes ferramentas e métodos necessário para a caracterização específica dessas espécies. O uso dessas novas ferramentas pode não só mostrar novas características desses grupos, como também, contribuir para o entendimento da bionomia e diversidade das espécies estudadas.

Neste contexto, o presente estudo visou definir técnicas adequadas para identificar os parâmetros morfológicos e moleculares que possam colaborar com a taxonomia do gênero *Psychodopygus*, Série Chagasi, especialmente, para as espécies consideradas importantes vetores de LTA no Brasil, cujas fêmeas são morfologicamente muito semelhantes.

## Conclusões

O estudo foi capaz de diferenciar completamente as cinco fêmeas previamente indistinguíveis da Série Chagasi usando análises morfométricas lineares, geométricas e, também, forneceu novos caracteres morfológicos, como o padrão de coloração do tórax, que facilitarão a identificação dessas espécies em estudos futuros. O uso do gene *COI* do mtDNA, apesar de não distinguir completamente todas as espécies as agrupou da mesma forma que observado pela morfologia da coloração do tórax e da genitália dos machos. O mesmo acontecendo para o *Citocromo B* que em nosso estudo obteve resultados muito próximos ao visto com o *COI* (APÊNDICE VI). Os resultados do sequenciamento do gene Nuclear *period* revelou que os primers utilizados para a análise não funcionam corretamente para as espécies da Série Chagasi (APÊNDICE VII), mostrando que existe a necessidade de produzir diferentes primers para futuras avaliações desse grupo.

O emprego da morfometria geométrica para analisar a cabeça de *P. complexus*, de *P. wellcomei*, *P. chagasi*, *P. squamiventris maripaensis* e *P. squamiventris squamiventris* se mostrou altamente eficiente na distinção de todas as espécies, tanto para tamanho do centróide quanto para a forma juntos. Sendo a análise nessa estrutura muito mais eficaz do que a vista para o mesmo conjunto de espécies, porém utilizando a geometria das asas. Este resultado evidencia a possibilidade da morfometria geométrica de cabeça ser utilizada como uma importante abordagem para futuros estudos taxonômicos de flebotomíneos, inclusive de espécies morfologicamente próximas.

Além disso, o estudo foi capaz de descrever a morfologia das estruturas sensoriais presentes na antena dos machos da Série Chagasi, destacando a diferença entre a papila no flagelômero 1 e os dois últimos segmentos. Pela primeira vez, as cerdas presentes no anepímero foram caracterizadas, mostrando que *P. squamiventris squamiventris* possui uma cerda diferenciada neste esclerito. Quanto à genitália masculina, foi possível descrever completamente as cerdas e estruturas presentes de cada espécie, mostrando características que não são possíveis observar com microscopia óptica, como as pequenas cerdas (sensilas basicônicas) presentes no ápice do parâmero das subespécies de *squamiventris*, e os sulcos presentes nesta região e no lóbulo do parâmero de *P. complexus* e *P. wellcomei*. Além disso, se pode mostrar as espículas presentes no ápice dos dutos edeagais e a diferente morfologia da bainha parameral das cinco espécies. Com esses resultados, nós fornecemos novas informações sobre a genitália masculina, que podem ajudar futuros estudos sistemáticos, morfológicos e taxonômicos dessas espécies.

Adicionalmente, os resultados da revisão da distribuição geográfica permitiram uma separação geográfica entre espécies como *P. complexus* / *P. wellcomei* que são restritas à área ao sul do rio Amazonas e as subespécies de *squamiventris* que têm sua distribuição limitada à área ao norte deste rio. Além disso, nossos resultados corroboram as teorias de estudos anteriores de que *P. s. squamiventris* e *P. s. maripaensis* são espécies alopátricas. As outras espécies do grupo parecem estar restritas a pequenas áreas geográficas, com exceção de *P. bernalei*, que possui uma distribuição latitudinal ampla e inconsistente. Modelagem ecológica de nicho mostrou uma probabilidade de *P. s. squamiventris* se expandir áreas onde *P. s. maripaensis* ocorre no Amapá, Brasil; o mesmo ocorre com *P. complexus* e *P. wellcomei*, sendo a primeira espécie capaz de ocupar áreas em que só *P. wellcomei* é registrada atualmente. Ademais, foi apresentada uma hipótese para o surgimento do grupo baseado na orogênese da formação dos Andes e do rio Amazonas.

Em conclusão, considerando as cinco espécies da série Chagasi avaliadas no presente estudo, podemos usar algumas ferramentas e métodos para diferenciar entre as fêmeas dessas espécies. *Psychodopygus chagasi*, a espécie com maior distribuição geográfica do grupo, é facilmente separada das outras espécies pela coloração do pronoto e pós-noto que são pálidos (sem coloração) e nas demais, castanhos.

*Psychodopygus squamiventris maripaensis* se diferencia de *P. complexus* e *P. wellcomei* pela coloração do pronoto e pós-noto que naquela espécie se apresentam totalmente castanhos (mesma característica de *P. s. squamiventris*) e nessas duas outras espécies o pronoto é pálido. Ademais, *P. s. maripaensis* ocorre apenas ao norte do Rio Amazonas, área onde essas espécies estão ausentes. A distribuição dessa espécie está limitada à região leste do escudo das Guianas, o que a diferencia de *P. s. squamiventris*, que também está presente nessa região, porém mais a oeste. Como são espécies alopátricas, a distribuição geográfica é a principal forma de separar essas subespécies, porém, as análises de função discriminante utilizando dados de morfometria linear e os tamanhos dos centróides da morfometria geométrica das asas e cabeças podem ser usados para diferenciar essas espécies.

*Psychodopygus complexus* e *P. wellcomei* ocorrem ao sul do Rio Amazonas, e mesmo a primeira tendo uma distribuição mais ampla e presente em áreas mais ao oeste da Amazônia, a ocorrência em simpatria em algumas áreas dificulta a separação dessas espécies, haja vista que não se separam pela morfologia. Desta forma, assim como nas subespécies de *squamiventris*, o uso das análises de função discriminante utilizando dados de morfometria linear e os tamanhos dos centróides da morfometria geométrica das asas e cabeças podem ser usados para diferenciar essas espécies.

Como perspectivas futuras para a taxonomia do grupo, estão a redescritção e descrição de um dos sexos de espécies *P. s. squamiventris*, *P. s. maripaensis* e *P. complexus* que não foram formalmente descritos. Além disso, a avaliação de diferentes populações das espécies estudadas se faz necessária. Isto porque foram encontradas grandes diferenças nas sequências entre populações de uma mesma espécie.



## REFERÊNCIAS

ADLER, S.; THEODOR, O. On the Minutus Group of the Genus *Phlebotomus* in Palestine. **Bulletin of Entomological Research**, v. 16, n. 4, p. 399–405, mar. 1926.

ALVES, VR. Revisão taxonômica e análise filogenética de *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Tese (Doutorado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 220 pp. 2013.

ANDRADE, M. S.; VALENÇA, H. F.; SILVA, A. L. da; ALMEIDA, F. de A.; ALMEIDA, E. L.; BRITO, M. E. F. de; BRANDÃO FILHO, S. P. Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1761–1767, dez. 2005.

AZEVEDO, A. C.; SOUZA, N. A.; MENESES, C. R.; COSTA, W. A.; COSTA, S. M.; LIMA, J. B.; RANGEL, E. F. Ecology of Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the North of the State of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 459–464, jun. 2002.

BARRETTO, M.P. Introdução ao Estudo Sistemático dos Flebotomíneos Americanos. Tese Prof. Catedrat., Fac. Medicina Ribeirão Preto. S. pp. 171, 1961.

BARRETTO, M.P. Nova subgeneras de *Lutzomyia* Franca. 1924 (Psychodidae, subfamilia Phlebotominae). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 4, p. 91-100, 1962.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 1ª. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017.

BRAZIL RP, BRAZIL BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In, Rangel, E. F.; Lainson, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 257-274, 2003.

BOOKSTEIN FL. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. **Cambridge University Press**, 1991.

CASTRO GO. Sobre o processo de cultura de flebotomos Nota prévia. In. **Sociedade de Biologia**, sessão de 8 de outubro, Rio de Janeiro, 1937.

CERQUEIRA, N. L. Um novo meio para montagem de pequenos insetos em lâmina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, n. 1, p. 37–41, ago. 1943.

COSTA LIMA A. Um novo “*Flebotomus*” da Amazônia e con-siderações relativas as espécies afins (Diptera: Psychodidae). **Acta Med**, v. 7, p. 3-19, 1941.

DE SOUZA, A.; ISHIKAWA, E.; BRAGA, R.; SILVEIRA, F.; LAINSON, R.; SHAW, J. *Psychodopygus* Complexus, a New Vector of *Leishmania Braziliensis* to Humans in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 112–113, abr. 1996.

FAIRCHILD, G. B.; HERTIG, M. Notes on the Phlebotomus of Panama (Diptera, Psychodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 44, n. 3, p. 399–421, 1 set. 1951.

FÉ, N. F.; FREITAS, D.; ALVES, R.; BARRETT, T. V. Phlebotomine Sand Flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a Description of *Lutzomyia* (Psychodopygus) *douradoi* n. sp. (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 331–336, maio 1998.

FELICIANGELI, M. D.; RAMIREZ PEREZ, J.; RAMIREZ, A. The Phlebotomine Sandflies of Venezuelan Amazonia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 2, n. 1, p. 47–65, jan. 1988.

FLOCH, H.; ABONNENC E. Phlebotomes de Guyane Francaise. (XVII). *P.maripaensis* n. sp. et *P. sp.* de Maripa. **Inst. Pasteur Guyane**, Publ. No. 140, 6 p, 1946..

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, out. 1994.

FORATTINI, O. P. Nota sôbre *Psychodopygus squamiventris* (Lutz & Neiva, 1912) e espécies afins (Diptera, Psychodidae). **Revista de Saúde Pública**, v. 5, n. 1, p. 151–154, jun. 1971.

FRAIHA, H.; RYAN, L.; WARD, R. D.; LAINSON, R.; SHAW, J.; FRAIHA, H.; RYAN, L.; WARD, R. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. *Psychodopygus Leonidasdeanei* a new species of sand fly (Diptera: Psychodidae) from Pará State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 333–339, set. 1986.

FRAIHA, H.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Phlebotominae brasileiros: II - *Psychodopygus wellcomei*, nova espécie antropófila de flebotomo do grupo *squamiventris*, do Sul do Estado do Pará, Brasil (Diptera, Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 69, n. 3, p. 489–500, 1971.

FRAIHA, H. et al. Flebotomídeos Brasileiros. IV. Nota sobre *Psychodopygus chagasi* (Costa Lima, 1941) (Diptera: Phlebotominae). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 34, p. 89-91, 1974.

FRAIHA, H.; WARD, R. D.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Anthropophilic phlebotomine sandflies of the Trans-Amazonian Highway in Brazil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 84, n. 2, p. 134–439, 1978.

FORATTINI OP. Entomologia Médica, vol. 4. São Paulo: Ed. **Edgard Blucher & Ed. USP**; 1973.

GALATI E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. **Bol Dir Malariol San Amb.**, v. 35(1), p. 133-142, 1995.

GALATI E. A. B. Classificação de Phlebotominae e Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In, Rangel, E. F.; Lainson, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 23-175, 2003.

GALATI, E. A. B.; GALVIS-OVALLOS, F.; LAWYER, P.; LÉGER, N.; DEPAQUIT, J. An Illustrated Guide for Characters and Terminology Used in Descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite (Paris, France)**, v. 24, p. 26, 2017.

GARCEZ, L. M.; SOARES, D. C.; CHAGAS, A. P.; DE SOUZA, G. C. R.; MIRANDA, J. F. C.; FRAIHA, H.; FLÖETER-WINTER, L. M.; NUNES, H. M.; ZAMPIERE, R. A.; SHAW, J. J. Etiology of Cutaneous Leishmaniasis and Anthropophilic Vectors in Juruti, Pará State, Brazil. **Cadernos De Saúde Pública**, v. 25, n. 10, p. 2291–2295, out. 2009.

GIL, L. H.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M.; SHAW, J. J. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 751–755, set. 2003.

HAYAT, M. A.; GIAQUINTA, R. Rapid Fixation and Embedding for Electron Microscopy. **Tissue & Cell**, v. 2, n. 2, p. 191–195, 1970.

JOWETT T. Preparation of nucleic acids. In DB Roberts (ed.), *Drosophila: A practical approach*, **IRL Press**, Oxford, p. 347-371, 1998.

KLINGENBERG CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Mol. Ecol. Resour.**, v. 11, p. 353-357, 2011.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

LEWIS, D. J.; YOUNG, D. G.; FAIRCHILD, G. B.; MINTER, D. M. Proposals for a Stable Classification of the Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**, v. 2, n. 4, p. 319–332, 1977.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do genero *Phlebotomus* existentes no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 1, p. 84–95, 1912.

MANGABEIRA, O. 4<sup>a</sup> Contribuição ao estudo dos Flebotomus: *Psychodopygus* n. subg.: (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 36, n. 3, p. 237–250, 1941.

MARTINS, A. V. et al. – Notas sobre os flebotomos do grupo squamiventris do subgênero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera, Psychodidae). **Bol. Museu Hist. nat. Minas Gerais**, v. 1, p. 1-33, 1968.

MARTINS, A.V. *Lutzomyia (Psychodopygus) fairtigi* n. sp. from Colombia (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Proc. Ent. Soc. Wash.**, v.72, p. 279, 1970.

OSORNO-MESA, E.; MORALES-ALARCÓN, A.; DE OSORNO, F. Phlebotominae De Colombia (Diptera, Psychodidae): I. Distribucion Geografica De Especies De Phlebotomus Registradas Con Algunas Anotaciones Biologicas Y Descripcion De Una Nueva. **Caldasia**, v. 10, n. 46, p. 27–38, 1967.

PEIXOTO, A. A.; GOMES, C. A.; DE AMORETTY, P. R.; LINS, R. M.; MEIRELES-

FILHO, A. C.; DE SOUZA, N. A.; KYRIACOU, C. P. New Molecular Markers for Phlebotomine Sand Flies. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 5–6, p. 635–639, 1 maio 2001.

PETERSON, A. T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International journal for parasitology*, v. 33, n. 9, p. 919–931, ago. 2003.

PINHEIRO, M. P. G.; SILVA, J. H. T.; CAVALCANTI, K. B.; DE AZEVEDO, P. R. M.; DE MELO XIMENES, M. de F. F. Ecological Interactions among Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an Agroforestry Environment of Northeast Brazil. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, v. 38, n. 2, p. 307–316, dez. 2013.

PUGEDO, H.; BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p. 70–72, fev. 2005.

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

READY, P. D.; FRAIHA, H.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Psychodopygus* as a Genus: Reasons for a Flexible Classification of the Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 17, n. 1, p. 75–88, 31 jan. 1980.

READY, P. D.; FRAIHA, H.; LANE, R. P.; ARIAS, J. R.; PAJOT, F. X. On Distinguishing the Female of *Psychodopygus Wellcomei*, a Vector of Mucocutaneous Leishmaniasis, from Other *Squamiventris* Series Females. I. Characterization of *Ps. squamiventris squamiventris* and *Ps. s. maripaensis* Stat. Nov. (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 76, n. 2, p. 201–214, abr. 1982.

READY, P. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SOUZA, A. A. DNA Probes for Distinguishing *Psychodopygus Wellcomei* from *Psychodopygus* Complexus (Diptera: Psychodidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, n. 1, p. 41–49, mar. 1991.

REBÊLO, J. M. M.; JÚNIOR, A.; NASCIMENTO, A.; SILVA, O.; MORAES, J. L. P. Occurrence of sand flies (Diptera, Psychodidae) in leishmaniasis foci in an ecotourism area around the Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 26, n. 1, p. 195–198, jan. 2010.

ROHLF, F. J. tpsDig. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York, 2010.

SHANNON, R. C. Methods for Collecting and Feeding Mosquitoes in Jungle Yellow Fever Studies I. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. s1-19, n. 2, p. 131–140, 1 mar. 1939.

SHIMABUKURO, P. H. F.; ANDRADE, A. J. de; GALATI, E. A. B. Checklist of American Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Genera, Species, and Their Distribution. *ZooKeys*, v. 660, p. 67–106, 8 mar. 2017.

SILVA, D. F.; VASCONCELOS, S. D. Flebotomíneo em fragmentos de Mata Atlântica na Região Metropolitana do Recife, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 264–266, maio 2005.

SUDIA WD, CHAMBERLAIN RW. Battery operated light trap, an improved model. **Mosq. News.**; v. 22, p. 126-129, 1962.

SUMMERS. S. L. M. A new species of Phlebotomus from South America. **Bull. Ent. Res.**, v. 3, p. 209-210, 1912.

THEODOR, O. On the Classification of American Phlebotominae. **Journal of Medical Entomology**, v. 2, n. 2, p. 171–197, jun. 1965.

VILELA, M. L.; PITA-PEREIRA, D. de; AZEVEDO, C. G.; GODOY, R. E.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. The Phlebotomine Fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, State of Tocantins, with an Emphasis on the Putative Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Rural Settlement and Periurban Areas. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 578–585, ago. 2013.

WARD, R. D.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotomine fauna of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis, in the Serra dos Carajas, Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, n. 2, p. 174–183, 1973.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010a. Geneva: **WHO Press**; 2010a. (WHO Technical Report Series, n° 949).

ZAPATA, S. et al. Morphometric and Molecular Characterization of the Series Guyanensis (Diptera, Psychodidae, Psychodopygus) from the Ecuadorian Amazon Basin with Description of a New Species. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 5, p. 966–977, jul. 2012.

YOUNG, D. G. AND M. A. DUNCAN. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Am. Entomol. Institute**, Associated Publishers, Gainesville, Florida, 1994.