

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

LEONARDO ESTEVAM HONORATO DA SILVA

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE ESPÉCIES DA SÉRIE SHANNONI DE *Psathyromyia*
(*Psathyromyia*) BARRETTO, 1962 (DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

**SÃO PAULO - SP
2022**

LEONARDO ESTEVAM HONORATO DA SILVA

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE ESPÉCIES DA SÉRIE SHANNONI DE *Psathyromyia*
(*Psathyromyia*) BARRETTO, 1962 (DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dra. Eunice Aparecida Bianchi
Galati

**SÃO PAULO - SP
2022**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Silva, Leonardo Estevam Honorato da
Taxonomia integrativa de espécies da série Shannoni de
Psathyromyia (Psathyromyia) Barretto, 1962 (Diptera,
Psychodidae, Phlebotominae) do estado de São Paulo /
Leonardo Estevam Honorato da Silva; orientadora Eunice
Aparecida Bianchi Galati. -- São Paulo, 2022.
92 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo, 2022.

1. Phlebotominae. 2. Psathyromyia. 3. Série Shannoni.
4. Taxonomia integrativa. 5. DNA barcoding. I. Galati,
Eunice Aparecida Bianchi, orient. II. Título.

LEONARDO ESTEVAM HONORATO DA SILVA

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE ESPÉCIES DA SÉRIE SHANNONI DE *Psathyromyia*
(*Psathyromyia*) BARRETTO, 1962 (DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Pública

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profª. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP)

Dra. Priscila Bassan Sábio
Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP)

Dr. Rodrigo Espíndola Godoy

AGRADECIMENTOS

“Um galo sozinho não tece uma manhã”
(João Cabral de Melo Neto)

À vida, por me permitir estudá-la na forma de flebotomíneos.

À CAPES, pela bolsa concedida, fundamental para a realização desta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, pela agradável orientação desde a minha iniciação científica e compartilhamento de saberes durante todos esses anos.

À Dra. Priscila Bassan Sábio, pelas valiosas contribuições ainda na fase de projeto desta pesquisa, pelas palavras de incentivo e solicitude sempre que precisei.

Ao Dr. Rodrigo Espíndola Godoy, que mesmo longe não poupou esforços para me auxiliar sempre que precisei.

À Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG), pelas valiosas contribuições ainda na fase de projeto desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Andrey José de Andrade da UFPR, por ter aceitado participar da banca na condição de membro suplente.

Ao Dr. Fredy Galvis Ovallos da FSP-USP, pelas enriquecedoras conversas e todo o auxílio no laboratório, na realização de coletas na Serra da Cantareira na tentativa de coletar espécimes de *Psathyromyia baratai* e por ter viabilizado a etapa de biologia molecular deste projeto.

Aos doutorandos Bruno Leite Rodrigues, Mariana Dantas da Silva e Laura Cristina Posada-López, pelos auxílios em coletas e enriquecedora convivência no laboratório. Ao Bruno, um agradecimento especial por todo o suporte e compartilhamento de saberes em toda a etapa de biologia molecular deste trabalho. À Laura, um agradecimento especial pelo auxílio e compartilhamento de saberes na parte de biologia molecular deste projeto.

À técnica bióloga Dra. Marcia Bicudo de Paula da FSP-USP pela agradável convivência no laboratório, pelas enriquecedoras conversas e ensinamentos sobre os flebotomíneos e mosquitos.

À técnica Dra. Miriam Lopes do Departamento de Microbiologia Ambiental da FSP-USP, por autoclavar microtubos para mim sempre que pedi e pela solicitude sempre que precisei.

À Dra. Ana Maria Duarte (IMT-USP), por me dispor o laboratório de protozoologia para eu realizar a eletroforese em gel desta pesquisa.

À Ma. Vanessa Gusmon da Silva, por toda a assistência durante a fase de preparação para o mestrado, ainda durante a minha graduação.

Ao Dr. Antônio Ralph Medeiros de Sousa, pelos esclarecimentos na parte de estatística deste projeto.

Aos curadores das coleções entomológicas consultadas: Dra. Flávia Virginio (Instituto Butantan), Prof. Dra. Maria Anice Mureb Sallum e Denise Sant'Ana (Faculdade de Saúde Pública-USP), Dr. José Dilermando Andrade-Filho e Carolina Cunha (Instituto René Rachou-Fiocruz-MG), Prof. Dr. Carlos Lamas e Camila Conti (Museu de Zoologia-USP) e Neide Castelo (Centro de Controle de Zoonoses-CCZ) por me permitirem a análise dos espécimes de *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) depositados nessas coleções, inclusive a série-tipo das espécies da série Shannoni.

À equipe do Laboratório de Fauna Sinantrópica (Labfauna) do CCZ: Alessandra Bergamo, Raquel Emile e Clara, e à equipe de campo pelo auxílio nas coletas realizadas nos Parques Jaraguá e Cantareira na tentativa de coletar espécimes de *Psathyromyia limai* e *Psathyromyia baratai*.

Aos pesquisadores da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), pelas coletas realizadas em Mato Grosso do Sul na tentativa de coletar *Psathyromyia bigeniculata* para este projeto.

Ao Ademir Galati (*in memorian*) e Rafael Galati pela assistência nas coletas no Parque Intervales e em São Lourenço da Serra, na tentativa de coletar espécimes de *Psathyromyia ribeirensis*, *Psathyromyia baratai* e *Psathyromyia limai*.

Ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo, pela autorização de coleta nos Parques Estaduais. À Aline, técnica do Parque Cantareira e ao Emerson e Zé Floyde, guias do Parque Intervales.

Aos meus pais, Damiana Estevam e Benedito Honorato (*in memorian*), pelo apoio, e às minhas tias, em especial à Maria Marieta (madrinha Tieta). À toda a minha família.

À minha “aniga” Samara Estulano, à Bruna Silva e ao Paulo Ricardo, pela amizade. A todos os meus amigos.

A todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Obrigado!

*“[...] Vou aprender a ler
Pra ensinar meus camaradas”*

José Capinan/Roberto Mendes

SILVA, L. E. H. **Taxonomia integrativa de espécies da série Shannoni de *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) Barretto, 1962 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do estado de São Paulo** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2022

RESUMO

Os flebotomíneos são dípteros que habitam ambientes florestais e antrópicos e são encontrados comumente em cavernas. Com exceção da Antártica, habitam todos os demais continentes. Atualmente o grupo é composto por pouco mais de 1.000 espécies. As fêmeas são hematófagas e várias espécies apresentam relevância em saúde pública como vetores de agentes de leishmanioses, arboviroses e bartonelose. A taxonomia dos flebotomíneos vem se desenvolvendo desde o início do século XX amplamente baseada em estudos morfológicos e morfométricos lineares das formas adultas. Atualmente tem sido recomendada a abordagem integrativa na delimitação das espécies, que além dos estudos clássicos, utiliza informações moleculares, das formas imaturas, geometria e ecologia, além de outros parâmetros. O objetivo deste projeto foi contribuir para um melhor conhecimento das quatro espécies do subgênero *Psathyromyia* que ocorrem no estado de São Paulo, duas das quais foram recentemente descritas (*Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis*) e as duas outras revalidadas (*Pa. bigeniculata* e *Pa. limai*), a fim de encontrar diferenças entre as fêmeas dessas espécies, morfologicamente muito semelhantes. Coleções entomológicas foram consultadas, e para a coleta de espécimes foram amostrados ambientes florestais e antrópicos do estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul, utilizando diferentes armadilhas de coleta. Foram realizadas análises discriminantes na morfometria linear de estruturas da cabeça e na morfometria geométrica das asas, além de análises moleculares do fragmento do gene *citocromo c oxidase subunidade I (COI)* por meio da construção de uma árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) e método de delimitação de espécies ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*), com a inclusão de sequências de *Pa. abonnenci*, *Pa. bigeniculata* e *Pa. shannoni* depositadas no *GenBank*. Como resultados, as análises discriminantes da morfometria linear possibilitaram a separação das espécies, exceto o par *Pa. ribeirensis/Pa. limai*. Para a morfometria geométrica, o tamanho do centroide evidenciou diferenças entre as asas de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* em relação à de *Pa. bigeniculata* e a análise de variância de procrustes evidenciou a separação de todas as espécies, mesmo após a validação cruzada, exceto entre *Pa. ribeirensis* e *Pa. limai*, sugerindo que essas duas espécies são indistinguíveis morfometricamente. As análises do fragmento do gene *COI* foram úteis para separar as espécies. *Psathyromyia bigeniculata* apresentou altos valores de distância intraespecífica (4,7%), que pode representar diversidade críptica. De modo geral, a taxonomia integrativa foi útil para separar três das quatro espécies estudadas e corrobora a retirada de *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata* da sinonímia de *Pa. shannoni*, bem como a descrição de *Pa. baratai* como um táxon diferente. Fêmeas de *Pa. ribeirensis* permanecem indistinguíveis daquelas de *Pa. limai* pela morfologia e morfometrias linear e geométrica.

Palavras-chave: Morfometria linear. Morfometria geométrica. Análise molecular. *Citocromo c oxidase subunidade I*. Phlebotominae. Série Shannoni. Taxonomia integrativa.

SILVA, L. E. H. **Integrative taxonomy of *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) Barretto, 1962 Shannoni series species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from São Paulo state** [Master's Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2022

ABSTRACT

Sand flies are dipterans that inhabit forest and anthropic environments and are commonly found in caves. Except for Antarctica, they inhabit all other continents. Currently the group comprises about 1,000 species. Females are hematophagous and several species are relevant for public health as leishmaniasis, arboviruses and bartonellosis agent vectors. The taxonomy of sand flies has been developing since the beginning of the 20th century, largely based on morphological and linear morphometric studies of the adult forms. Currently, an integrative approach to species delimitation has been recommended, which, in addition to classical studies, uses molecular information, immature forms, geometry and ecology, among other parameters. The aim of this project was to contribute to a better understanding of the four species of the *Psathyromyia* subgenus that occur in the state of São Paulo, two of them were recently described (*Pa. baratai* and *Pa. ribeirensis*) and the two others revalidated (*Pa. bigeniculata* and *Pa. limai*), in order to find differences between the females of the species, which have similar morphological traits. Museum entomological collections were consulted, and wild-caught specimens were collected in forest and anthropic environments in the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul, using different collection traps. Discriminant analyzes were performed on the linear morphometry of head structures and on geometric morphometry of wing, in addition to molecular analyzes of the *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* gene fragment by means of the construction of a Neighbor-Joining (NJ) tree and species delimitation method ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), with the inclusion of *Pa. abonnenci*, *Pa. bigeniculata* and *Pa. shannoni* sequences deposited in *GenBank*. As a result, the discriminant analyzes of linear morphometry allowed the separation of species, except for the pair *Pa. ribeirensis/Pa. limai*. For the geometric morphometry, the centroid size showed differences between wings of *Pa. limai* and *Pa. ribeirensis* in relation to that of *Pa. bigeniculata*, while the procrustes analysis of variance showed the separation of all species even after cross-validation, except between *Pa. ribeirensis* and *Pa. limai*, suggesting that these two species are morphometrically indistinguishable. *COI* gene fragment analyzes were useful to separate the species. *Psathyromyia bigeniculata* showed high intraspecific distance values (4.7%), which may represent cryptic diversity. In general, the integrative taxonomy was useful to separate three of the four species studied and corroborates the resurrection of *Pa. limai* and *Pa. bigeniculata* from the synonymy of *Pa. shannoni*, as well as the description of *Pa. baratai* as a different taxon. Females of *Pa. ribeirensis* remain indistinguishable from those of *Pa. limai* for linear and geometric morphology and morphology.

Keywords: Linear morphometry. Geometric morphometry. Molecular analysis. *Cytochrome c oxidase subunit I*. Phlebotominae. Shannoni series. Integrative taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cladograma da subfamília Phlebotominae com tribos, subtribos e alguns gêneros	20
Figura 2 – Fêmea de <i>Phlebotomus papatasi</i> realizando hematofagia	22
Figura 3 – Ilustração da cabeça de Phlebotominae em vista dorsal (A) e ventral (B)	23
Figura 4 – Asa de <i>Pa. ribeirensis</i> evidenciando as veias alares	24
Figura 5 – Cladograma da subfamília Phlebotominae com gêneros, subgêneros, grupos de espécies e séries de espécies da subtribo Psychodopygina	29
Figura 6 – Estruturas da série Shannoni do subgênero <i>Psathyromyia</i> . A: ascoides com prolongamento posterior longo (contornado para evidenciar) (ponta das setas) em <i>Pa. baratai</i> . B: um trio de sensilas nos escleritos cervicais (ponta da seta) em <i>Pa. limai</i> . C: gonóstilo de <i>Pa. limai</i> . D: cibário de <i>Pa. limai</i> .	30
Figura 7 – Estruturas para diagnose de <i>Pa. bigeniculata</i> . A: tórax. B: espermatecas (ponta das setas). C: terminália do macho. D: detalhe do parâmero	31
Figura 8 – Estruturas para diagnose de <i>Pa. limai</i> . A: tórax (holótipo). B: espermatecas (ponta das setas). C: terminália do macho. D: detalhe do parâmero	32
Figura 9 – Estruturas para diagnose de <i>Pa. baratai</i> . A: tórax (alótipo). B: espermatecas (ponta da seta). C: terminália do macho (holótipo). D: detalhe do parâmero (holótipo)	33
Figura 10 – Estruturas para diagnose de <i>Pa. ribeirensis</i> . A: tórax (parátipo). B: espermatecas (ponta das setas) (parátipo). C: terminália do macho (holótipo). D: detalhe do parâmero (holótipo)	34
Figura 11 – Localidades de coleta das espécies da série Shannoni para este estudo	39
Figura 12 – Armadilhas utilizadas para a captura de flebotomíneos. A: armadilhas de Shannon. B: armadilhas CDC	40
Figura 13 – Clarificação, montagem e armazenamento de flebotomíneos. A: estruturas em eugenol. B: montagem de espécimes machos. C: montagem de espécimes fêmeas. D: armazenamento para extração do DNA	41
Figura 14 – Marcos anatômicos iniciais utilizados para a morfometria geométrica alar das quatro espécies da série Shannoni estudadas	43
Figura 15 – Gel de agarose a 1,7% sob luz ultravioleta evidenciando amplificação positiva para o fragmento de gene <i>COI</i> (658 pb) das espécies estudadas	46

Figura 16 – Gráfico mostrando a distribuição das quatro espécies da série Shannoni estudadas em função das variáveis canônicas discriminantes 1 (65,96%) e 2 (27,58%), utilizando as 16 estruturas analisadas	51
Figura 17 – Numeração inicial e nova numeração para os 6 <i>landmarks</i> (em preto) que mais contribuíram para a separação das fêmeas das quatro espécies da série Shannoni estudadas..	52
Figura 18 – Análise dos Componentes Principais. A: CP1. B: CP2. C: Gráfico baseado nos dois primeiros componentes principais	53
Figura 19 – Análise das Variáveis Canônicas das quatro espécies da série Shannoni estudadas, utilizando 13 <i>landmarks</i> . A: VC1. B: VC2. C: VC3. D: Gráficos relacionados às variáveis canônicas	54
Figura 20 – Gráfico mostrando a comparação entre o tamanho dos centroides das quatro espécies da série Shannoni estudadas	55
Figura 21 – Gráfico mostrando a comparação entre os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) usando 6 <i>landmarks</i>	56
Figura 22 – Análise dos Componentes Principais com seis <i>landmarks</i> . A: CP1. B: CP2. C: tendência ao alargamento da asa (pontos positivos - azul escuro) em <i>Pa. baratai</i> . D: forma da asa similar à forma média (pontos negativos - linha azul clara). E/F: tendência ao alongamento e estreitamento da asa (pontos positivos - azul escuro) em <i>Pa. limai</i> (E) e <i>Pa. ribeirensis</i> (F)	57
Figura 23 – Análise de Variáveis Canônicas com seis <i>landmarks</i> . A: VC1. B: VC2. C: Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparadas as VC1 e VC2	58
Figura 24 – Formas médias das asas após Análise Discriminante entre <i>Pa. baratai</i> e: A: <i>Pa. bigeniculata</i> . B: <i>Pa. limai</i> . C: <i>Pa. ribeirensis</i> . Entre <i>Pa. bigeniculata</i> e D: <i>Pa. limai</i> . E: <i>Pa. ribeirensis</i> . F: Entre <i>Pa. limai</i> e <i>Pa. ribeirensis</i>	60
Figura 25 – Árvore de <i>neighbor-joining</i> gerada a partir de um fragmento de gene <i>COI</i> de espécies de flebotomíneos da série Shannoni. As amostras em negrito representam as que foram geradas nesse estudo. Os valores próximos aos nós representam o suporte de <i>bootstrap</i> (> 70%). A barra cinza ao lado da árvore corresponde à delimitação de espécies feita pelo algoritmo ABGD.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coleções entomológicas consultadas, com o número de espécimes da série Shannoni de <i>Psathyromyia</i> observados e o tipo de análise realizada.....	37
Tabela 2 – Caracteres da cabeça que separam fêmeas das espécies da série Shannoni com significância estatística.....	49
Tabela 3 – Valores da média, desvio padrão, mínimo, máximo e número de espécimes fêmeas analisados obtidos para cada estrutura das espécies da série Shannoni estudadas (em micrômetros).....	50
Tabela 4 – Distâncias de Mahalanobis e Procrustes entre as formas médias das asas das espécies de da série Shannoni de <i>Psathyromyia</i> estudadas	58
Tabela 5 – Análise discriminante mostrando os valores do teste t^2 e dos valores de p para as distâncias de Procrustes e de Mahalanobis, entre os pares de espécies estudadas, após os 1000 testes de permutação.....	59
Tabela 6 – Lista de espécies, número de sequências depositadas e distâncias genéticas intra e interespecíficas de flebotomíneos da série Shannoni	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABGD	do inglês <i>Automatic Barcode Gap Discovery</i>
ACP	Análise dos Componentes Principais
AGP	Análise Generalizada de Procrustes
AVC	Análise de Variáveis Canônicas
ANOVA	do inglês <i>Analysis of Variance</i>
BOLD	do inglês <i>Barcode of Life Data System</i>
CDC	do inglês <i>Centers for Disease Control</i>
COI	do inglês <i>cytochrome c oxidase subunit I</i>
COLFLEB-Fiocruz	Coleção de Flebotomíneos do Instituto René Rachou/Fiocruz-MG
CC	Classificação Correta
dM	Distância de Mahalanobis
DP	Desvio Padrão
dP	Distância de Procrustes
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ex.	exemplo
FD	Funções Discriminantes
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
K2P	Kimura 2-Parâmetros
LESP-Phlebotominae	Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da USP
MG	Morfometria Geométrica
ML	Morfometria Linear
MOTUs	do inglês <i>Molecular Operational Taxonomic Units</i>
MS	Mato Grosso do Sul
MZUSP	Coleção do Museu de Zoologia da USP
NJ	do inglês <i>Neighbor-Joining</i>
<i>Pa.</i>	<i>Psathyromyia</i> (gênero)
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>Ph.</i>	<i>Phlebotomus</i> (gênero)
(<i>Psa.</i>)	<i>Psathyromyia</i> (subgênero)
rpm	Rotações por minuto
SDS	do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SP	São Paulo
spp.	Espécies
s. str	<i>Sensu stricto</i>
<i>sin.</i>	Sinônimo
TC	Tamanho do Centróide
Tris-HCL	do inglês <i>Tris Hydrochloride</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	16
1.2 HISTÓRICO DA TAXONOMIA DOS PHLEBOTOMINAE.....	17
1.3 MORFOLOGIA DOS ADULTOS	21
1.4 MORFOMETRIA LINEAR E MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	26
1.5 SISTEMÁTICA MOLECULAR APLICADA A PHLEBOTOMINAE	27
1.6 ESPÉCIES DA SÉRIE SHANNONI DO ESTADO DE SÃO PAULO	29
1.6.1 <i>Psathyromyia (Psathyromyia) bigeniculata</i> (Floch & Abonnenc, 1941) sin. <i>Psathyromyia microcephala</i> (Barretto & Duret, 1953)	30
1.6.2 <i>Psathyromyia (Psathyromyia) limai</i> (Fonseca, 1935) sin. <i>Psathyromyia pestanai</i> (Barretto & Coutinho, 1941)	31
1.6.3 <i>Psathyromyia (Psathyromyia) baratai</i> Sábio, Andrade & Galati, 2015	33
1.6.4 <i>Psathyromyia (Psathyromyia) ribeirensis</i> Sábio, Andrade & Galati, 2014.....	33
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 LICENÇAS PARA A PESQUISA	37
4.2 NOMENCLATURA TAXONÔMICA E TERMINOLOGIA	37
4.3 OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES	37
4.3.1 Obtenção de espécimes em coleções entomológicas.....	37
4.3.2 Obtenção de espécimes em campo, tratamento em laboratório e conservação	38
4.4 OBTENÇÃO DE DADOS	41
4.4.1 Morfometria linear e análises estatísticas	41
4.4.2 Morfometria geométrica	42
4.4.2.1 Morfometria geométrica das asas	43
4.4.3 Extração, amplificação, sequenciamento e análise do DNA <i>barcoding</i>	45
5 RESULTADOS	48
5.1 OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES EM LABORATÓRIO	48
5.2 MORFOMETRIA LINEAR.....	48

5.2.1	Análise intraespecífica de <i>Pa. bigeniculata</i>	48
5.2.2	Análise interespecífica	48
5.2.2.1	Análise de variância (ANOVA)	48
5.2.2.2	Análise discriminante	51
5.3	MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	52
5.3.1	Análise inicial para a redução do número de <i>landmarks</i>	52
5.3.2	Morfometria geométrica com 6 <i>landmarks</i>	55
5.3.2.1	ANOVA de centroides.....	55
5.3.2.2	ANOVA de procrustes	56
5.4	ANÁLISES MOLECULARES	60
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	84
	APÊNDICES	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 A SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

A subfamília Phlebotominae distribui-se, com exceção da Antártica, por todos os demais continentes (AKHOUNDI et al., 2016). Também conhecidos como mosquito-palha, birigui, cangalhinha, asa dura, “arrupiado”, tatuquira ou *sand fly* (do inglês: “mosca de areia”), os flebotomíneos são vetores de diversos microorganismos, tais como bactérias, vírus e tripanossomatídeos (FORATTINI, 1973). Especialmente quanto aos tripanossomatídeos, destacam-se as leishmânias, parasitos heteroxênicos do gênero *Leishmania* Ross, 1903, agentes etiológicos das leishmanioses, importantes problemas de saúde pública no Brasil e no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020a).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020b), há uma estimativa de que o número de pessoas afetadas anualmente pela leishmaniose visceral (LV) é entre 50 e 90 mil, deste número, mais de 95% dos casos são registrados no Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Considerando as Américas, 90% dos casos são registrados no Brasil. Em relação à leishmaniose tegumentar (LT), são registrados de 600 mil a um milhão de novos casos por ano em todo o mundo. Em 2018, cerca de 85% dos novos casos ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Síria e Tunísia.

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas distintas, a depender da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. Nas Américas, para a LV, a forma mais grave da doença, a leishmânia tem tropismo para as vísceras dos indivíduos acometidos, atingindo órgãos como o fígado e o baço. A espécie de leishmânia envolvida nessa manifestação clínica da doença é *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908), e a principal espécie vetora é *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (SUPERINTENDÊNCIA DO CONTROLE DE ENDEMIAS - SUCEN, 2020a).

Para a LT, o parasito é dermatrópico, isto é, apresenta tropismo para o tegumento dos indivíduos acometidos. As espécies de leishmânia predominantemente responsáveis por essa manifestação clínica nas Américas, são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Biagi, 1953), *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954, *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira et al., 1987, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira et al., 2002, *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989, *Leishmania (Viannia) panamensis* (Lainson & Shaw, 1972), *Leishmania (Viannia) peruviana* Velez, 1913 e *Leishmania (Viannia)*

shawi Lainson et al., 1989. Quanto aos vetores, predominam espécies dos gêneros *Bichromomyia* Galati, 2003, *Lutzomyia* França, 1924, *Migonemyia* Galati, 2003, *Nyssomyia* Barretto, 1962, *Pintomyia* Costa Lima, 1932, *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 e *Trichophoromyia* Barretto, 1962 (MAROLI et al. 2013; SUCEN, 2020b).

Atualmente são conhecidas 1.047 espécies de flebotomíneos, sendo que 31 delas são fósseis (GALATI, 2021). Para as Américas, 549 espécies são descritas, sendo 17 fósseis. Em relação ao Brasil, são registradas cerca de 262 delas e, no estado de São Paulo, 77 espécies foram encontradas (AGUIAR; VIEIRA, 2018; GALATI, 2018). Aproximadamente, 166 espécies de flebotomíneos foram relatadas como possíveis ou potenciais vetores de diferentes espécies de *Leishmania* no Velho e Novo Mundo, e, dessas, 78 são consideradas como transmissoras de leishmânia, isto é, satisfazem os cinco critérios apresentados por Killick-Kendrick (1990) para incriminar uma espécie como vetora (AKHOUNDI et al., 2016).

Para os flebotomíneos da série Shannoni do subgênero *Psathyromyia* Barretto, 1962, *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929) mostrou-se competente na transmissão de *Leishmania* (*L.*) *mexicana* entre hamsters (LAWYER et al., 1987) e, nos Estados Unidos, essa mesma espécie de flebotomíneo é relatada como vetora do vírus da estomatite vesicular (VSV) (COMER et al., 1994). Em Bonito, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, fêmeas de *Psathyromyia bigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1941) foram encontradas naturalmente infectadas por flagelados (BRILHANTE et al., 2015).

1.2 HISTÓRICO DA TAXONOMIA DOS PHLEBOTOMINAE

Os flebotomíneos são inseridos na classe Insecta Linnaeus, 1758, ordem Diptera Linnaeus, 1758, família Psychodidae Newman, 1834 e subfamília Phlebotominae Rondani & Berte, in Rondani 1840. São diversos os autores que se dedicaram ao estudo da taxonomia dos Phlebotominae baseada no estágio de imago, dentre os quais pode-se citar Newstead (1911; 1914), Theodor (1948; 1965), Young & Fairchild (1974), Lewis et al. (1977), Martins, Williams e Falcão (1978), Young & Duncan (1994) e Galati (1995, 2003, 2018).

Para a subfamília Phlebotominae, *Bibio papatasi* Scopoli, 1786¹ (apud THEODOR, 1948) foi a primeira espécie descrita e *Flebotomus* Rondani & Berte, 1840² o primeiro gênero,

¹ SCOPOLI, J. A. *Deliciae florae et faune Insubricaе*. Pavia, 85p, 1786.

² Rondani, C. Sopra una specie di insetto dittero. *Memoria prima per servire alla Ditterologia italiana*. Parma 1. 1840.

sendo *F. papatasi* (Scopoli, 1786) a espécie-tipo. Mais tarde, Agassiz (1846)³ (apud GALATI, 2003) modificou a grafia de *Flebotomus* para *Phlebotomus*.

Para os flebotomíneos americanos, Coquillett (1907)⁴ (apud GALATI, 2003) fez as primeiras descrições: *Flebotomus vexator* e *F. cruciatus*, discordando da correção de Agassiz para *Phlebotomus*. Em 1911, Newstead propõe a divisão de *Phlebotomus* baseada nas cerdas que revestem o abdômen e, três anos depois, sugere a divisão baseada em diferenças de características da genitália masculina, venação alar, fórmula palpal e das antenas (NEWSTEAD, 1911, 1914).

Em 1919, França⁵ (apud GALATI, 2003) propõe a divisão do gênero *Phlebotomus* em dois subgêneros a partir da genitália dos machos: subgênero *Phlebotomus* s. str. para as espécies da Europa e subgênero *Newsteadia* (sem descrever a espécie-tipo) para as espécies da África. Em 1920, França & Parrot⁶ (apud GALATI, 2003) substituíram o nome *Newsteadia* por *Sergentomyia* (ainda sem descrição da espécie-tipo) e mencionaram um terceiro subgênero, *Neophlebotomus*. Em outra publicação, no mesmo ano, França⁷ (apud GALATI, 2003) propôs *Phlebotomus minutus* Rondani, 1843 como espécie-tipo de *Sergentomyia* e criou para a espécie americana *Ph. longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 o subgênero *Lutzia*. O subgênero *Neophlebotomus* não foi mencionado e a diferenciação dos três subgêneros foi baseada na genitália masculina. Em 1924, França⁸ (apud GALATI, 2003) substituiu o nome *Lutzia* por *Lutzomyia*.

Theodor (1948), baseando-se na armadura bucal, propôs, pela primeira vez, a divisão de Phlebotominae em quatro gêneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* para as espécies da Europa e da África e *Brumptomyia* e *Lutzomyia* para as espécies das Américas. Para a região Neotropical, Hertig (1948) descreveu o gênero *Warileya* e Fairchild (1949) descreveu o gênero *Hertigia*. No ano de 1955, Barretto concordou com a classificação proposta por Theodor (1948), devido à sua praticidade em meio ao elevado número de espécies conhecidas, porém, discordou no que se refere aos flebotomíneos da América. Para ele, os flebotomíneos do Novo Mundo não poderiam pertencer apenas aos gêneros *Brumptomyia* e *Lutzomyia*, sugerindo que havia

³ AGASSIZ, L. Nomenclatoris zoologici index universalis, 4th. **Soloduri, sumtibus Jent et Gassman**, v. 393, 1846.

⁴ COQUILLET, D. W. Discovery of blood sucking Psychodidae in America. **Entomological News**, v. 18, p. 101-102, 1907.

⁵ FRANÇA, C. Observations sur le genre *Phlebotomus*. II. Phlébotomes du Nouveau Monde (Phlébotomes du Brésil et du Paraguay). **Bull Soc Port Sci Nat**, v. 8, p. 215-236, 1919.

⁶ FRANÇA, C.; PARROT, L. Introduction à l'étude systématique des Diptères du genre *Phlebotomus*. **Bull Soc Path Exot** 13: 695-708. 1920.

⁷ FRANÇA, C. Observations sur le genre *Phlebotomus*. **Brotéria Ser Zool** 17: 102-60, 1919.

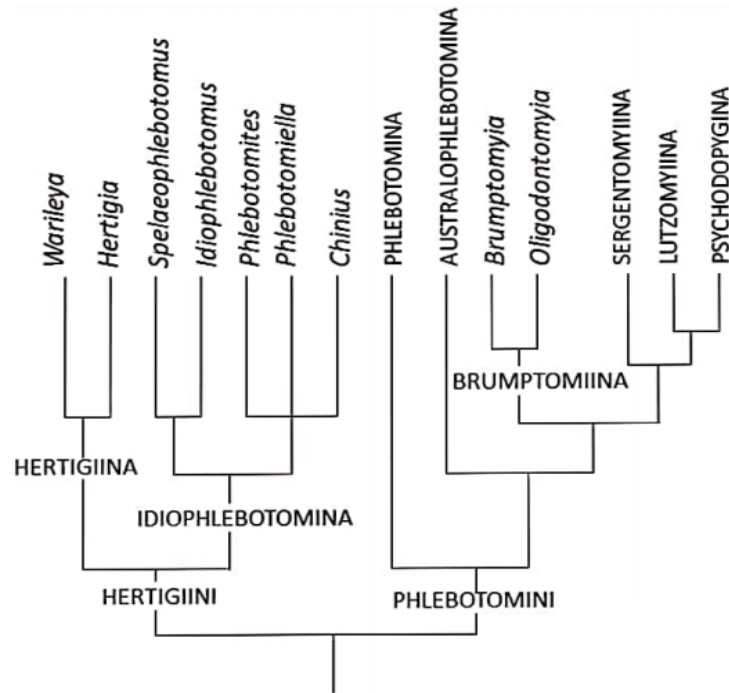
⁸ FRANÇA, C. Notes parasitologiques. IV. **Phlebotomes**. **J. Sciênc. Mat. Fôs. Nat**, v. 3, 1924.

pelo menos um grupo muito homogêneo de espécies dentro de *Sergentomyia*, sendo o gênero *Lutzomyia* representado por um número muito reduzido de espécies. Dessa forma, considerou para os flebotomíneos do Novo Mundo os gêneros *Brumptomyia*, *Warileya* e *Sergentomyia*, sendo *Lutzomyia* sinônimo desse último. Em 1962, Barretto aceitou os gêneros *Warileya*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia* para as espécies de flebotomíneos americanos e incluiu a maioria das espécies nesse último, em 15 subgêneros. Theodor (1965), ratificou a sua classificação de 1948 para os flebotomíneos do Velho Mundo e propôs uma nova classificação para os flebotomíneos das Américas, adotando os gêneros *Hertigia*, *Warileya*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia*. Em 1974, Young & Fairchild propuseram uma classificação muito similar à de Theodor (1965), com algumas modificações no gênero *Lutzomyia*. Lewis et al. (1977) e Martins, Williams e Falcão (1978) propuseram classificações similares à de Young e Fairchild (1974), com poucas modificações.

Na década de 1990, Young & Duncan (1994), revisando o gênero *Lutzomyia*, seguiram basicamente a classificação de Lewis et al. (1977), e, logo, a de Theodor (1965), porém, adotaram os subgêneros *Coromyia* Barretto, 1962, *Psathyromyia*, e *Sciopemyia* Barretto, 1962.

Artemiev (1991) e Galati (1995), propuseram vários táxons novos, todavia, em virtude de um desacordo de ambos os trabalhos com regras estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (*International Commission on Zoological Nomenclature - ICZN*), esses táxons permaneceram indisponíveis. Após publicação obedecendo às regras da ICZN, a autoria dos táxons que se enquadram nessas circunstâncias passou a ser de Galati (2003). Galati (1995), utilizando abordagem filogenética baseada nas apomorfias e sinapomorfias dos flebotomíneos das Américas, divide Phlebotominae em duas tribos, Hertigiini Abonnenc & Leger, 1976 e Phlebotomini Rondani & Berte, 1840. Hertigiini possui duas subtribos, Hertigiina Abonnenc & Leger, 1976 para as espécies do Novo Mundo e Idiophlebotomina Galati, 2003 para o Velho Mundo e Austrália. Phlebotomini foi dividida em Phlebotomina Rondani & Berte, 1840, Australophlebotomina Galati, 2003, Brumptomyiina Galati, 2003, Sergentomyiina Galati, 2003, Lutzomyiina Abonnenc & Leger, 1976 e Psychodopygina Galati, 2003 (figura 1). As espécies americanas encontram-se distribuídas nas quatro últimas, compreendendo 22 gêneros e 20 subgêneros. Galati et al. (2003) descreveram o gênero *Edentomyia* Galati, Andrade-Filho, Silva & Falcão, 2003, cuja espécie-tipo é incluída na tribo Phlebotomini, mas em nenhuma das subtribos consideradas na classificação de Galati (1995).

Figura 1 – Cladograma da subfamília Phlebotominae com tribos, subtribos e alguns gêneros



Fonte: Galati (2021).

Destacando a taxonomia do gênero *Psathyromyia*, Barretto (1962) aceitou para os flebotomíneos das Américas os gêneros *Warileya*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia*. Para esse último, adotou 15 subgêneros, sete anteriormente propostos: *Lutzomyia s.str.*, *Pintomyia* Costa Lima, 1932, *Evandromyia* Mangabeira, 1941, *Psychodopygus* Mangabeira, 1941, *Viannamyia* Mangabeira, 1941, *Pressatia* Mangabeira, 1942, *Dampfomyia* Addis, 1945, e oito novos: *Micropygomyia*, *Sciopemyia*, *Helcocyrtomyia*, *Trichophoromyia*, *Coromyia*, *Trichopygomyia*, *Nyssomyia* e *Psathyromyia*. A espécie-tipo do subgênero *Psathyromyia* é *Phlebotomus shannoni* Dyar, 1929 (= *Psathyromyia shannoni*) e esse subgênero foi subdividido em três grupos de espécies: Shannoni, Volcanensis e Aragoai.

Theodor (1965), Forattini (1971, 1973) e Lewis et al. (1977) recusaram o subgênero *Psathyromyia*. Artemiev (1991) elevou o subgênero *Psathyromyia* à categoria de gênero da subtribo Brumptomyiina, com três subgêneros: *Psathyromyia s. str.*, *Oophoromyia* e *Xiphomyia*. Young & Duncan (1994) seguiram basicamente a classificação de Lewis et al. (1977), mas, ao contrário desses, aceitaram o subgênero *Psathyromyia*. Galati (1995, 2003) adotou o gênero *Psathyromyia* incluso na subtribo Psychodopygina, com os subgêneros *Psathyromyia s. str.* (22 spp.), *Forattiniella* Vargas, 1978 (19 spp.) e *Xiphopsathyromyia* Ibáñez-Bernal & Marina, 2015 (nome proposto em substituição à *Xiphomyia*, pré-ocupado) (quatro spp.). Ainda na classificação de Galati (1995, 2003), o subgênero *Psathyromyia* possui

duas séries: Shannoni Fairchild, 1955, com 19 espécies e Lanei Theodor, 1965, com três espécies. Duas espécies do gênero *Psathyromyia* estão em *incertae sedis* (GALATI, 2021). Sábio (2017), após revisão taxonômica e análise filogenética morfológica do subgênero *Psathyromyia* (22 spp.), manteve a série Lanei (três spp.) de acordo com Galati (1995, 2003), no entanto, a série Shannoni passou a ser constituída somente das espécies do complexo (11 spp.), e as demais espécies foram inseridas em outras duas séries propostas: Volcanensis (quatro spp.) e Campbelli (duas spp.). Duas espécies estão isoladas entre as séries deste subgênero.

Exclusivamente sobre a série Shannoni do subgênero *Psathyromyia*, Sábio, Andrade e Galati (2014, 2016), fizeram uma revisão taxonômica revalidando diversos sinônimos juniores, propondo novos sinônimos e descrevendo duas espécies. As duas espécies descritas por esses autores são estudadas na presente pesquisa: *Psathyromyia (Psathyromyia) baratai* Sábio, Andrade & Galati, 2015 e *Psathyromyia (Psathyromyia) ribeirensis* Sábio, Andrade & Galati, 2014. Além dessas, outras duas espécies recentemente revalidadas pelos autores são também estudadas: *Psathyromyia (Psathyromyia) bigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1941) e *Psathyromyia (Psathyromyia) limai* (Fonseca, 1935). Mesmo após a revisão taxonômica e análise filogenética morfológica realizada por Sábio (2017), essas quatro espécies permanecem em politomia, sugerindo que são morfológicamente muito semelhantes.

1.3 MORFOLOGIA DOS ADULTOS

Os flebotomíneos apresentam corpo pequeno (de um a três milímetros de comprimento), com coloração que varia do amarelo ao castanho escuro, e intensamente revestido por cerdas (figura 2). Quando em repouso, esses insetos mantêm as asas lanceoladas entreabertas e levantadas, não as dobrando sobre o dorso. Assim como os demais dípteros, os flebotomíneos são holometábolos, ou seja, passam pelos estágios de ovo, larva e pupa antes de atingirem o estágio adulto. A duração de cada um desses estágios varia de acordo com a espécie e condições ambientais (BRAZIL; BRAZIL, 2003; YOUNG; DUNCAN, 1994). Na fase adulta, alada, apresentam voo saltado e vivem preferencialmente ao nível do solo, próximos à vegetação em raízes e/ou troncos de árvores, podendo ser encontrados em tocas de animais (FORATTINI et al., 1976).

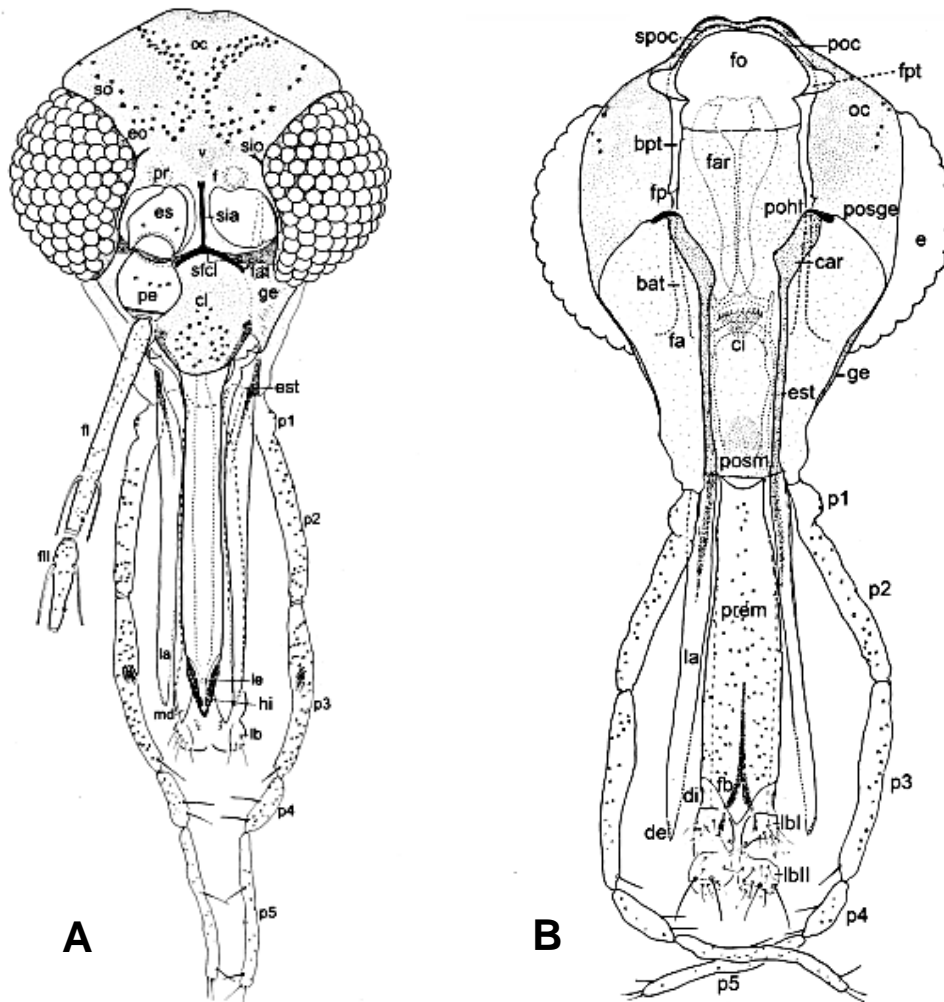
Figura 2 – Fêmea de *Phlebotomus papatasi* realizando hematofagia



Fonte: James Gathany (2006) (Public Health Image Library - ID: #10275).

A cabeça dos flebotomíneos é formada por diversas estruturas de interesse taxonômico e é uma parte do corpo de extrema importância para a identificação (GALATI, 2021). Externamente, a cápsula cefálica é formada pelos olhos compostos, as genas, a fronte, o vértice e o pós-crânio. Os apêndices da cabeça são as antenas, composta pelo escapo, pedicelo e pelo flagelo (fragmentado em 14 flagelômeros), e a probóscide, compreendida por três peças únicas, o labro-epifaringe, a hipofaringe e o lábio (com duas labelas na parte distal), e duas peças pares: as mandíbulas (ausentes ou atrofiadas nos machos), e as lacínias, uma parte das maxilas; cada maxila, além da lacínia, é constituída pelo palpo maxilar com cinco segmentos, estipe e cardo. O cibário e a faringe, componentes internos da cabeça, também são importantes para a identificação taxonômica dos flebotomíneos (GALATI, 2018) (figura 3). Recentemente, foi utilizada, pela primeira vez, a morfometria geométrica da cabeça de flebotomíneos para distinguir espécies e grupo de espécies (GODOY et al., 2018).

Figura 3 – Ilustração da cabeça de Phlebotominae em vista dorsal (A) e ventral (B)



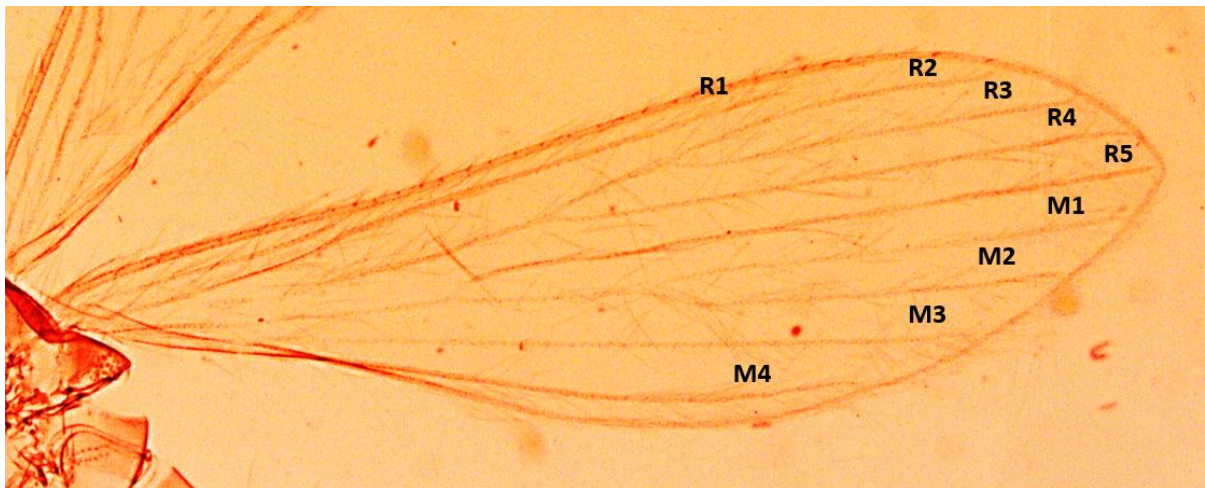
Fonte: Galati (2019). Legenda: A: fI: 1º flagelômero, fII: 2º flagelômero. cl: clípeo. eo: esclerito ocular. es: escapo. est: estipe da maxila. f: fronte. fat: fosseta anterior do tentório. ge: gena. hi: hipofaringe. la: lacínia da maxila. lb: lábio. le: labro-epifaringe. md: mandíbula. oc: occipício. p1: 1º segmento palpal. p2: 2º segmento palpal. p3: 3º segmento palpal. p4: 4º segmento palpal. p5: 5º segmento palpal. pe: pedicelo. pr: protuberância da frente. sfcl: sutura frontoclípeal. sai: sutura interantenal. sio: sutura interocular. so: sutura ocular. v: vértice. B: bat: braço anterior do tentório. bpt: braço posterior do tentório. car: cardo da maxila. ci: cibário. cl: clípeo. de: dentes externos da lacínia da maxila. di: dentes internos da lacínia da maxila. est: estipe da maxila. fat: fosseta anterior do tentório. far: faringe. fb: forquilha labial (furca labial). fo: forâmen occipital. fpt: fosseta posterior do tentório. la: lacínia da maxila. lbI: 1ª labela. lbII: 2ª labela. o: olho. oc: occipício. poc: pós-occipício. pohi: ponte hipostomal. posm: pós-mento. prem: pré-mento. p1: 1º segmento palpal. p2: 2º segmento palpal. p3: 3º segmento palpal. p4: 4º segmento palpal. p5: 5º segmento palpal. spoc: sutura pós-ocular. posge: pós-gena

O tórax é dividido em três segmentos denominados com os prefixos pro, meso e meta, cada um deles formado por escleritos em sua região dorsal, lateral e ventral, que recebem o nome de noto, pleura e esterno, nessa ordem. Assim, o primeiro segmento, o protórax, é dividido em pronoto (anterior e posterior), propleura (proepimero e proepisterno) e prosterno, dividido em basisterno e furcasterno. O mesotórax, segundo segmento do tórax, é dividido em mesonoto (pré-escudo, escudo, escutelo e pós-noto), mesopleura (dividida em mesepisterno [subdividido

em anepisterno e catepisterno] e mesepimero [subdividido em anepimero e catepimero]) e o mesosterno (basisterno e mesofurca). O terceiro segmento do tórax, metatórax, é dividido em metanoto, metapleura (subdividida em metepisterno e metepimero) e metesterno, que compreende as metafurcas (GALATI, 2018).

Os apêndices do tórax são três pares de pernas, as asas e os halteres (ou balancins). As pernas dos flebotomíneos são longas e compreendem coxa, trocânter, fêmur, tíbia e tarso, esse último com cinco artículos, os tarsômeros. As asas são oblíquas, com ápice afilado ou pouco arredondado e intensamente cerdosas. A venação é composta por dez nervuras paralelas que atingem a sua borda. As ramificações ocorrem a partir da base, com r-m, a veia transversa mais distal, situada entre o terço basal e o meio da asa. O sistema de denominação das veias alares reconhece sete veias primárias: costa (C), subcosta (sC), rádio (R), média (M), cubital (Cu) e anal (A). As duas primeiras veias são simples. R, em seu ramo interior, é denominada R₁, e em seu ramo posterior, denominado setor radial (RS), dá origem às veias R₂, R₃, R₄ e R₅. O ramo anterior de M desapareceu e o ramo posterior dá origem à M₁, M₂, M₃ e M₄ (figura 4) Do ramo da veia cubital (Cu) que se bifurca anteriormente originam-se CuA₁, e o posterior, CuA₂; do ramo posterior se origina CuP (para A, o ramo anterior A₁ e o posterior, A₂) (GALATI, 2018)

Figura 4 – Asa de *Pa. ribeirensis* evidenciando as veias alares



Fonte: o autor (2021).

As medidas de veias alares mais empregadas nos estudos sistemáticos de Phlebotominae são: comprimento da asa, largura da asa, obtida em seu ponto mais largo (traçando-se uma perpendicular em relação à R₅), o comprimento de R₅, o comprimento R₂ (*alpha* [α]), o comprimento de R₂₊₃ (*beta* [β]), o comprimento de R₂₊₃₊₄ (*gamma* [γ]), o comprimento da distância entre o ponto de bifurcação de R₂R₃ e a extremidade de R₁ (*delta* [δ]), e o comprimento

da distância entre o ponto de bifurcação de R_{2+3} R_4 e a M_1M_2 ($PI[\pi]$) (GALATI, 2018). França (1919), propõe o uso de algumas razões alares: *alfa/beta* (α/β), *alfa/gama* (α/γ), *beta/gama* (β/γ) e *delta/alfa* (δ/α) (apud GALATI, 2018). Além de análises morfométricas lineares, a morfometria geométrica alar tem se mostrado uma ferramenta útil para estudos de taxonomia e sistemática de flebotomíneos (DE LA RIVA et al., 2001; GODOY et al., 2014; PRUDHOMME et al., 2012).

Os halteres representam as asas posteriores e são em forma de raquete (FORATTINI, 1973).

Além da análise morfológica e morfométrica de estruturas internas e externas de flebotomíneos, alguns autores utilizam também a coloração do tórax (ANDERSEN, 2010; CAILLARD et al., 1986; CARVALHO et al., 2006) para diferenciar espécies, como é o caso de algumas espécies do gênero *Psathyromyia* (MORALES, RODRIGUES; IBAGOS, 1982; SÁBIO; ANDRADE; GALATI, 2014).

O abdômen de flebotomíneos compreende 11 segmentos. Cada um desses segmentos é formado basicamente pelo tergito, dorsalmente, pleura, lateralmente, e pelo esternito, ventralmente. O último segmento é formado pelos cercos e o ânus, e recebe o nome de proctígero. A abertura genital localiza-se ântero-ventralmente ao ânus em ambos os sexos. Na fêmea, surge entre o 8º e 9º esternitos e, no macho, o edeago (“pênis”), aparece após o 9º esternito. A genitália, importante seção na análise taxonômica, é constituída pelos quatro últimos segmentos nas fêmeas e três últimos nos machos (GALATI, 2018).

A genitália feminina compreende a furca genital dotada de câmara genital, um par de espermatecas e as glândulas acessórias, essas últimas são destruídas no processo de clarificação. As espermatecas são formadas por uma cápsula saculiforme, tubular, anelada ou lisa, o chamado “corpo das espermatecas”. O corpo é conectado por meio dos dutos individuais e comum à câmara genital (“vagina”), onde se abre o orifício das espermatecas e das glândulas acessórias (GALATI, 2018).

Na genitália dos machos, o 9º tergito (epândrio) é transformado em um par de lobos epandriais na maioria das espécies. Um par de gonopódios situados póstero-lateralmente ao 9º esternito compreendem os gonocoxitos e em situação apical a estes, os gonóstilos, dotados de espinhos em número e desenvolvimento variáveis. Um par de parâmeros situam-se entre a base pósterolateral da bainha parameral e a base dorsomedial dos gonocoxitos. Em vista lateral, os parâmeros situam-se entre os gonogoxitos e o conjunto formado peço 9º e 10º tergitos, com a bainha parameral entre eles. O edeago, órgão tubular bifurcado (formando os dutos edeagais), está localizado imediatamente após o 9º esternito e seu comprimento e calibre são

correspondentes ao comprimento e largura dos dutos da espermateca. Associado aos dutos eideagais, encontram-se a bomba espermática, formada pelo apódema ejaculador e a câmara espermática (GALATI, 2018).

A taxonomia e sistemática de flebotomíneos é, até hoje, amplamente baseada na análise de caracteres morfológicos e morfométricos da fase adulta. Recentemente, é recomendada a abordagem integrativa na delimitação dos táxons, a qual utiliza duas ou mais fontes de evidência (ex.: biologia molecular, filogeografia, citogenética, morfologia, morfometria geométrica, genética de populações, ecologia, comportamento, desenvolvimento, química, compatibilidade reprodutiva, etc.) para agrupar espécies (DAYRAT, 2005; PADIAL et al., 2010).

1.4 MORFOMETRIA LINEAR E MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

A morfometria linear é baseada num conjunto de análises estatísticas utilizadas no emprego de medidas de distâncias lineares, como comprimento, largura, ângulos ou razões calculadas a partir de estruturas ou partes de organismos (ROHLF; MARCUS, 1993). A morfometria geométrica, por sua vez, pode ser definida como “um conjunto de métodos de obtenção, processamento e análise de variáveis que preservam toda a informação geométrica contida nos dados originais” (SLICE, 2005) e, apesar de apresentar-se como uma nova abordagem do estudo da variação morfológica, tem se mostrado uma ferramenta bastante importante e útil em análises taxonômicas e sistemáticas (DUJARDIN, 2008; GODOY et al., 2018, JIRAKANJANAKIT; DUJARDIN, 2005). Essa técnica baseia-se no emprego de coordenadas cartesianas de marcos anatômicos (*landmarks*) e métodos de superposição, a fim de obter configuração consenso desses pontos homólogos (ROHLF, 1990).

Na morfometria geométrica, o centro de massa da forma ou centro de gravidade é denominado centroide. Dessa forma, trabalha-se com duas variáveis principais: o tamanho do centroide, caracterizado como a raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado entre cada marco anatômico e o centroide (BOOKSTEIN, 1991), e a forma (as propriedades de uma configuração de pontos que não são alterados devido a efeitos da posição, tamanho ou orientação). Sendo assim, este método permite a diferenciação entre tamanho e forma, apresentando graficamente se houve formação de grupos homogêneos, as regiões que concentram o maior número de variações e possibilitando a reconstrução da forma por meio de análises multivariadas (FORNEL; CORDEIRO-ESTRELA, 2012; MONTEIRO; REIS, 1999; ROHLF; MARCUS, 1993).

Dentre outras, as vantagens da utilização dessa técnica são a velocidade da análise do material, uma vez que é possível digitalizar várias amostras em um curto período, o baixo custo do processo e o fato de que os dados podem ser obtidos também de material já montado em lâminas (LYRA et al., 2010). Por isso, a morfometria geométrica é uma ferramenta taxonômica que permite diferenciar espécies, até mesmo crípticas (DUJARDIN, 2008; DUJARDIN et al., 1999), com menor custo, menor tempo e com um alto grau de confiança (CALLE et al., 2008).

1.5 SISTEMÁTICA MOLECULAR APLICADA A PHLEBOTOMINAE

A sistemática por muito tempo foi amplamente baseada na análise de caracteres resultantes da manifestação dos genes e de pressão ambiental (fenótipo). Entretanto, espécies diferentes podem apresentar fenótipos iguais ou com tênues diferenças, muitas vezes indistinguíveis à luz de análises morfológicas e/ou morfométricas, as chamadas “espécies crípticas” (MEYER, 1997; STRUCK et al., 2018). A utilização de moléculas nos estudos de sistemática permite a distinção de grupos de espécies e até mesmo de espécies crípticas, mesmo que evidenciando tênues diferenças (GUTIÉRREZ et al., 2014; PADIAL et al., 2010).

O uso de marcadores moleculares na reconstrução da filogenia de Phlebotominae teve início nos anos 1990 (ADAMSON et al., 1991; BOOTH et al., 1991; DEPAQUIT et al., 1998; DIAS et al., 1998; MAINGON et al., 1993; ZELEDON et al., 1993). Os estudos moleculares na sistemática de flebotomíneos utilizam principalmente três famílias de moléculas: proteínas (isoenzimas) (ARRIVILLAGA et al., 2000; DUJARDIN et al., 1997; MIN; JIA, 2002; PERROTEY et al., 2000), hidrocarbonetos cuticulares e moléculas químicas envolvidas na comunicação intraespecífica (ex.: feromônios) (KAMHAWI et al., 1987; MAHAMAT; HASSANALI, 1998; PHILLIPS et al., 1990) e sequências de DNA mitocondrial, ribossomal e nuclear (OHNSTAEDT et al., 2011; PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015). O estudo de sequências de DNA de flebotomíneos é útil na descrição de novos táxons, associação de machos e fêmeas de uma mesma espécie, detecção de diversidade críptica em grupos com pouca disparidade morfológica, e sistemática evolutiva em diferentes níveis hierárquicos (DEPAQUIT, 2014).

Um dos métodos de análise dessas sequências, o DNA *barcoding* (“código de barras do DNA”), foi proposto por Hebert et al. (2003). Essa técnica consiste em um sistema rápido, preciso e universal para identificar os organismos em nível específico, utilizando-se sequências padronizadas de regiões específicas do DNA. O DNA *barcoding* deve atender a alguns critérios: ser curto, para facilitar a amplificação e o sequenciamento, mas suficientemente variável para

separar espécies-irmãs. Além disso, deve apresentar regiões conservadas para, a partir delas, desenvolver primers universais (FORD et al., 2009). Esses critérios são satisfeitos por genes do DNA ribossomal, mitocondrial e nuclear, embora haja vantagens e desvantagens entre eles. O gene *citocromo c oxidase subunidade I (COI)* tem sido amplamente utilizado devido às suas diversas vantagens: é um gene mitocondrial, ou seja, apresenta taxa de mutação mais elevada (se comparada ao genoma nuclear), é haplóide e sua origem é uniparental (materna), com ausência de recombinação gênica (CALCAGNOTTO, 2001). Além disso, a abundância de DNA mitocondrial em diversos tecidos (até mesmo naqueles degradados) é outra vantagem da utilização desse gene. Também, ele é rodeado por sequências conservadas, o que permite isolá-lo e estudá-lo mais facilmente (KOSMANN, 2009). Uma desvantagem do gene é que, embora estabelecido em vários filos de animais, nas plantas, principalmente angiospermas, por apresentarem baixas taxas de substituição de bases no DNA mitocondrial, a utilização desse gene não é efetiva, levando pesquisadores a buscarem regiões *barcoding* alternativas, como as regiões de plastídios (FAZEKAS et al., 2008; KRESS et al., 2005). Além do gene *COI*, diversos outros genes são utilizados como *barcoding*, como *citocromo b (CYTB)*, o primeiro e segundo espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2, respectivamente) e *NADH* desidrogenase (DEPAQUIT, 2014).

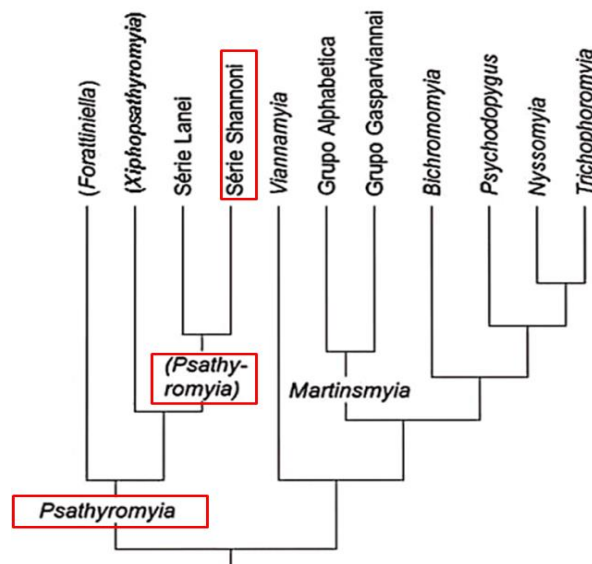
Especialmente sobre a sistemática molecular na taxonomia de flebotomíneos, Depaquit (2014) realizaram uma revisão e concluíram que estudos que utilizam DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido os mais frequentes. Nessas pesquisas, marcadores do gene *citocromo b* completo ou incompleto, com ou sem região franqueadora *NADHI* e tRNA-ser, são os mais comuns. Entretanto, o gene *COI* tem sido utilizado em estudos recentes, enquanto *NADHI*, *NADH4* e 12S são pouco utilizados. Para os estudos que utilizam DNA ribossomal (rDNA), os marcadores mais utilizados são a subunidade menor, utilizada parcial ou totalmente, e diversos da subunidade maior. O uso de marcadores nucleares também é frequente.

Recentemente, a técnica de identificação por ionização e dessorção a laser assistida por matriz de espectrometria de massa de tempo de voo (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF) foi realizada por Chavy et al., (2019) com flebotomíneos do norte da Amazônia. Essa técnica também se mostrou uma ferramenta útil para a identificação rápida, econômica e precisa de flebotomíneos, embora o custo para a implantação seja alto.

1.6 ESPÉCIES DA SÉRIE SHANNONI DO ESTADO DE SÃO PAULO

À guisa de situar a posição das quatro espécies objetos deste estudo, seguindo a classificação de Galati (2003), as espécies pertencem à série Shannoni do subgênero *Psathyromyia*, gênero *Psathyromyia*, subtribo Psychodopygina, tribo Phlebotomini, subfamília Phlebotominae e família Psychodidae (figura 5).

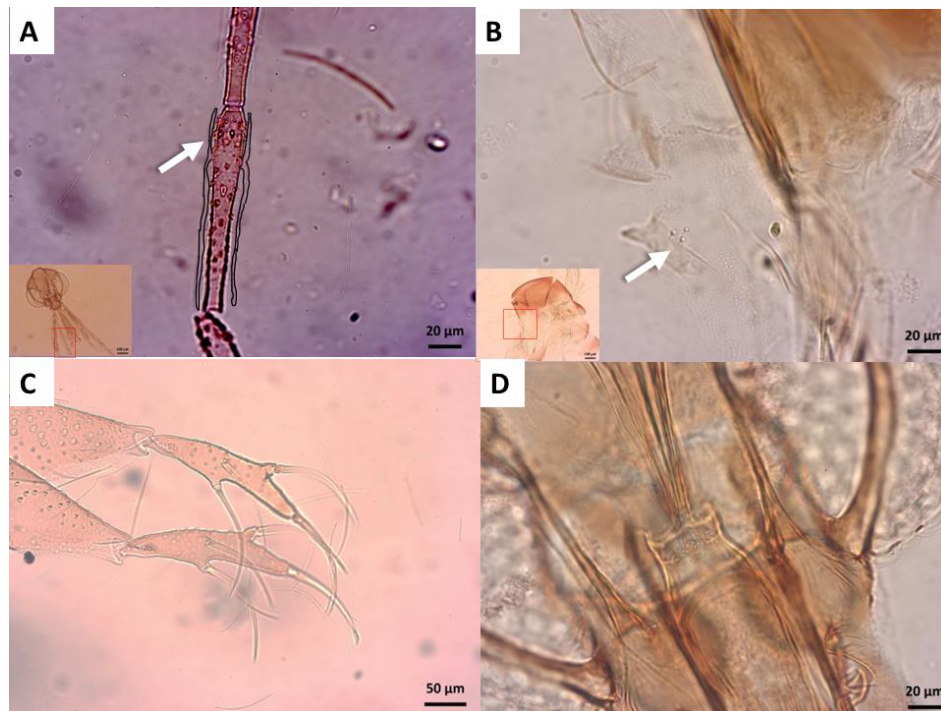
Figura 5 – Cladograma da subfamília Phlebotominae com gêneros, subgêneros, grupos de espécies e séries de espécies da subtribo Psychodopygina



Fonte: Galati (2021). Em vermelho, a posição das quatro espécies estudadas nesta pesquisa.

Para a diagnose da série Shannoni do subgênero *Psathyromyia*, tem-se, para ambos os sexos: ascoides com prolongamento posterior longo (figura 6A), flagelômeros FI-FXI com um par de cerdas simples e presença de um trio de sensilas nos escleritos cervicais (figura 6B). Para os machos: gonóstilos com o espinho interno implantado em seu meio, o espinho externo superior implantado equidistante do apical e o externo inferior (figura 6C); parâmeros simples; lobos epandriais mais curtos que os gonocoxitos. Fêmea: cibário com dois pares de dentes posteriores desenvolvidos e área esclerosada em situação anterior aos dentes posteriores (figura 6D); espermatecas com o corpo liso em forma de banana, duto comum mais longo que os individuais, ambos lisos e não esclerosados; duto comum ultrapassa a altura do meio da haste da furca genital (SÁBIO; ANDRADE; GALATI, 2014).

Figura 6 – Estruturas da série Shannoni do subgênero *Psathyromyia*. A: ascoides com prolongamento posterior longo (contornado para evidenciar) (ponta das setas) em *Pa. baratai*. B: um trio de sensilas nos escleritos cervicais (ponta da seta) em *Pa. limai*. C: gonóstilo de *Pa. limai*. D: cibário de *Pa. limai*.



Fonte: o autor (2021).

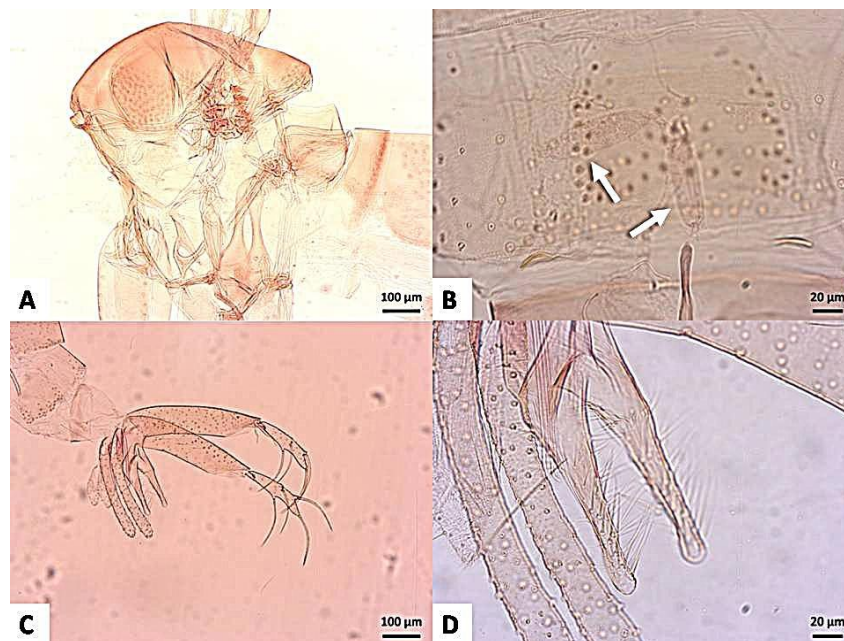
1.6.1 *Psathyromyia (Psathyromyia) bigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1941) *sin. Psathyromyia microcephala* (Barretto & Duret, 1953)

A distribuição de *Pa. bigeniculata* ainda é incerta devido à sinonimização indevida dessa espécie por Barretto (1946), ainda com o nome de *Phlebotomus bigeniculatus* Floch & Abonnenc, 1941, em *Ph. shannoni*. Essa sinonímia foi mantida por mais de 70 anos, fato este que pode ter gerado dados errôneos sobre a sua distribuição (GALATI, 2021). Recentemente, *Pa. bigeniculata* foi retirada da sinonímia e revalidada por Sábio, Andrade & Galati (2014), tendo *Pa. microcephala* como sinônimo-júnior. Essa espécie é encontrada na Guiana Francesa (localidade-tipo), Argentina, Brasil e possivelmente no Paraguai (GALATI, 2021). No Brasil, há registros de *Pa. bigeniculata* nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Acre, Bahia, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. Essa espécie também ocorre possivelmente nos estados de Roraima, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Goiás, Paraná, Santa Catarina e no Distrito Federal.

Para a diagnose dessa espécie, tem-se para ambos os sexos: coloração torácica: pronoto, paratergito, pré-escudo, escudo e escutelo castanhos, anepisterno e pós-noto castanhos claros e

todo o restante da pleura é pálido. Para os machos, o gonóstilo possui o espinho externo superior implantado equidistante entre o espinho apical e o espinho externo inferior. O espinho externo inferior é um pouco mais apical do que o espinho interno. As cerdas da margem dorsal do parâmero vão do seu ápice até o limite apical das cerdas da margem ventral. Para as fêmeas, possuem dutos comuns das espermatecas lisos, estendendo-se para além do ápice da furca genital. Seu comprimento é cerca de 2,1 vezes maior que as espermatecas e 2,5 vezes maior que o duto individual das espermatecas (SÁBIO; ANDRADE; GALATI, 2014) (figura 7).

Figura 7 – Estruturas para diagnose de *Pa. bigeniculata*. A: tórax. B: espermatecas (ponta das setas). C: terminália do macho. D: detalhe do parâmero



Fonte: o autor (2021).

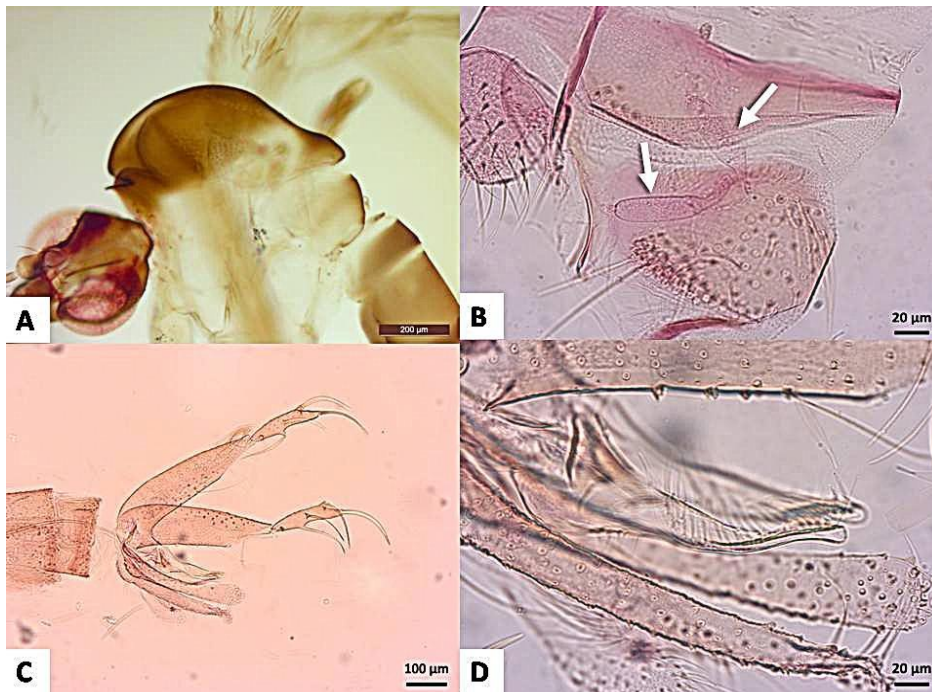
1.6.2 *Psathyromyia (Psathyromyia) limai* (Fonseca, 1935) *sin. Psathyromyia pestanai* (Barretto & Coutinho, 1941)

Há registro dessa espécie no Brasil e somente nos estados da região Sudeste: Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (localidade-tipo) (GALATI, 2021; VIRGENS et al., 2015).

Assim como *Pa. bigeniculata*, essa espécie foi considerada por Barretto (1946), ainda com o nome *Phlebotomus limai* Fonseca, 1935, como sinônimo-júnior de *Ph. shannoni*. Sábio, Andrade & Galati (2014) retiraram-na da sinonímia e revalidaram-na, com a seguinte diagnose: para ambos os sexos: pronoto, paratergito, pré-escudo, escudo e escutelo castanhos, o restante do tórax é pálido, inclusive a área de inserção das asas e dos balancins. Para os machos, o

parâmero apresenta uma concavidade no terço apical. O gonóstilo possui o espinho externo superior inserido em posição mediana entre o externo inferior e o apical e o externo inferior implantado no mesmo nível que o interno. As fêmeas possuem o duto comum da espermateca cerca de 1,7 vezes maior que os dutos individuais e 2,4 vezes maiores que as espermatecas. Os dutos individuais são cerca de 1,4 vezes maiores que a espermateca (figura 8).

Figura 8 – Estruturas para diagnose de *Pa. limai*. A: tórax (holótipo). B: espermatecas (ponta das setas). C: terminália do macho. D: detalhe do parâmero



Fonte: o autor (2021).

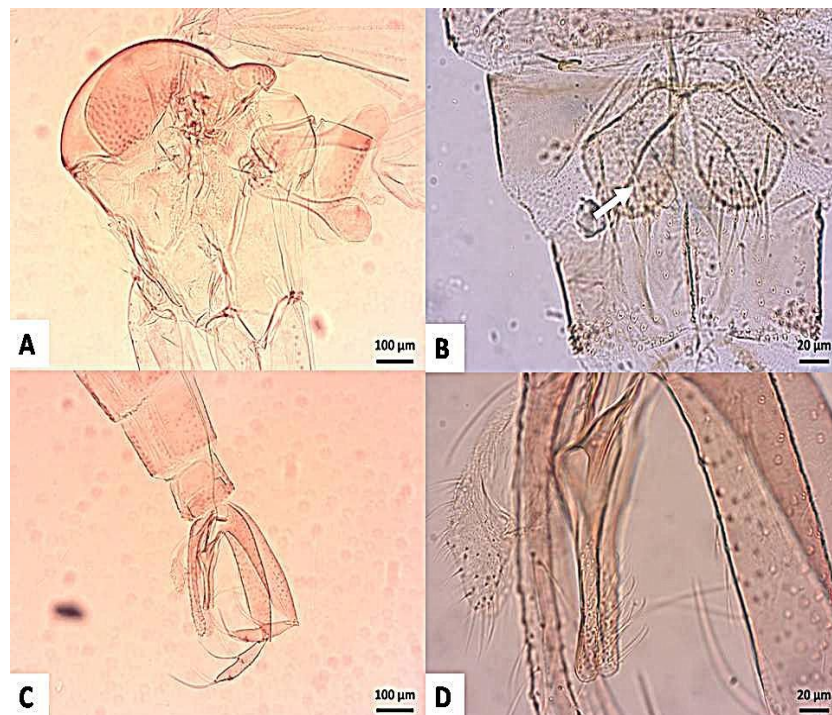
Em estudo de revisão do complexo Shannoni, Sábio, Andrade & Galati (2014) propuseram *Psathyromyia pestanai* (Barretto & Coutinho, 1941), como sinônimo-júnior de *Pa. limai*, devido à indistinção morfológica e morfométrica das fêmeas dessas duas espécies e sua simpatria. Esses autores também advertem que flebotomíneos que vêm sendo identificados como *Pa. shannoni* em algumas áreas brasileiras podem corresponder à *Pa. limai*, uma vez que essas duas espécies apresentam fêmeas indistinguíveis pela análise morfométrica e, machos que permitem a distinção dessas espécies com segurança, são dificilmente coletados.

1.6.3 *Psathyromyia (Psathyromyia) baratai* Sábio, Andrade & Galati, 2015

Psathyromyia baratai é encontrada na Argentina e no Brasil, nos estados de São Paulo (localidade-tipo), Minas Gerais e Paraná (GALATI, 2021). Recentemente, descobriu-se que essa espécie ocorre também no estado do Espírito Santo (informação pessoal de I. S. Pinto).

Como diagnose dessa espécie, tem-se, para ambos os sexos: mesonoto castanho, pronoto, metanoto e pós-noto pálidos, pleura esbranquiçada. Para os machos: gonóstilo com quatro espinhos, o externo superior implantado equidistante entre o apical e o externo inferior e esse último implantado no mesmo nível ou ligeiramente mais apical que o interno. Parâmero digitiforme com a margem dorsal recoberta por cerdas em uma área que se estende desde o ápice a um pouco antes do nível das cerdas do ângulo ventral. Fêmeas: espermateca em forma de banana, com ducto comum liso e que se estende além do ápice da furca genital (SÁBIO; ANDRADE; GALATI, 2014) (figura 9).

Figura 9 – Estruturas para diagnose de *Pa. baratai*. A: tórax (alótipo). B: espermatecas (ponta da seta). C: terminália do macho (holótipo). D: detalhe do parâmero (holótipo)



Fonte: o autor (2021).

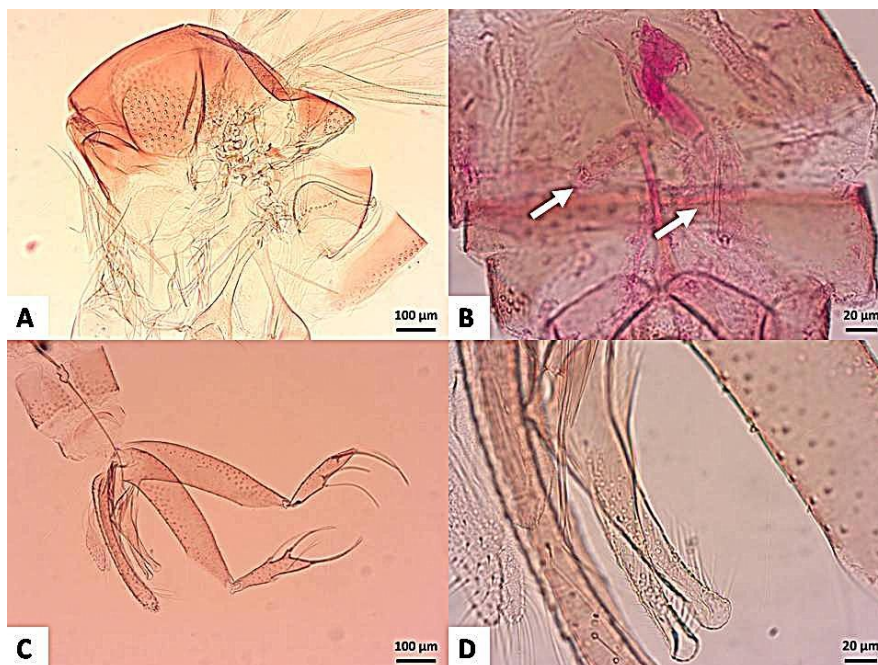
1.6.4 *Psathyromyia (Psathyromyia) ribeirensis* Sábio, Andrade & Galati, 2014

Psathyromyia ribeirensis, até o ano desse estudo, tem sido encontrada no Brasil e somente no estado de São Paulo (localidade-tipo) (GALATI, 2021). Diferenças morfológicas e

morfométricas entre terminálias dos machos de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* levaram à descrição dessa última espécie. As fêmeas, por sua vez, são morfologicamente indistinguíveis, inclusive pela distribuição da coloração torácica (SÁBIO; ANDRADE; GALATI, 2014).

Para diagnose dessa espécie, segundo Sábio, Andrade & Galati, 2014, tem-se para ambos os sexos: pronoto, paratergito, escudo e escutelo castanhos, pleura esbranquiçada. Para os machos: gosnóstilo com o espinho externo superior implantado equidistante entre o apical e o espinho externo inferior, e o espinho externo inferior implantado ao mesmo nível do espinho interno. Parâmeros digitiformes com cerdas da margem dorsal cobrindo uma área que se estende do ápice do parâmero até o nível das cerdas apicais da margem ventral. Para as fêmeas: espermatecas em forma de banana (figura 10).

Figura 10 – Estruturas para diagnose de *Pa. ribeirensis*. A: tórax (parátipo). B: espermatecas (ponta das setas) (parátipo). C: terminália do macho (holótipo). D: detalhe do parâmero (holótipo)



Fonte: o autor (2021).

2 JUSTIFICATIVA

Sobre o subgênero *Psathyromyia*, alguns equívocos ocorreram com associação de sexos e sinonimização de espécies, com repercussão sobre o conhecimento da distribuição geográfica e mesmo sobre dados do comportamento das espécies. A série Shannoni do subgênero *Psathyromyia* necessita de investigação pois, por suas fêmeas serem morfológicamente muito semelhantes, houve sinonimização indevida de duas espécies (*Pa. limai* e *Pa. bigeniculata*) em *Ph. shannoni*, que perdurou por cerca de 60 anos. Após revisão taxonômica, essas duas espécies foram revalidadas e outras duas, *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis*, foram descritas (SÁBIO, ANDRADE; GALATI, 2014, 2016). Mesmo assim, as fêmeas de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* permanecem indistinguíveis.

As fêmeas das quatro espécies do subgênero *Psathyromyia* que ocorrem no estado de São Paulo distinguem-se somente pela distribuição da coloração torácica (exceto *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*). Dados referentes à morfometria linear de caracteres da cabeça e morfometria geométrica das asas poderão ser úteis para diferenciar tais espécies mais seguramente.

Quanto ao uso da taxonomia molecular aplicada a flebotomíneos, no ano de 2014, 20% das espécies de flebotomíneos atuais tinham ao menos uma sequência depositada e, para as Américas, menos de um terço do total de espécies tem pelo menos uma sequência depositada no banco de genes (“*GenBank*”) (DEPAQUIT, 2014). Ainda assim, é ínfima a parcela de estudos que utilizam essas ferramentas para a identificação da diversidade das espécies (GUTIÉRREZ et al., 2014; LOZANO-SARDANETA et al., 2020; PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018; VIVERO et al., 2017). Logo, é interessante obter dados de sequências de DNA para auxiliar na identificação.

Portanto, a série Shannoni do estado de São Paulo necessita de investigação dada a dificuldade de separar as fêmeas dessas espécies e sua simpatria ou distribuição próxima. Utilizar a taxonomia integrativa (por meio da análise da morfometria linear e geométrica e biologia molecular) é uma abordagem inédita para esses táxons e poderão fornecer informações importantes para a separação das fêmeas das quatro espécies.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se, por meio da morfometria linear, geométrica e biologia molecular, é possível diferenciar as quatro espécies da série Shannoni do subgênero *Psathyromyia* que ocorrem em São Paulo: *Psathyromyia bigeniculata*, *Pa. limai*, *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis*, cujas fêmeas são morfologicamente indistinguíveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar diferenças entre as quatro espécies de *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) supracitadas por meio da morfometria linear de estruturas da cabeça das fêmeas;
- Investigar se é possível separar as fêmeas de *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) que ocorrem no estado de São Paulo por morfometria geométrica das asas;
- Avaliar sequências do DNA *barcoding* (fragmento do gene *COI*) na identificação de espécies da série Shannoni de *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) do estado de São Paulo.

4 METODOLOGIA

4.1 LICENÇAS PARA A PESQUISA

A autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (anexo A), Instituto Florestal (anexo B) e Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (anexo C) para a coleta e análise molecular de flebotomíneos, bem como aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) (anexo D) para o uso de animais em laboratório foram obtidas.

4.2 NOMENCLATURA TAXONÔMICA E TERMINOLOGIA

A nomenclatura taxonômica e terminologia morfológica para Phlebotominae adotada neste estudo segue Galati (2003, 2018) e a abreviação genérica proposta por Marcondes (2007).

4.3 OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES

4.3.1 Obtenção de espécimes em coleções entomológicas

Espécimes depositados no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da USP (LESP-Phlebotominae-FSP), Coleção de Referência da Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP-USP), Coleção do Museu de Zoologia da USP (MZUSP) e Coleção de Flebotomíneos do Instituto René Rachou/Fiocruz-MG (COLFLEB-Fiocruz) foram examinados para a realização de análises morfométricas. A tabela 1 apresenta o número de espécimes fêmeas provenientes das coleções entomológicas consultadas, com o número e o tipo de análise realizada. Utilizou-se espécimes de *Pa. bigeniculata* do Mato Grosso do Sul (MS) devido à baixa quantidade daqueles procedentes de São Paulo (SP), mesmo nas coleções entomológicas (tabela 1).

Tabela 1 – Coleções entomológicas consultadas, com o número de espécimes da série Shannoni de *Psathyromyia* observados e o tipo de análise realizada

Espécies	Coleções zoológicas								Total		
	LESP-Phlebotominae-FSP		FSP USP		COLFLEB - FIOCRUZ - MG		MZUSP		ML	MG	
	ML	MG	ML	MG	ML	MG	ML	MG	ML	MG	
<i>Psathyromyia limai</i>	30	27	-	-	-	-	-	-	30	27	
<i>Psathyromyia baratai</i>	10	4	1	-	-	-	5	3	16	7	
<i>Psathyromyia ribeirensis</i>	3	3	3	2	-	-	-	-	6	5	
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	SP	3	3	1	1	-	-	2	1	6	5
	MS	27	14	-	1	-	10	-	-	27	25
Total	73	51	5	4	0	10	7	4	85	69	

Fonte: o autor (2021). Legenda: ML: morfometria linear. MG: morfometria geométrica.

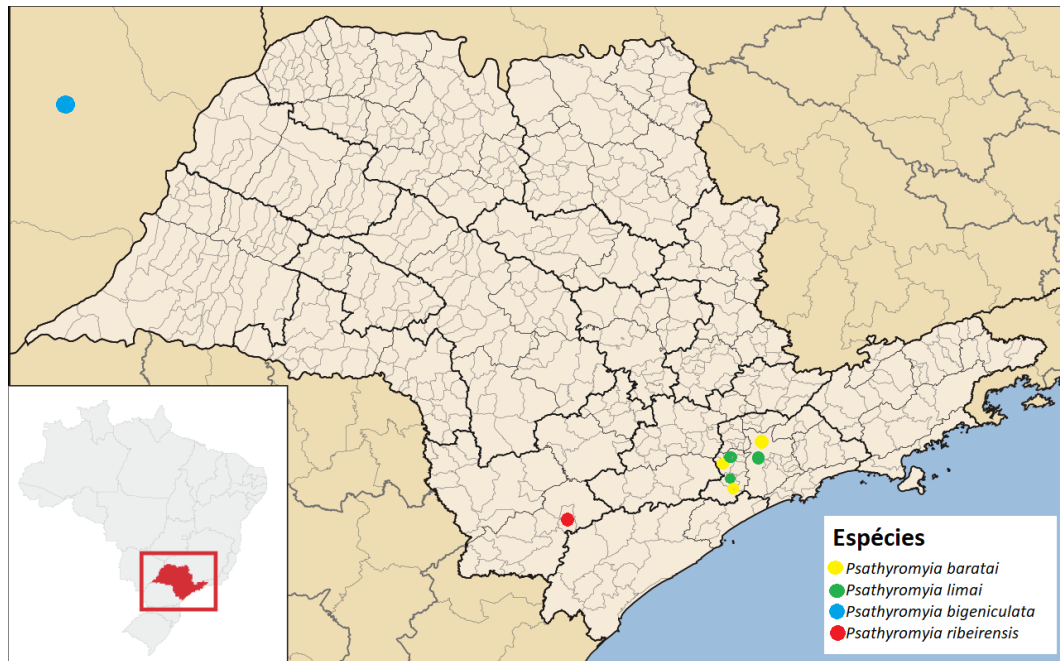
As procedências dos espécimes de cada coleção, são:

- *Psathyromyia limai*: LESP-Phlebotominae-FSP: Iporanga, Parque Estadual da Cantareira, Pedro de Toledo, Horto Florestal, Itapitangui, Cananéia, São Sebastião, Sete Barras, Parque Estadual Intervales.
- *Psathyromyia baratai*: LESP-Phlebotominae-FSP: Jundiá, Parque Estadual do Jaraguá, Santana de Parnaíba, São João da Boa Vista, São Lourenço da Serra, Embu das Artes, Cotia, Parque Estadual da Cantareira. FSP-USP: Parque Estadual da Cantareira. MZUSP: Parque Estadual da Cantareira.
- *Psathyromyia ribeirensis*: LESP-Phlebotominae-FSP: Parque Estadual Intervales. FSP-USP: Parque Estadual Intervales.
- *Psathyromyia bigeniculata*: LESP-Phlebotominae-FSP: SP - Teodoro Sampaio, Pitangueiras, Angatuba, “Rio do Peixe”; MS - Corumbá, Bálsamo do Rio Perdido, Bonito, Alcinópolis, Águas do Miranda, Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Boa Sorte. FSP-USP: SP - Andradina; MS - Bálsamo do Rio Perdido. COLFLEB-Fiocruz: MS - Mato Grosso do Sul. MZUSP: SP - Martinópolis, Presidente Prudente.

4.3.2 Obtenção de espécimes em campo, tratamento em laboratório e conservação

As tentativas de coleta de espécimes foram realizadas no estado de São Paulo nas seguintes localidades: Parque Estadual da Cantareira (23°26'49" S; 46°38'02" W), Parque Estadual do Jaraguá (23°27'37" S; 46°45'26" W), Cotia (23°41'11" S; 46°54'26" W), São Lourenço da Serra (23°53'08" S; 46°54'58" W), Parque Estadual Intervales (24°16'06" S; 48°24'51" W), e em Bodoquena (20°33'17" S; 56°40'49" W), no estado do Mato Grosso do Sul. A figura 11 apresenta as localidades de coleta das espécies da série Shannoni durante dois anos de estudo.

Figura 11 – Localidades de coleta das espécies da série Shannoni para este estudo



Fonte: mapas-sp.com (editado).

As coletas foram realizadas utilizando dois tipos de armadilhas para flebotomíneos: armadilhas do tipo Shannon na cor branca e na cor preta de acordo com Galati et al. (2001) (figura 12A) e/ou armadilhas luminosas tipo CDC modificadas de Natal et al. (1991) (figura 12B). As armadilhas Shannon foram instaladas lado a lado entre 18h e 23h. Os flebotomíneos foram coletados com capturadores de Castro e transferidos para potes de transporte deles, forrados com gesso. As armadilhas CDC permaneceram 12h em campo, sendo instaladas das 18h às 6h do dia seguinte. Após a coleta de campo, os espécimes foram transportados para o Laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP-Phlebotominae) da Universidade de São Paulo. O resultado das coletas está apresentado no apêndice A.

Figura 12 – Armadilhas utilizadas para a captura de flebotomíneos. A: armadilhas de Shannon. B: armadilhas CDC



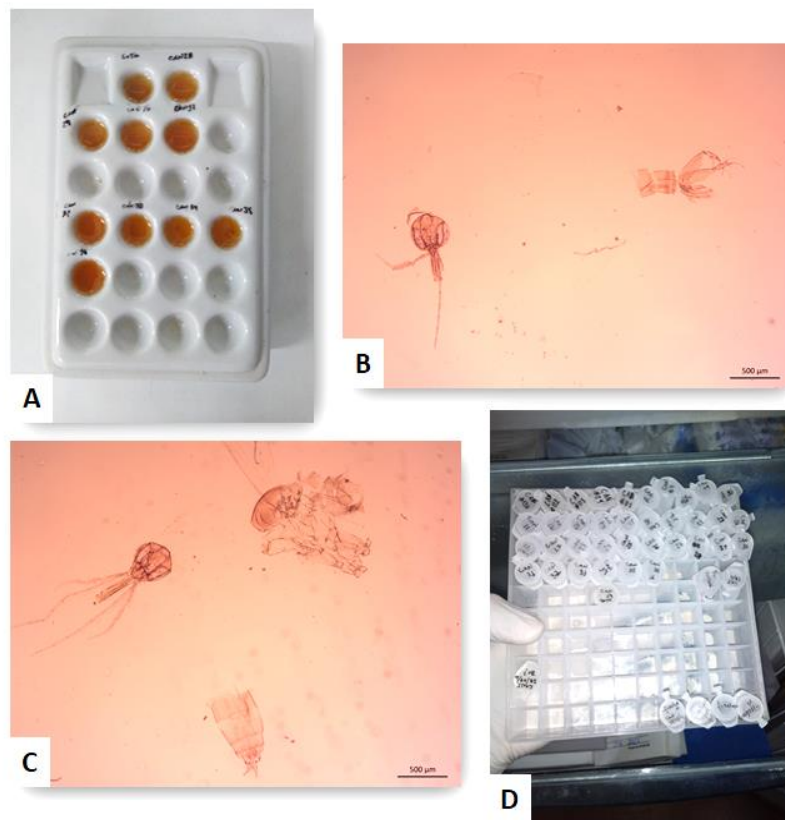
Fonte: o autor (2019).

No laboratório, às fêmeas com características de *Psathyromyia* foram oferecidos camundongos Balb/c *Mus musculus* Linnaeus, 1758 ou codornas *Coturnix coturnix* Linnaeus, 1758 previamente anestesiados, na tentativa de obter outros adultos a partir dos ovos postos. Para a obtenção e manutenção das formas imaturas, seguiu-se os protocolos estabelecidos por Killick-Kendrick e Killick-Kendrick (1991) e Killick-Kendrick, Leaney e Ready (1977), com modificações.

Quando mortos, os flebotomíneos foram seccionados com o auxílio de duas agulhas estéreis e sob um microscópio estereoscópico. A cabeça, tórax (para as fêmeas) e terminálias foram clarificadas de acordo com a técnica descrita por Forattini (1973). Em placas com poços de porcelana, as partes foram imersas em solução aquosa de hidróxido de potássio a 10% por aproximadamente 24 horas. Após, foram imersas em ácido acético absoluto por um minuto para a neutralização do efeito do hidróxido de potássio. Posteriormente, por 15 minutos, permaneceram imersos em ácido acético a 10% e, em seguida, foram submetidas a diferentes concentrações de soluções de álcool etílico (70%, 90%, 95% e absoluto), por 10 minutos cada, para desidratação. Ao final, as estruturas permaneceram em eugenol por no mínimo 24 horas (figura 13A) e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico e dois estiletes, foram montadas entre a lâmina e a lamínula em meio enecê (NC) (CERQUEIRA, 1943) para identificação e análises morfométricas. No caso dos machos, a cabeça foi posicionada no quadrante esquerdo em vista dorsal e os três últimos segmentos do abdômen foram posicionados ao lado direito da cabeça em posição lateral (figura 13B). Para as fêmeas, a cabeça

foi posicionada no quadrante esquerdo em vista ventral, o tórax foi alocado ao lado direito da cabeça em posição lateral e a terminália foi posicionada logo abaixo da cabeça, em vista ventro-lateral (figura 13C). As pernas, (tórax, para os machos) e região anterior do abdômen foram depositadas a seco em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados e conservadas a -20 °C até a extração de DNA para o sequenciamento (figura 13D).

Figura 13 – Clarificação, montagem e armazenamento de flebotomíneos. A: estruturas em eugenol. B: montagem de espécimes machos. C: montagem de espécimes fêmeas. D: armazenamento para extração do DNA



Fonte: o autor (2021).

4.4 OBTENÇÃO DE DADOS

4.4.1 Morfometria linear e análises estatísticas

Para a morfometria linear (ML), apenas estruturas da cabeça de espécimes fêmeas foram analisadas, a fim de verificar se, a partir delas, é possível a diferenciação das espécies da série Shannoni do estado de São Paulo. As estruturas medidas, a metodologia e a lente objetiva utilizada estão apresentadas no apêndice B.

As medições, dadas em micrômetros, foram feitas utilizando uma câmera AxioCam 105 color acoplada a um microscópio óptico Zeiss Axio Lab.A1®, ligados a um computador

executando o programa Zen 2012 (Zeiss®, 2013) e registradas em uma planilha criada no Microsoft Excel 2007. O número de espécimes disponíveis para as análises variou entre as espécies e alguns espécimes continham estruturas danificadas ou de difícil visualização, motivos pelos quais o número (n) de estruturas medidas é variável entre as espécies.

Para verificar quais caracteres seguiam distribuição normal (paramétrico) ou não (não-paramétrico), utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov no programa BioEstat 5.0.

Para verificar os caracteres com diferenças estatisticamente significativas entre as populações de *Pa. bigeniculata* provenientes de SP e MS, utilizou-se o teste t de variáveis independentes para os caracteres paramétricos e teste de Mann-Whitney para os caracteres não-paramétricos no programa BioEstat 5.0.

Após, realizou-se Análise de Variância (ANOVA) com pós-testes de Tukey para os caracteres paramétricos e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para os não paramétricos no software BioEstat 5.0. Essas análises foram realizadas com as espécies da série Shannoni para identificar quais caracteres são estatisticamente significativos na diferenciação das espécies e entre quais espécies há diferenciação. Para fazer o agrupamento e verificar a porcentagem de classificação correta das espécies realizou-se análise discriminante no software Past. O teste de Pillai's trace foi realizado no software Jamovi 1.8 para observar a significância da análise.

Destaca-se que a escolha das estruturas utilizadas para este estudo foi feita considerando os trabalhos de Sábio (2013, 2017), na tentativa de encontrar caracteres alternativos diferentes daqueles utilizados pela pesquisadora e que poderiam ser importantes para uma melhor separação das fêmeas das espécies estudadas, com foco naqueles da cabeça.

4.4.2 Morfometria geométrica

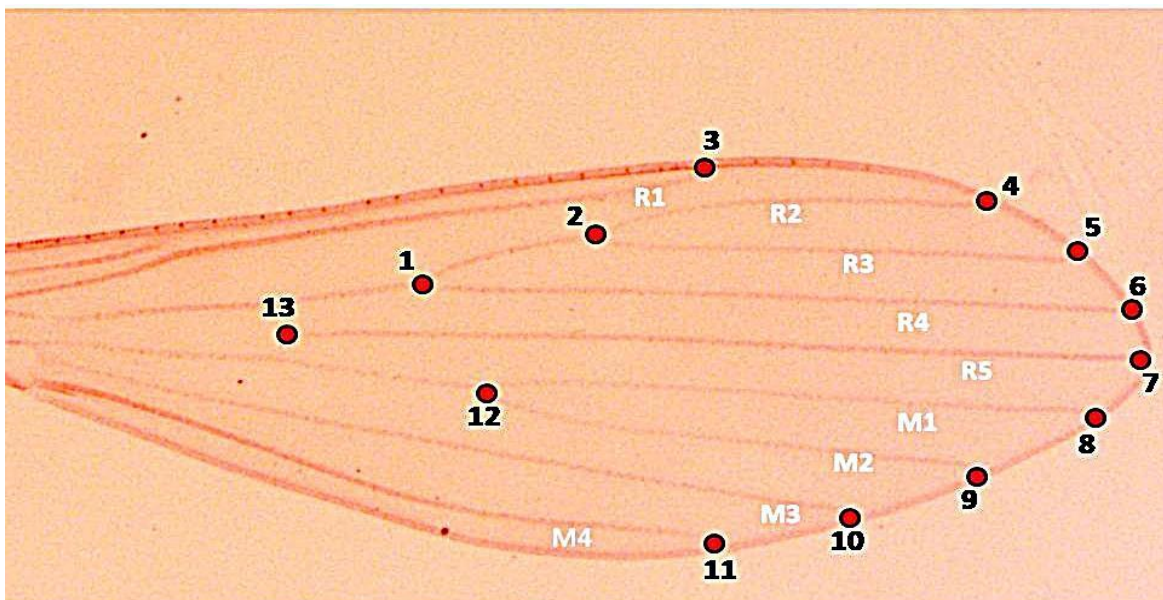
Na morfometria geométrica (MG), o tamanho amostral pode variar dependendo do objetivo do trabalho e organismo investigado. De modo geral, sugere-se trabalhar com um número de indivíduos quatro vezes maior que o número de *landmarks* por indivíduo (MONTEIRO; REIS, 1999). Destaca-se que devido ao baixo número de espécimes analisados, inicialmente foi feita uma análise geral utilizando 13 *landmarks* e, após verificar quais deles mais contribuíram para a diferenciação das espécies, esses foram diminuídos até estarem em conformidade com os pressupostos para a realização da MG em relação à quantidade de material analisado. Em virtude do baixo número de espécimes de *Pa. bigeniculata* provenientes do estado de São Paulo, os espécimes de SP e MS foram somados.

4.4.2.1 Morfometria geométrica das asas

Para a análise da morfometria geométrica alar foram priorizadas as asas direitas. Inicialmente, foram tiradas fotos das asas de 69 flebotomíneos fêmeas, sendo o total de: 30 *Pa. bigeniculata*, 5 provenientes de SP e 25 provenientes de MS, 27 *Pa. limai*, 7 *Pa. baratai* e 5 *Pa. ribeirensis* (tabela 1) utilizando uma câmera AxioCam 105 color acoplada a um microscópio óptico Zeiss Axio Lab.A1®, com lente objetiva de 2.5x, ligados a um computador executando o programa Zen 2012. Todos os arquivos receberam identificação com o mesmo número de caracteres e seguindo uma ordem, com o objetivo de otimizar a execução de diferentes análises. As imagens foram salvas em formato ".tif" com as iniciais do nome da espécie, estado de procedência e um número (ex.: BARSP001). Após, as fotos armazenadas foram transformadas em um arquivo de texto com uma lista por meio do programa *TpsUtil* (ROHLF, 2010), versão 1.60. Com a lista gerada, utilizou-se o programa *TpsDig232* (ROHLF, 2010) versão 2.19 para digitalizar os 13 marcos anatômicos iniciais em todas as fotos.

Os 13 marcos anatômicos (*landmarks*) foram definidos nas seguintes posições: marco 1: bifurcação R2+3+4; marco 2: bifurcação R2+3; marco 3: ápice de R1; marco 4: ápice de R2; marco 5: ápice de R3; marco 6: ápice R4; marco 7: ápice de R5; marco 8: ápice de M1; marco 9: ápice de M2; marco 10: ápice de M3; marco 11: ápice de M4; marco 12: bifurcação de M1+2 e marco 13: base de R5 (figura 14). Dos marcos anatômicos, 12 são do tipo I (justaposição de dois tecidos) e um do tipo II (característica pontual) (BOOKSTEIN, 1991).

Figura 14 – Marcos anatômicos iniciais utilizados para a morfometria geométrica alar das quatro espécies da série Shannoni estudadas



Fonte: o autor (2021). Asa da fêmea de *Pa. bigeniculata*. Imagem com zoom para evidenciar os *landmarks*.

Com as coordenadas cartesianas bidimensionais (x, y) geradas, primeiramente realizou-se a Análise Generalizada de Procrustes (AGP), procedimento para remover os efeitos de posição, orientação e tamanho, a fim de se obter as variáveis de forma (resíduos de sobreposição) e as variáveis de tamanho (tamanho do centroide). Nessa etapa, as formas passam por três processos: (i) translação: os centroides são superimpostos na origem por translação, para eliminar o efeito da posição; (ii) proporcionalização: o tamanho do centroide de cada configuração é escalonado para 1, eliminando o efeito do tamanho e (iii) rotação: os marcos anatômicos são rotacionados a fim de minimizar as diferenças entre os *landmarks* correspondentes, eliminando o efeito da orientação (ADAMS et al., 2004; BOOKSTEIN, 1982).

Realizada a AGP, procedeu-se à análise de variância (ANOVA) de procrustes seguida de Análise de Componentes Principais (ACP) para explorar as variáveis de forma e identificar quais pontos mais contribuíram para a diferenciação das espécies. A ACP é uma análise exploratória e auxilia na apresentação de ordenações nos dados sem a necessidade de um fator *a priori* para testar hipóteses primárias (MONTEIRO; REIS, 1999) e, a partir dela, pode-se notar as características mais evidentes das amostras. Em seguida, a Análise das Variáveis Canônicas (AVC) foi realizada. Essa etapa evidencia diferenças entre grupos formados inicialmente a partir de um conjunto de dados multivariados. Toda essa etapa foi realizada para os 13 marcos anatômicos utilizados.

Identificando os *landmarks* que mais contribuíram na diferenciação das espécies, realizou-se os mesmos procedimentos, mas dessa vez utilizando seis pontos anatômicos nas fotos. A AGP, ANOVA de procrustes e ACP foram novamente realizadas, seguidas de uma ANOVA para testar a diferença de tamanho do centroide “TC” (tamanho). O TC é calculado a partir da raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado de todos os *landmarks* a partir dos seus centroides. A dP entre duas formas é obtida por meio da raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado entre *landmarks* correspondentes após a superimposição desses (BOOKSTEIN, 1991).

Uma vez verificada a significância das diferenças, realizou-se análises classificatórias usando AVC e comparações par a par por meio de Funções Discriminantes (FD) para identificar agrupamentos, verificar a porcentagem de classificação correta (CC) e quantificar a diferença entre as formas de acordo com as distâncias de Mahalanobis (dM). A dM é uma métrica de similaridade que mede a distância entre classes de padrões e é diretamente proporcional à diferença, ou seja, quanto maior a dM entre a média de dois grupos, maior é a diferença entre eles. Para validar a diferença entre os pares de espécies foi utilizada a análise discriminante com

teste de permutação (1.000 repetições) e teste de validação cruzada (*cross-validation*). Além disso, foi realizado o teste t^2 para verificar a significância das dM e de Procrustes (dP) após os testes de permutação. Toda essa etapa foi realizada utilizando o programa MorphoJ. Os dados relacionados ao TC foram exportados do MorphoJ e analisados no *software* GraphPad Prism 9 (GRAPHPAD, 2007).

Abre-se uma observação sobre os espécimes de *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis*: optou-se por incluí-los nas análises, mas o número de indivíduos analisados dessas duas espécies está em desacordo com as premissas da MG (MONTEIRO; REIS, 1999), podendo acarretar problemas nos resultados, o que será explicado na discussão. Dessa forma, sempre que resultados relacionados a essas espécies forem apresentados, será reafirmada a necessidade de um número maior de espécimes analisados para uma conclusão mais segura.

4.4.3 Extração, amplificação, sequenciamento e análise do DNA *barcoding*

O DNA dos insetos foi extraído conforme descrito por Bruford et al. (1998), com modificações. Nos microtubos de 1,5 mL contendo as amostras conservadas a seco foram adicionados 100 μ L de Digsol Buffer (TRIS-HCL 50 mM (pH 7), EDTA 20 mM (pH 8), NaCl 117 mM e SDS 1%, autoclavado). As amostras biológicas foram então maceradas com o auxílio de pistilos. Depois, 2 μ L de Proteinase K (20 mg / mL) foram adicionados. As amostras foram então homogeneizadas por um minuto e incubadas em banho Maria a 55 °C, por aproximadamente 18 horas. Após a lise dos tecidos, foram adicionados 200 μ L de solução de acetato de amônia 4M autoclavada em cada tubo e colocados em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em vórtex durante 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm a 10 °C, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionados 500 μ L de isopropanol 100% para lavagem do DNA. Após, o material foi novamente centrifugado por 15 minutos a 14000 rpm a 10 °C e então foi descartado o sobrenadante e adicionado 500 μ L de etanol 70% para nova lavagem do DNA. Em seguida, o etanol foi descartado com cuidado e o microtubo foi deixado aberto, *overnight*, coberto com papel toalha. Na manhã seguinte o DNA foi ressuscitado com 20 μ L de tampão TE a 1x. O DNA foi colocado em banho Maria a 37 °C por 30 minutos e depois armazenado a -20 °C até a amplificação do fragmento de gene de interesse.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do fragmento do gene *citocromo c oxidase I* (658 pb), fitas *forward* e *reverse*, foram realizadas num volume final de 25 μ L, sendo 12,5 μ L de Thermo Scientific PCR Master Mix®, 1 μ L de MgCl₂ (25 mM), 8,5

μL de água Milli-Q, 2 μL de solução de DNA, 0,5 μL do *primer forward* (2 μM) LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e 0,5 μL do *primer reverse* (2 μM) HCO2198 (5'-TAAACT TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (FOLMER et al., 1994).

As condições de amplificação para o fragmento do gene *COI* foram: uma desnaturação inicial a 94 °C durante 2 minutos, 31 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C durante 60 segundos, anelamento a 48 °C durante 60 segundos, extensão a 72 °C durante 60 segundos) e uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. As amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,7% corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. Os produtos de 700 pb tendo como referência um marcador de peso molecular de 100 pb (5 μL) foram considerados como reações positivas (figura 15). Um mix de PCR com todos os reagentes utilizados menos a amostra de DNA foi utilizado como controle negativo. Os produtos de PCR positivos foram sequenciados em ambas as direções pela empresa Genomic® (apêndice C).

Figura 15 – Gel de agarose a 1,7% sob luz ultravioleta evidenciando amplificação positiva para o fragmento de gene *COI* (658 pb) das espécies estudadas

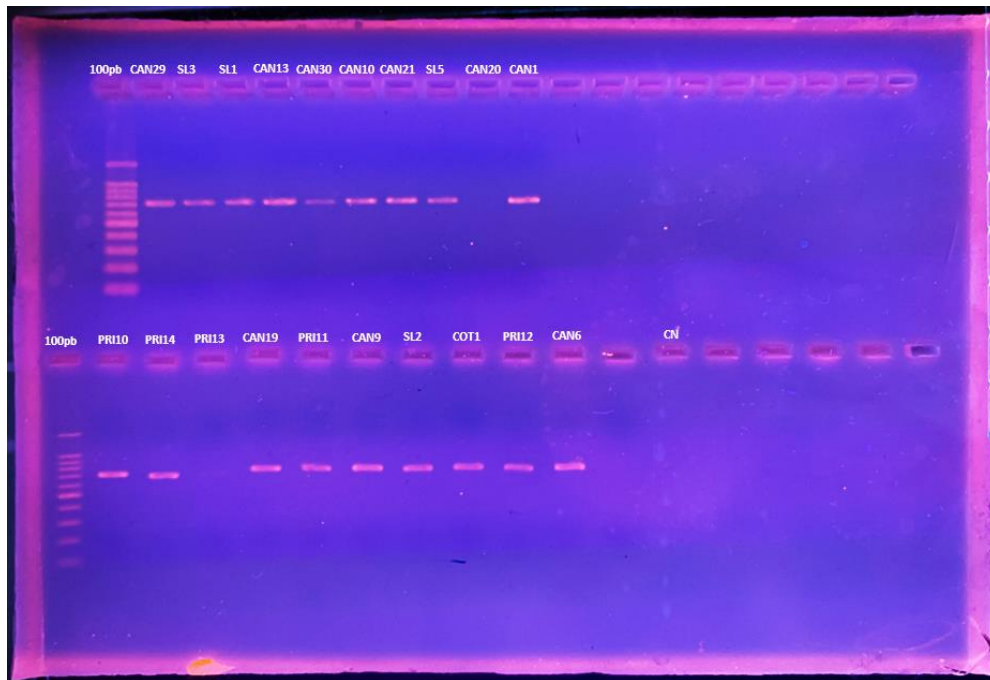


Foto: o autor (2022). O código das amostras foi inserido. Legenda: CN: controle negativo.

Todas as sequências geradas foram depositadas no banco de dados do DNA *barcoding*, *Barcode of Life Data System* - BOLD systems (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007), e serão disponibilizadas no projeto “PSABR – DNA *barcoding* Shannoni series” (apêndice C).

O *software* SeqTrace 0.9.0 foi usado para editar as sequências obtidas e gerar as sequências de consenso, que posteriormente foram alinhadas no programa *Molecular*

Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), usando o recurso ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), onde também foi verificada a existência de possíveis “*stop codons*” nas sequências. Foram realizadas buscas no banco de dados *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em 13 de julho de 2022) para sequências do mesmo fragmento amplificadas para espécies da série Shannoni: *Pa. bigeniculata*, *Pa. abonnenci* e *Pa. shannoni*. Essas sequências foram baixadas e adicionadas ao nosso conjunto de dados.

A partir dessas sequências, foram analisadas as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas de cada espécie com o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) no *software* MEGA. Essas distâncias genéticas também foram utilizadas para construção de um dendrograma de “*neighbor-joining*” (NJ) com 1.000 réplicas de *bootstrap* para checar o padrão de agrupamento das sequências de diferentes espécies. De forma similar, as sequências foram identificadas ao nível de unidades taxonômicas operacionais moleculares (do inglês: *Molecular Operational Taxonomic Unit* - MOTUs) com o algoritmo *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PULLANDRE et al., 2012) (disponível em: <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>. Acesso em: 13 de julho de 2022), que visa distribuir as sequências em espécies hipotéticas de acordo com a similaridade genética entre elas. Com isso, a utilidade do DNA *barcoding* na identificação de espécies da série Shannoni foi considerada correta se todas as sequências de uma espécie nominal foram alocadas em MOTUs sem a inclusão de outras espécies, e ambígua se mais de uma espécie foi incluída na mesma MOTU.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES EM LABORATÓRIO

Não foram obtidos outros espécimes adultos em condições de laboratório. Somente uma fêmea de *Pa. baratai* alimentou-se na codorna, porém, morreu ingurgitada no dia seguinte.

5.2 MORFOMETRIA LINEAR

Foram utilizados até 35 espécimes de cada espécie para fazer a medição de 16 estruturas, totalizando 88 espécimes utilizados para a ML, sendo: 33 de *Pa. bigeniculata* (6 provenientes de SP e 27 provenientes de MS), 30 de *Pa. limai*, 19 de *Pa. baratai* e 6 de *Pa. ribeirensis*.

O teste de Kolmogorov-Smirnov identificou que os valores de todas as estruturas medidas seguiram distribuição normal ($p > 0,05$).

5.2.1 Análise intraespecífica de *Pa. bigeniculata*

O teste t de variáveis independentes identificou três estruturas estatisticamente significativas ($p < 0,05$) que diferenciam as populações de *Pa. bigeniculata* provenientes dos estados de SP e MS: comprimento da hipofaringe ($p = 0,0219$), comprimento da lacínia da maxila ($p = 0,0391$) e comprimento do labro-epifaringe ($p = 0,0429$). As médias das três estruturas apresentaram-se maiores em espécimes de SP se comparadas àqueles de MS. Para a análise interespecífica, os espécimes de SP e MS foram agrupados.

5.2.2 Análise interespecífica

5.2.2.1 Análise de variância (ANOVA)

Doze estruturas apresentaram significância estatística na diferença entre espécies ($p < 0,05$). Essas estruturas foram: diâmetro dos omatídeos (F: 15,9; $p < 0,0001$), comprimento da fileira de dentes externos da lacínia da maxila (F: 14,6; $p < 0,0001$), comprimento da fileira de dentes da região apical do labro-epifaringe (F: 14,3; $p < 0,0001$), comprimento do labro-epifaringe (F: 12,1; $p < 0,0001$), comprimento da hipofaringe (F: 10,9; $p < 0,0001$), comprimento da mandíbula (F: 10,6; $p < 0,0001$), comprimento da fileira de dentes da região apical da hipofaringe (F: 10,0; $p < 0,0001$), largura da câmara cibarial (F: 9,5; $p < 0,0001$), comprimento da forquilha labial (F: 5,4; $p = 0,0025$), comprimento da fileira de dentes internos

da lacínia da maxila (F: 4,8; p = 0,0043), comprimento da lacínia da maxila (F: 4,7; p = 0,0047) e largura da forquilha labial (F: 3,9; p = 0,0121).

O diâmetro dos omatídeos diferenciou *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* de *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata*. O comprimento da fileira de dentes externos e internos da lacínia da maxila e o comprimento da lacínia da maxila foram estatisticamente significativos para diferenciar *Pa. baratai* de *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata*. O comprimento da fileira de dentes da região apical do labro-epifaringe de *Pa. bigeniculata* diferenciou-se significativamente daquele de *Pa. limai*, *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis*. O comprimento da hipofaringe diferenciou *Pa. limai* de *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata* e essas duas últimas entre si. O comprimento da mandíbula foi útil para diferenciar *Pa. baratai* de *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata*, e essas duas últimas entre si. Analisando o comprimento da fileira de dentes da região apical da hipofaringe, verificou-se que esse possui significância estatística para diferenciar *Pa. baratai* de *Pa. ribeirensis* e *Pa. bigeniculata* e essa última de *Pa. limai*. A largura da câmara cibarial distinguiu *Pa. limai* de *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata*. O comprimento da forquilha labial diferenciou estatisticamente *Pa. baratai* de todas as outras espécies. A largura da forquilha labial foi útil para a distinção entre *Pa. limai* e *Pa. baratai*. O comprimento do labro-epifaringe diferiu *Pa. limai* e *Pa. baratai* de *Pa. bigeniculata* e o comprimento da fileira de dentes do labro-epifaringe, por sua vez, separou *Pa. bigeniculata* de todas as demais espécies (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracteres da cabeça que separam fêmeas das espécies da série Shannoni com significância estatística

Caracteres	Espécies					
	LI-BA	LI-RI	LI-BI	BA-RI	BA-BI	RI-BI
Arco esclerosado (altura)						
Câmara cibarial (comprimento)						
Câmara cibarial (largura)	*		*			
Cibário (comprimento)						
Fileira dentes externos da lacínia da maxila (comprimento)	*				*	
Fileira dentes internos da lacínia da maxila (comprimento)	*				*	
Fileira de dentes da região apical da hipofaringe (comprimento)			*	*	*	
Fileira de dentes da região apical do labro-epifaringe (comprimento)			*		*	*
Fileira de dentes da mandíbula (comprimento)						
Forquilha labial (comprimento)	*			*	*	
Forquilha labial (largura)	*					
Mandíbula (comprimento)	*		*		*	
Labro-epifaringe (comprimento)	*				*	
Hipofaringe (comprimento)	*		*		*	
Lacínia da maxila (comprimento)	*				*	
Omatídeos (diâmetro)	*		*	*		*

Fonte: o autor (2021). Legenda: LI: *Pa. limai*. BA: *Pa. baratai*. RI: *Pa. ribeirensis*. BI: *Pa. bigeniculata*. *: estatisticamente diferente.

Psathyromyia limai e *Pa. ribeirensis* apresentam diâmetro dos omatídeos menores do que aqueles de *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata*. *Psathyromyia baratai* mostra valores mais altos do que as demais espécies se considerarmos o comprimento da lacínia da maxila, o comprimento da fileira de dentes externos e internos dessa estrutura e o comprimento da forquilha labial. Para o comprimento da fileira de dentes da região apical da hipofaringe, *Pa. bigeniculata* apresentou menores valores em relação às demais espécies. Os comprimentos da hipofaringe e do labro-epifaringe, por sua vez, mostraram-se com menores e maiores valores para *Pa. bigeniculata* e *Pa. baratai*, respectivamente, ao passo que *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* mostraram valores muito próximos entre si para essas estruturas. O mesmo acontece quando se observa os valores da média do comprimento da mandíbula. Considerando o comprimento da fileira de dentes da região apical da hipofaringe, *Pa. baratai* novamente apresenta a maior média, seguida de *Pa. limai* e, novamente, *Pa. bigeniculata* possui a menor média entre as espécies. A largura da câmara cibarial apresenta menores médias em espécimes de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*. Analisando a largura da forquilha labial, *Pa. baratai* apresentou os menores valores e *Pa. limai*, os maiores. Por fim, o valor médio da fileira de dentes do labro-epifaringe apresentou-se menor em *Pa. bigeniculata* e, nas demais espécies, valores muito próximos. Na tabela 3 é possível observar os valores em micrômetros da média, desvio padrão (DP), mínimo (mín.), máximo (máx.) e número (N) de cada estrutura das quatro espécies da série Shannoni estudadas.

Tabela 3 – Valores da média, desvio padrão, mínimo, máximo e número de espécimes fêmeas analisados obtidos para cada estrutura das espécies da série Shannoni estudadas (em micrômetros)

Estruturas	<i>Pa. limai</i>					<i>Pa. baratai</i>					<i>Pa. ribeirensis</i>					<i>Pa. bigeniculata</i>				
	Média	DP	Mín.	Máx.	N	Média	DP	Mín.	Máx.	N	Média	DP	Mín.	Máx.	N	Média	DP	Mín.	Máx.	N
Arco esclerosado (altura)	10,0	1,9	6,3	13,2	29	10,7	1,6	7,7	12,8	18	9,2	1,5	6,5	10,3	6	10,6	2,0	7,4	15,1	33
Câmara cibarial (comprimento)	23,3	2,9	17,4	29,8	30	21,5	4,1	15,7	29,5	17	24,6	1,7	22,6	26,6	6	22,7	2,8	17,4	29,1	33
Câmara cibarial (largura)	49,7	4,1	42,7	64,3	30	53,2	3,6	48,0	58,3	16	50,6	2,4	46,0	52,3	6	55,1	4,4	44,2	64,4	33
Cibário (comprimento)	43,3	4,1	34,1	53,8	29	43,4	6,2	34,9	55,8	16	43,0	3,3	39,0	48,0	6	44,4	4,4	34,6	52,0	33
Fileira de dentes externos da lacínia da maxila (comprimento)	21,4	3,4	13,4	28,7	28	28,8	3,6	21,3	35,1	16	23,3	3,5	19,5	26,4	3	23,5	3,7	16,9	33,3	31
Fileira de dentes internos da lacínia da maxila (comprimento)	73,8	9,8	60,0	99,2	28	84,8	7,2	68,7	94,2	16	74,2	16,4	51,3	89,2	4	74,2	10,7	53,3	93,5	28
Fileira de dentes da região apical da hipofaringe (comprimento)	63,1	7,1	48,1	80,6	30	67,8	6,5	52,5	78,8	18	58,4	7,4	49,8	66,9	6	56,7	7,5	32,5	73,7	31
Fileira de dentes da região apical do labro-epifaringe (comprimento)	68,6	7,4	55,2	82,4	30	67,6	8,0	56,0	78,4	18	68,6	6,4	60,1	75,9	5	58,8	4,8	50,9	70,6	33
Fileira de dentes da mandíbula (comprimento)	83,9	10,4	64,1	109,8	29	82,2	8,9	69,3	97,3	16	82,3	8,5	72,6	93,1	4	79,5	8,8	64,4	103,0	32
Forquilha labial (comprimento)	151,6	25,5	95,2	198,4	27	171,7	26,4	110,5	210,4	17	136,8	14,5	118,6	154,7	6	147,6	17,8	123,8	183,4	26
Forquilha labial (largura)	34,7	6,6	24,7	54,8	27	28,4	6,2	17,7	39,5	17	29,9	2,6	25,5	33,3	6	33,2	6,8	23,9	49,4	26
Mandíbula (comprimento)	353,7	30,1	282,5	437,2	30	381,9	17,6	346,0	415,4	16	357,2	26,5	324,5	393,8	6	331,6	35,1	199,6	395,7	33
Labro-epifaringe (comprimento)	352,7	28,5	274,1	431,8	30	372,8	20,0	331,0	406,7	18	358,3	23,5	334,9	390,1	6	329,2	26,2	266,4	384,1	33
Hipofaringe (comprimento)	354,3	29,1	280,2	436,9	30	377,0	21,1	328,4	413,2	18	354,8	27,8	313,6	390,2	6	333,2	26,7	277,2	394,0	33
Lacínia da maxila (comprimento)	316,3	32,1	245,7	393,6	28	340,9	27,3	287,1	379,6	16	313,4	26,2	294,0	351,1	4	307,4	27,8	252,4	356,1	32
Omatídeos (diâmetro)	18,9	1,1	16,0	20,7	30	20,6	1,4	18,8	23,3	19	18,9	0,6	18,2	19,7	6	20,7	1,3	17,9	23,1	32

Fonte: o autor (2021). Legenda: DP: desvio padrão. Mín.: mínimo. Máx.: máximo. N: número de estruturas analisadas.

Quatro estruturas não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) para a diferenciação das fêmeas das quatro espécies da série Shannoni estudadas, sendo elas: altura do arco esclerosado ($F: 1,31; p = 0,2769$), comprimento da câmara cibarial ($F: 2,05; p = 0,112$), comprimento do cibário ($F: 0,42; p = 0,742$) e comprimento da fileira de dentes da mandíbula ($F: 0,13; p = 0,3439$) (tabela 2).

5.2.2.2 Análise discriminante

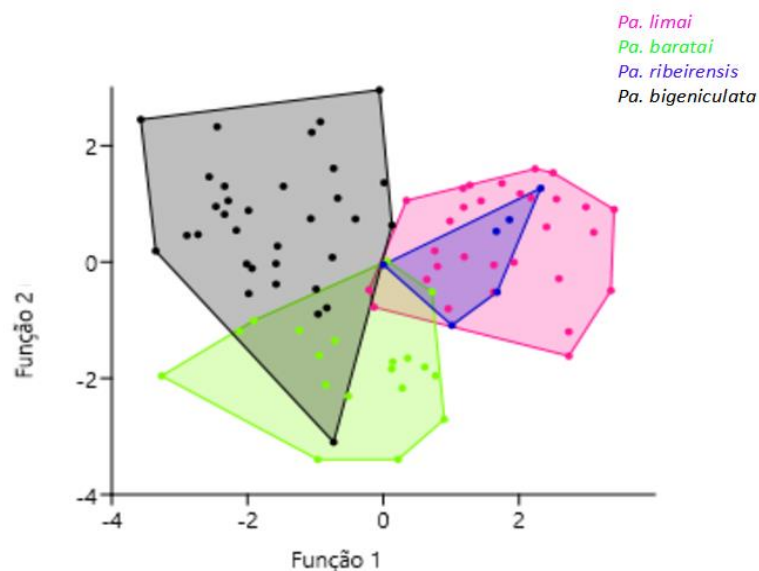
O teste de Pillai's trace evidenciou valor de $p < 0,001$, significando que de maneira geral há diferença estatisticamente significativa entre as fêmeas das quatro espécies quando se analisa todas as 16 estruturas em conjunto.

Foram geradas três funções discriminantes (já que $g - 1$, na qual g é o número de categorias da variável independente). As duas primeiras explicam 93,54% da variação total da amostra, representando 65,96% e 27,58%, respectivamente (figura 16).

A AD evidenciou que 84,09% da amostra total obteve classificação correta (CC). A matriz de confusão apresentou que para *Pa. limai* houve 80% (24/30) e para *Pa. baratai* houve 89,47% (17/19) de CC, enquanto para *Pa. ribeirensis* a CC foi 83,33% (5/6) e para *Pa. bigeniculata* houve CC em 84,84% dos casos (28/33).

A distribuição das espécies em função das variáveis canônicas discriminantes evidenciou interseções entre todas as espécies, apesar disso, é possível observar a formação de *clusters* que separam as espécies, exceto *Pa. ribeirensis* de *Pa. limai* (figura 16).

Figura 16 – Gráfico mostrando a distribuição das quatro espécies da série Shannoni estudadas em função das variáveis canônicas discriminantes 1 (65,96%) e 2 (27,58%), utilizando as 16 estruturas analisadas



Fonte: o autor (2021).

5.3 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

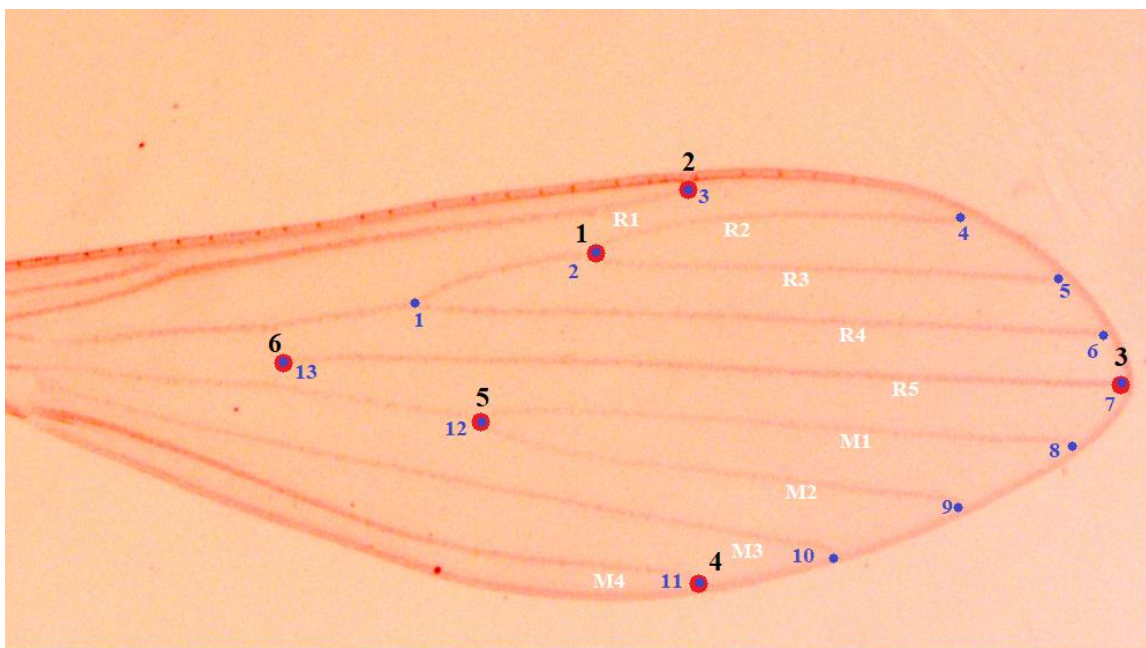
O total de 69 espécimes foram utilizados para a MG, sendo: 30 de *Pa. bigeniculata* (5 provenientes de SP e 25 provenientes de MS), 27 de *Pa. limai*, 7 de *Pa. baratai* e 5 de *Pa. ribeirensis* (tabela 1).

5.3.1 Análise inicial para a redução do número de *landmarks*

A ACP dos 13 marcos anatômicos gerou 22 componentes principais (CP), já que 13 (número de marcos anatômicos) multiplicado por 2 (eixos do gráfico) menos 4 (graus de liberdade perdidos após a AGP). Os dois primeiros CP somaram 47,3% da variação total da amostra, sendo o CP1 responsável por 25,5% e o CP2 responsável por 21,8% da variação.

Os CP1 e CP2 evidenciaram que os marcos anatômicos que melhor contribuíram na diferenciação das espécies foram: 13 (base de R5), 12 (bifurcação de M1+2), 2 (bifurcação R2+3), 11 (ápice de M4), 3 (ápice de R1) e 7 (ápice de R5). A figura 17 apresenta a localização desses pontos na asa e a nova numeração para os 6 *landmarks* (em preto).

Figura 17 – Numeração inicial e nova numeração para os 6 *landmarks* (em preto) que mais contribuíram para a separação das fêmeas das quatro espécies da série Shannoni estudadas

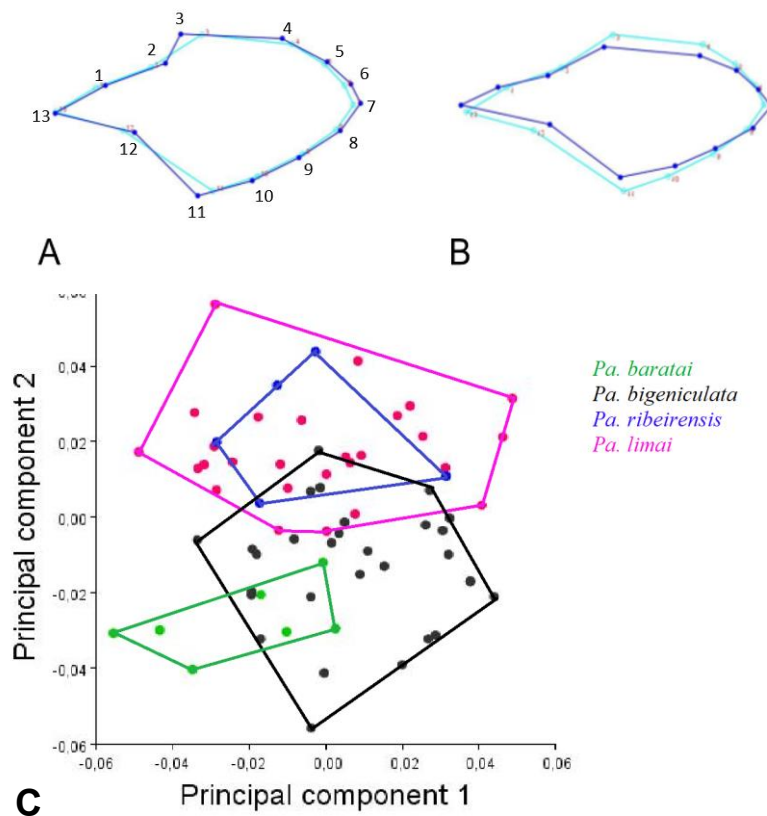


Fonte: o autor (2021). Asa da fêmea de *Pa. bigeniculata*.

Quando analisada a variação nos CP1 e CP2, pode-se observar que no CP1 a asa apresenta tendência ao alargamento (linha azul escura em relação à linha azul clara, a forma média), na qual a sua parte mediana, representada pelos pontos 3 e 11, tendem a direcionar-se

para a região anterior e mais externa. Os pontos 2, 7 e 12, por sua vez, tendem a direcionar-se para o ápice (figura 18A). No PC2 a asa tende ao estreitamento e ao alongamento, à custa dos pontos 3 e 11 que tendem a direcionar-se para a região anterior e interna e dos pontos 7 e 12 que tendem a direcionar-se para o ápice, além do ponto 13 que se direciona para a base, afilando a região compreendida pelos pontos 1, 2, 12 e 13 (figura 18B). O gráfico baseado nos dois primeiros componentes principais está apresentado na figura 18C.

Figura 18 – Análise dos Componentes Principais. A: CP1. B: CP2. C: Gráfico baseado nos dois primeiros componentes principais



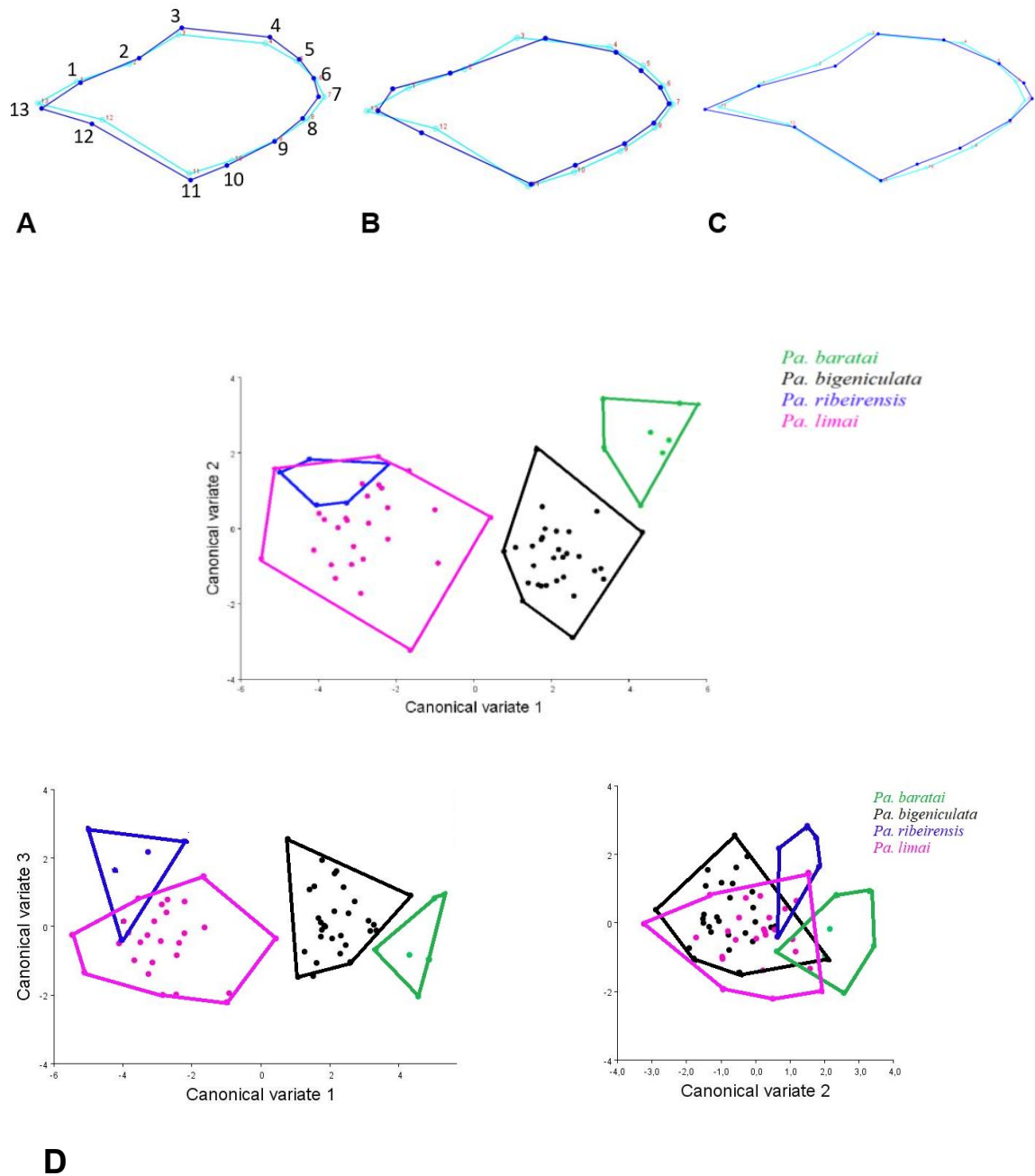
Fonte: o autor (2021).

Em relação à análise de variável canônica (VC), foram geradas 3 (já que $g - 1$, sendo g o número de variáveis independentes), sendo a VC1 responsável por 86,7% e as VC2 e VC3 responsáveis por 9,8% e 3,5% da variação, respectivamente.

Analisando a VC1 percebe-se a tendência ao alargamento e encurtamento da asa, sendo os pontos 3, 4, 5, 7, 11 e 12 os principais responsáveis pela alteração na forma (figura 19A). Para a VC2, observa-se uma tendência à redução do tamanho da asa, na qual do ponto 4 até o 10 há direcionamento para a região anterior, bem como dos pontos 1 e 2. Os pontos 3 e 13 estendem-se em direção ao ápice (figura 19B). No VC3, por sua vez, a asa tende ao

estritamento, à custa do ponto 2, que se volta em direção ao centro da asa, e ao alongamento, à custa dos pontos 13 (voltando-se para a região basal) e 6 e 7, que se voltam para a região mais apical (figura 19C). Os gráficos relacionados às variáveis canônicas evidenciaram separação entre todas as espécies (figura 19D).

Figura 19 – Análise das Variáveis Canônicas das quatro espécies da série Shannoni estudadas, utilizando 13 landmarks. A: VC1. B: VC2. C: VC3. D: Gráficos relacionados às variáveis canônicas



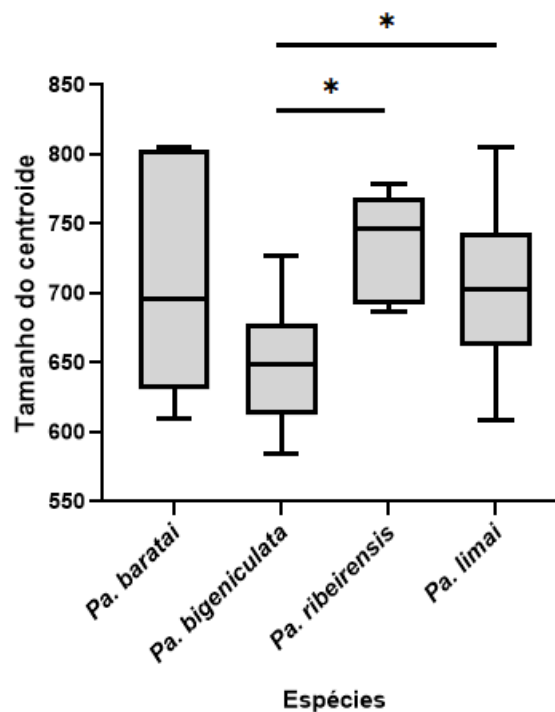
Fonte: o autor (2021).

5.3.2 Morfometria geométrica com 6 landmarks

5.3.2.1 ANOVA de centroides

A ANOVA sobre o tamanho do centroide evidenciou que $F = 7,72$ (valor da variância entre os grupos), com significância $p = 0,0002$ ($p < 0,05$), indicando diferença significativa no tamanho das asas entre os indivíduos das espécies estudadas. De acordo com o gráfico, *Pa. ribeirensis* possui os maiores tamanhos de centroides e *Pa. bigeniculata*, os menores. *Psathyromyia baratai* e *Pa. limai* mostraram valores mínimos, máximos e medianos semelhantes, porém, *Pa. baratai* apresentou maior amplitude de valores entre os quartis, indicando alta variabilidade e DP. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata* e entre essa última e *Pa. ribeirensis* (figura 20).

Figura 20 – Gráfico mostrando a comparação entre o tamanho dos centroides das quatro espécies da série Shannoni estudadas



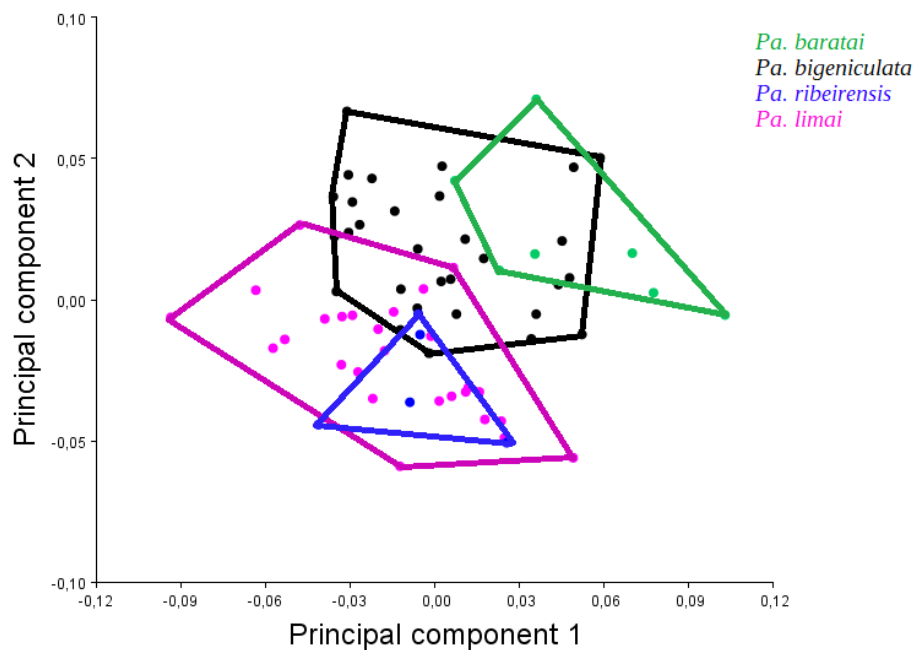
Fonte: o autor (2021). Legenda: *: $p < 0,001$.

5.3.2.2 ANOVA de procrustes

A análise de variância de procrustes evidenciou diferença significativa na forma das asas entre os indivíduos das espécies estudadas ($F = 7,79$; $p < 0,0001$).

A ACP dos seis *landmarks* gerou 8 componentes principais. Os dois primeiros CP somaram 67,1% da variação total da amostra, na qual o CP1 foi responsável por 39,5% e o CP2 responsável por 27,6% da variação (figura 21). O CP3 pouco acrescentou na diferenciação dos grupos.

Figura 21 – Gráfico mostrando a comparação entre os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) usando 6 *landmarks*



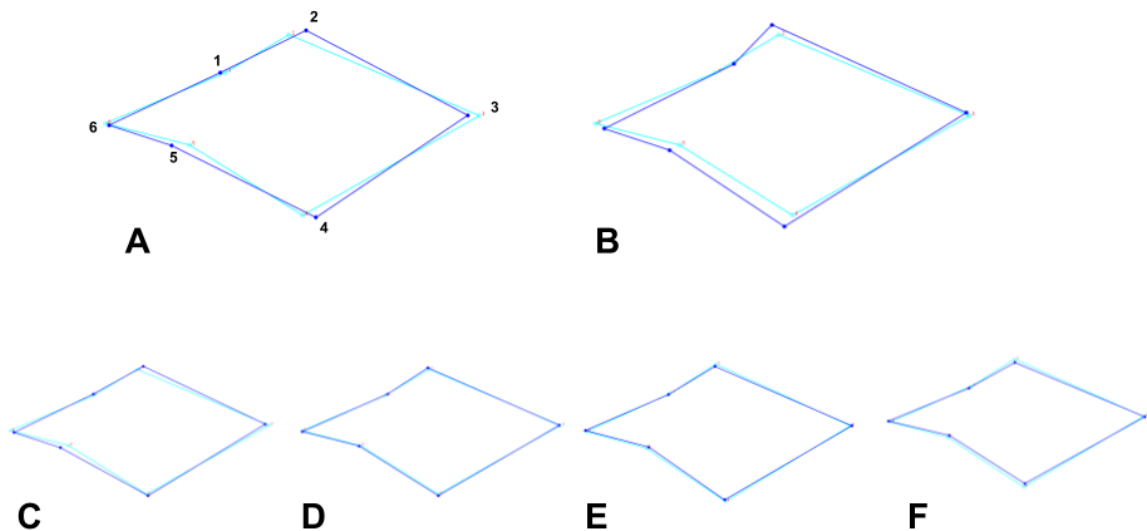
Fonte: o autor (2021).

Analisando as modificações na forma das asas percebe-se que no CP1 (figura 22A) a variação (dos pontos negativos para os positivos) ocorreu principalmente nos pontos 2 e 4, na qual dirigem-se para a região externa e mais apical, culminando em um tênue alargamento da asa numa região mais próxima ao ápice, gerando uma forma mais lanceolada. No CP2 (figura 22B), que parece melhor separar as espécies, percebe-se maior variação também nos pontos 2 e 4, mas que se dirigem para a região externa e mais basal, alargando a asa na sua região mediana. O direcionamento do ponto 2 desloca os pontos 1 e 6 para a região apical, encurtando a asa e dando-lhe aspecto menos afilado, correspondendo aos pontos mais positivos na figura 21. Observando a figura 21, nota-se que a tendência ao alargamento e encurtamento das asas ocorre em *Pa. baratai* (figura 22C), enquanto a forma média negativa está mais próxima de *Pa.*

bigeniculata (figura 22D) e as formas mais estreitas e compridas estão relacionadas à *Pa. limai* (figura 22E) e *Pa. ribeirensis* (figura 22F).

Reafirma-se que a ACP se trata de uma análise exploratória, a fim de verificar agrupamentos *a priori*. Apesar disso, reitera-se que, para resultados mais robustos, seria necessária a inclusão de mais espécimes de *Pa. ribeirensis* e *Pa. baratai*.

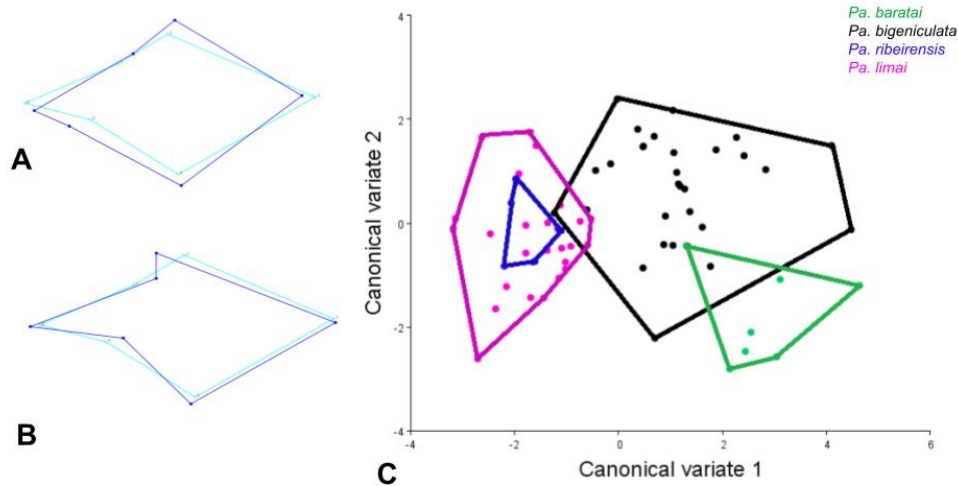
Figura 22 – Análise dos Componentes Principais com seis *landmarks*. A: CP1. B: CP2. C: tendência ao alargamento da asa (pontos positivos - azul escuro) em *Pa. baratai*. D: forma da asa similar à forma média (pontos negativos - linha azul clara). E/F: tendência ao alongamento e estreitamento da asa (pontos positivos - azul escuro) em *Pa. limai* (E) e *Pa. ribeirensis* (F)



Fonte: o autor (2021).

Foram geradas três variáveis canônicas, na qual a VC1 corresponde a 81,5% de toda a variação, e a VC2 e a VC3 correspondem a 16,9% e 1,6%, respectivamente. Observando os gráficos gerados pela análise das variáveis canônicas percebe-se que na VC1 a asa apresenta tendência ao alargamento e encurtamento, à custa dos pontos 2 e 4, que migram para a região mais externa, e dos pontos 3 e 6, que se aproximam, encurtando-a. Essa variação na forma da asa, dos pontos negativos (linha azul clara) para os positivos (linha azul escuro), é perceptível em espécimes de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* aos espécimes de *Pa. bigeniculata* e *Pa. baratai* (figura 23A/C). Na VC2 pode-se observar tendência ao estreitamento e alongamento da asa, já que os pontos 2 e 5 tendem a aproximar-se do ponto 1 e os pontos 3 e 6 tendem a afastar-se, alongando a asa (figura 23B/C). Destaca-se que as VC2 (figura 23C) e VC3 pouco contribuíram para a separação dos grupos devido à baixa variação.

Figura 23 – Análise de Variáveis Canônicas com seis *landmarks*. A: VC1. B: VC2. C: Gráfico mostrando a distribuição dos espécimes quando comparadas as VC1 e VC2



Fonte: o autor (2021).

As distâncias de Mahalanobis (dM) e distâncias de procrustes (dP) evidenciaram que feneticamente *Pa. baratai* é mais próxima de *Pa. bigeniculata* do que de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*. *Psathyromyia bigeniculata* mostrou-se mais próxima de *Pa. limai* do que de *Pa. ribeirensis* e essas duas últimas são as mais próximas entre si, considerando as quatro espécies estudadas. Houve significância estatística ($p < 0,05$) para os valores entre todos os pares nas duas análises, exceto entre *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*, novamente indicando que são espécies muito próximas morfometricamente (tabela 4). Para resultados mais seguros, seria importante a inclusão de mais espécimes de *Pa. ribeirensis* e *Pa. baratai* no estudo.

Tabela 4 – Distâncias de Mahalanobis e Procrustes entre as formas médias das asas das espécies de da série Shannoni de *Psathyromyia* estudadas

Espécies	Distância de Mahalanobis (valor de p)			Distância de procrustes (valor de p)		
	<i>Pa. baratai</i>	<i>Pa. bigeniculata</i>	<i>Pa. limai</i>	<i>Pa. baratai</i>	<i>Pa. bigeniculata</i>	<i>Pa. limai</i>
<i>Pa. bigeniculata</i>	2,9465 (< 0,0001)			0,0523 (0,0006)		
<i>Pa. limai</i>	4,6767 (< 0,0001)	2,9522 (< 0,0001)		0,0787 (< 0,0001)	0,0447 (< 0,0001)	
<i>Pa. ribeirensis</i>	4,9217 (< 0,0001)	3,1465 (< 0,0001)	0,9589 (0,8685)	0,0792 (< 0,0001)	0,0507 (0,0003)	0,0161 (0,7729)

Fonte: o autor (2021).

As análises da função discriminante geraram valores de t^2 , que testa a igualdade dos vetores médios das populações, e significância após 1.000 testes de permutação para as dP e dM (tabela 5).

Tabela 5 – Análise discriminante mostrando os valores do teste t^2 e dos valores de p para as distâncias de Procrustes e de Mahalanobis, entre os pares de espécies estudadas, após os 1000 testes de permutação

	t^2	Significância após 1.000 testes de permutação	
		Distâncias de procrustes	Distâncias de Mahalanobis
<i>Pa. baratai</i> – <i>Pa. bigeniculata</i>	45,0929	0,002	<0.001
<i>Pa. baratai</i> – <i>Pa. limai</i>	207,3543	<0.001	<0.001
<i>Pa. baratai</i> – <i>Pa. ribeirensis</i>	232,2008	<0.001	0,066
<i>Pa. bigeniculata</i> – <i>Pa. limai</i>	118,8833	<0.001	<0.001
<i>Pa. bigeniculata</i> – <i>Pa. ribeirensis</i>	39,4367	0,001	0,004
<i>Pa. limai</i> – <i>Pa. ribeirensis</i>	3,0956	0,778	0,959

Fonte: o autor (2021).

Novamente evidencia-se que *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* são as espécies mais próximas entre si, sem significância estatística entre as dP e dM. Também é evidenciada a proximidade fenética entre as asas de *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata* e a maior diferença entre *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis* (cujo valor da dM pode não ter apresentado significância estatística devido ao baixo número de espécimes dessas duas espécies), seguida de *Pa. baratai* e *Pa. limai*. O valor de t^2 relacionado ao par *Pa. bigeniculata*/*Pa. ribeirensis* pode ser devido ao baixo número de espécimes de *Pa. ribeirensis* analisado.

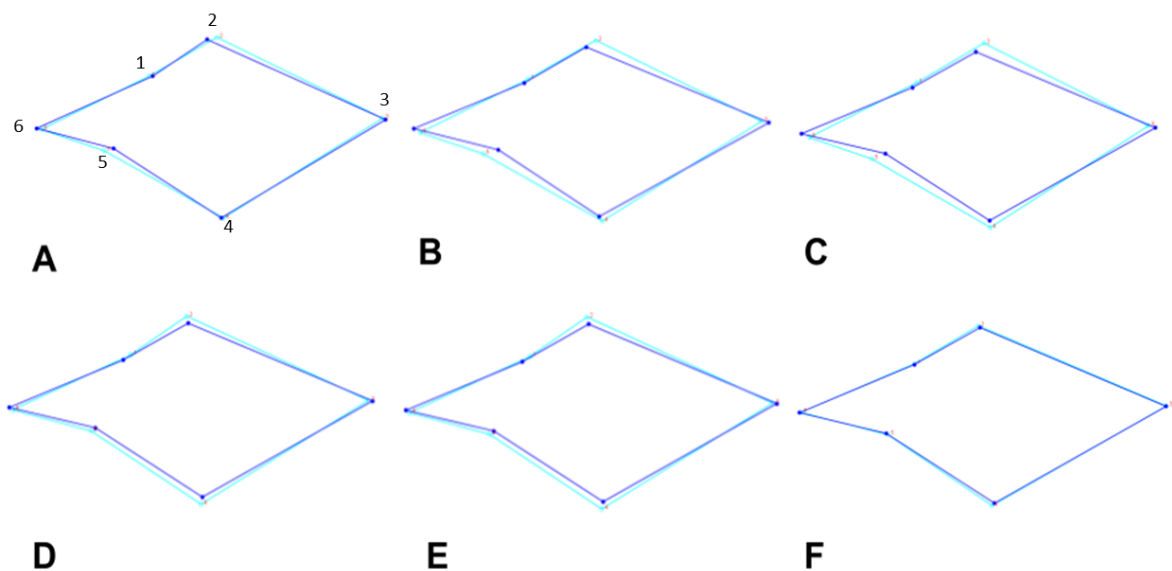
A análise da função discriminante evidenciou que entre *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata* a classificação correta (CC) foi de 85,7% (6/7) para a primeira e 93,3% (28/30) para a segunda. Entre *Pa. baratai* (7/7) e *Pa. limai* (27/27) a CC foi de 100%, o mesmo aconteceu entre *Pa. baratai* (7/7) e *Pa. ribeirensis* (5/5). Quando consideradas *Pa. bigeniculata* e *Pa. limai*, a CC foi de 93,3% (28/30) para a primeira e 100% (27/27) para a segunda. Analisando o par *Pa. bigeniculata* e *Pa. ribeirensis*, houve CC de 93,3% (28/30) e 100% (5/5), respectivamente. Por fim, entre *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* a CC foi de 70,3% (19/27) para *Pa. limai* e de 80% (4/5) para *Pa. ribeirensis*.

Após a validação cruzada, entre *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata* a CC continuou a mesma para *Pa. baratai*: 85,7% (6/7), mas para *Pa. bigeniculata* a CC caiu para 86,7% (26/30). Entre os pares *Pa. baratai*/*Pa. limai* e *Pa. baratai*/*Pa. ribeirensis* a CC permaneceu de 100% para todos. Entre *Pa. bigeniculata* e *Pa. limai* a porcentagem de CC caiu para 86,6% (26/30) e permaneceu em 100%, respectivamente. Quando comparadas *Pa. bigeniculata* e *Pa. ribeirensis*, após a validação cruzada, a primeira obteve CC de 83,3% (25/30) e a segunda permaneceu com CC de 100%. Entre a dupla *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*, a CC para *Pa. limai*

caiu para 48,1% (13/27), enquanto para *Pa. ribeirensis* a CC foi de apenas 20% (1/5). Destaca-se novamente a necessidade de um maior número de espécimes de *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis* para resultados mais seguros.

Por fim, as análises discriminantes geraram comparações entre as formas médias das asas entre os pares de espécies. Na figura 24, percebe-se novamente a tendência das asas de *Pa. baratai* serem mais largas e curtas se comparadas às de *Pa. bigeniculata* (figura 24A), *Pa. limai* (figura 24B) e *Pa. ribeirensis* (figura 24C), à custa do deslocamento para a região mais central dos pontos 1, 2, 4 e 5 e do ponto 3 para o ápice. *Psathyromyia bigeniculata*, por sua vez, apresenta forma média mais larga quando comparada à *Pa. limai* (figura 24D) e *Pa. ribeirensis* (figura 24E), que apresentam internalização dos pontos 2 e 4 e deslocamento do ponto 3, tornando-se mais apical. E, por último, *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* apresentam forma média das asas semelhantes, com um ligeiro estreitamento em *Pa. ribeirensis* (figura 24F).

Figura 24 – Formas médias das asas após Análise Discriminante entre *Pa. baratai* e: A: *Pa. bigeniculata*. B: *Pa. limai*. C: *Pa. ribeirensis*. Entre *Pa. bigeniculata* e D: *Pa. limai*. E: *Pa. ribeirensis*. F: Entre *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*



Fonte: o autor (2021).

5.4 ANÁLISES MOLECULARES

Foram geradas 10 novas sequências do gene *COI* de flebotomíneos da série Shannoni. Essas sequências são provenientes de três espécies: *Pa. limai*, *Pa. bigeniculata* e *Pa. baratai*, que contaram com cinco, uma e quatro sequências, respectivamente (Tabela 6). As quatro novas

sequências de *Pa. baratai* são inéditas para os bancos de dados genéticos, e representam as primeiras sequências de *barcodes* do gene *COI* para esse táxon.

Ao combinar as sequências deste estudo com as provenientes do *GenBank*, foi possível analisar um conjunto de dados de 47 sequências de cinco espécies, adicionando os táxons *Pa. shannoni* e *Pa. abonnenci* do departamento de Sucre, Colômbia (Romero-Ricardo et al. 2016), além de sequências de *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata* de outras localidades do Brasil (Pinto et al. 2015) (apêndice C).

A análise das distâncias nucleotídicas indicou uma alta diversidade intraespecífica do táxon *Pa. bigeniculata*, que apresentou distâncias K2P máximas de 4,7% (tabela 6). As cinco espécies analisadas apresentaram distâncias genéticas interespecíficas iguais ou maiores que as distâncias intraespecíficas (tabela 6).

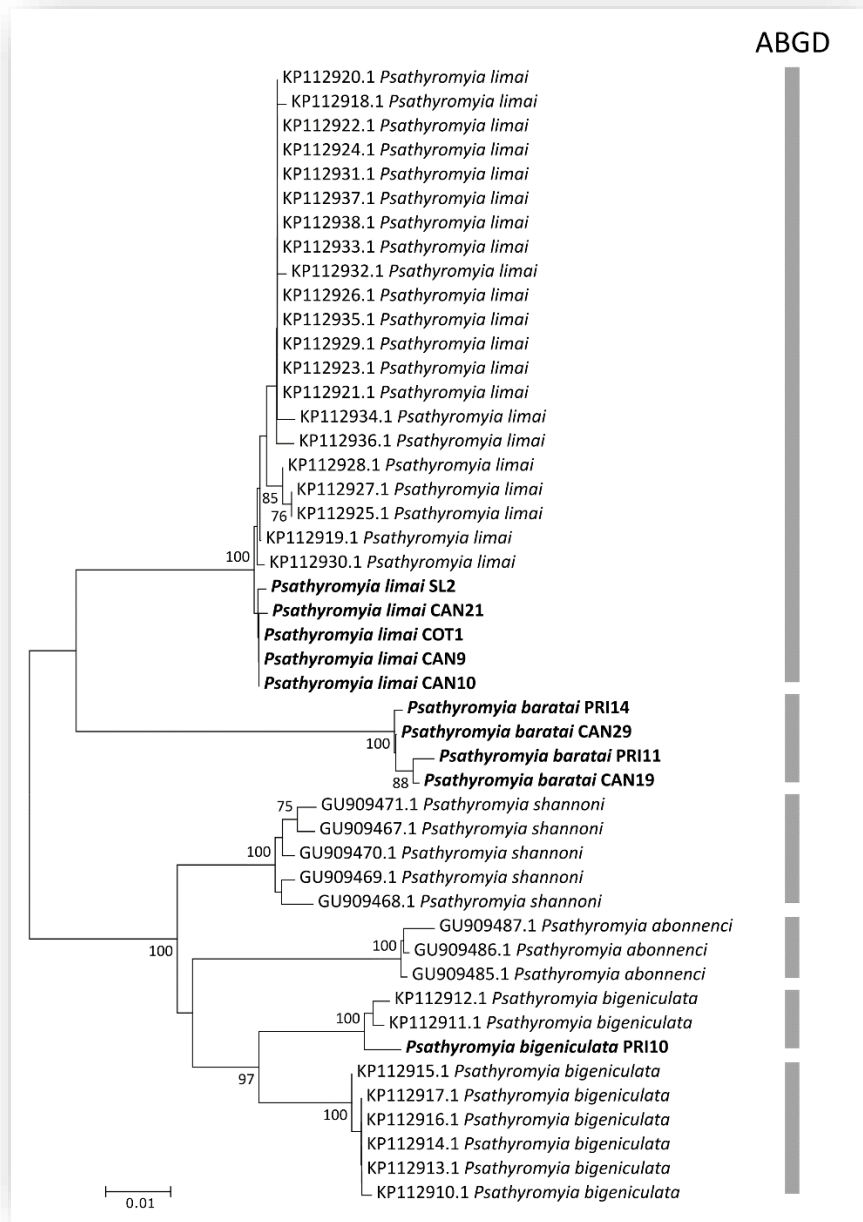
Tabela 6 – Lista de espécies, número de sequências depositadas e distâncias genéticas intra e interespecíficas de flebotomíneos da série Shannoni

Espécies	n (sequências novas)	Distância máxima K2P (média)	Nearest-neighbor (distância mínima K2P)
<i>Pa. limai</i>	26 (5)	1,0% (0,4%)	<i>Pa. shannoni</i> (9,0%)
<i>Pa. bigeniculata</i>	9 (1)	4,7% (2,2%)	<i>Pa. shannoni</i> (4,7%)
<i>Pa. baratai</i>	4 (4)	0,8% (0,5%)	<i>Pa. limai</i> (9,0%)
<i>Pa. abonnenci</i>	3 (0)	0,9% (0,5%)	<i>Pa. bigeniculata</i> (6,5%)
<i>Pa. shannoni</i>	5 (0)	1,5% (1,0%)	<i>Pa. bigeniculata</i> (4,7%)

Fonte: o autor (2022).

O dendrograma de *neighbor-joining* recuperou *clusters* bem apoiados (> 70%) para todas as espécies nominais analisadas (figura 25). Além disso, a delimitação de espécies pelo algoritmo ABGD recuperou a formação de seis MOTUs para o conjunto de dados, na qual as sequências do táxon *Pa. bigeniculata* foram separadas em duas MOTUs.

Figura 25 – Árvore de *neighbor-joining* gerada a partir de um fragmento de gene *COI* de espécies de flebotomíneos da série Shannoni. As amostras em negrito representam as que foram geradas nesse estudo. Os valores próximos aos nós representam o suporte de *bootstrap* (> 70%). A barra cinza ao lado da árvore corresponde à delimitação de espécies feita pelo algoritmo ABGD



Fonte: o autor (2022).

6 DISCUSSÃO

Das 16 estruturas analisadas, 12 delas apresentaram significância estatística para diferenciar os pares de espécies. O valor de F da ANOVA expressa o quanto as variâncias dos grupos estudados são diferentes entre si e, quanto maior o valor de F, maior a diferença entre os grupos. Observando os resultados obtidos na análise da ML percebe-se que as estruturas que mais contribuíram na diferenciação entre as espécies são, em ordem de importância: diâmetro dos omatídeos, comprimento da fileira de dentes externos da lacínia da maxila, comprimento da fileira de dentes da região apical do labro-epifaringe, comprimento do labro-epifaringe, comprimento da hipofaringe, comprimento da mandíbula, comprimento da fileira de dentes da região apical da hipofaringe, largura da câmara cibarial, comprimento da forquilha labial, comprimento da fileira de dentes internos da lacínia da maxila, comprimento da lacínia da maxila e largura da forquilha labial. É importante salientar que achar diferenças nas médias não significa a possibilidade de identificação das espécies, já que na maioria das estruturas o valor das medidas se sobrepõe, o que não ajuda no momento da identificação. Entretanto, informações como essas são importantes pois evidenciam que, quando analisadas em grupos, tais estruturas podem fornecer informações relevantes para a distinção de táxons.

A análise da morfometria linear evidencia que, utilizando as estruturas estudadas neste trabalho, os pares *Pa. limai*/*Pa. baratai* e *Pa. baratai*/*Pa. bigeniculata* são os que apresentam o maior número de estruturas estatisticamente diferentes entre si, com dez e nove estruturas, respectivamente. Em seguida, as espécies *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata* apresentaram seis estruturas com significância estatística para diferenciá-las entre si e *Pa. ribeirensis* apresentou três e duas estruturas estatisticamente diferentes com *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata*, respectivamente.

Destaca-se que entre *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* nenhuma estrutura analisada mostrou significância estatística para a diferenciação entre essas duas espécies, assim como no estudo de Sábio, Andrade e Galati (2014), em que mesmo utilizando a morfologia e morfometria linear para diversas outras estruturas da cabeça, tórax e genitália, bem como a distribuição da coloração torácica, as fêmeas dessas duas espécies permaneceram indistinguíveis. Esses mesmos autores, analisando morfometricamente estruturas de espécies do subgênero *Psathyromyia*, evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata*, retirando-as da sinonímia de *Pa. shannoni*, descreveram *Pa. ribeirensis* como espécie diferente de *Pa. limai* e evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre estruturas de *Pa. ribeirensis*, *Pa. shannoni*, *Pa. abonnenci* (Floch & Chassignet, 1947) e *Pa.*

bigeniculata. Tais estruturas estatisticamente diferentes correspondem principalmente àquelas da terminália dos machos, além dos comprimentos das asas e veias alares, labro-epifaringe e flagelômeros. Para as fêmeas, não houve diferenças estatisticamente significativas entre essas espécies. No presente estudo, o par *Pa. ribeirensis*/*Pa. bigeniculata* apresentou duas estruturas estatisticamente diferentes, sendo elas o diâmetro dos omatídeos ($p < 0,01$) e o comprimento da fileira de dentes da região apical do labro-epifaringe ($p < 0,05$).

Analisando os valores médios das estruturas da cabeça, de modo geral, *Pa. baratai* parece ter as peças bucais (mandíbula, labro-epifaringe, hipofaringe e lacínia da maxila) maiores em relação às outras espécies estudadas, enquanto *Pa. bigeniculata* apresentou-se com os menores valores para tais estruturas, o que pode ser um indício de diferentes hábitos alimentares entre essas duas espécies, já que *Pa. bigeniculata* é encontrada com maior frequência em áreas de cerrado, e *Pa. baratai*, na mata atlântica.

O teste de Pillai's trace evidenciou que as estruturas utilizadas neste estudo foram úteis para separar três espécies por meio da AD, podendo ser utilizadas de maneira alternativa para conferir identificação de um indivíduo avulso, isto é, observando-se onde este se encaixaria após a AD baseada em tais estruturas.

A AD, embora apresentando interseções entre as espécies, separou satisfatoriamente as espécies, exceto *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*. *Psathyromyia bigeniculata*, por meio de um indivíduo, intersecciona-se consideravelmente com *Pa. baratai*. Os pares *Pa. bigeniculata* e *Pa. limai*, *Pa. limai* e *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis* com *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata* apresentaram pouca interseção. *Psathyromyia ribeirensis* e *Pa. limai* não mostraram diferenciação na análise discriminante, evidenciando novamente que são espécies com fêmeas, até agora, indistinguíveis. Aqui, abre-se uma observação sobre o tamanho da amostra de *Pa. ribeirensis*: foram somente seis espécimes analisados, o que pode explicar, em partes, a não diferenciação de *Pa. limai*. Uma amostra com um maior número de observações poderia evidenciar com maior clareza a dispersão dos pontos e, logo, uma relação mais segura entre essas duas espécies. Não há, porém, um número mínimo de espécimes por categoria indicados para realizar a AD na morfometria linear, contanto que o número de observações do menor grupo exceda o número de variáveis independentes. Mas, por orientação prática, recomenda-se que cada categoria deve ter no mínimo cinco observações (ou, idealmente, 20 observações), e que os grupos tenham tamanhos semelhantes (HAIR et al., 2015).

Em relação à classificação correta, a média de 84% pode ser explicada em razão do número baixo e do conjunto das estruturas analisadas, além de terem sido analisados somente espécimes do sexo feminino.

Florin et al. (2011) analisaram por meio da morfometria linear espécimes machos e fêmeas de *Pa. shannoni* de sete diferentes áreas geográficas do Oeste dos Estados Unidos (EUA) para verificar se tratavam-se de uma única população, diferentes populações ou um complexo de espécies. Considerando a morfometria linear, esses pesquisadores obtiveram classificação correta geral de 38,2% para os machos e 55% para as fêmeas. Nesse estudo, foi concluído que os espécimes estudados se tratavam de uma única espécie e de uma única população, porém, os autores advertem que para extrapolar tais resultados para toda a espécie, seria necessário o uso de marcadores moleculares e outros caracteres morfológicos, além de dados do comportamento, ecologia e dados das formas imaturas, inclusive de espécimes de outros países, dada a ampla distribuição da espécie. Mais tarde, Florin e Rebollar-Téllez (2013) compararam por meio da morfometria linear espécimes de sete localidades do sudeste dos Estados Unidos com espécimes do Sul do México, dessa vez, observaram classificação correta de 67,5% pela morfometria linear e identificaram um processo de divergência entre as populações dos EUA e México. Esses autores sugerem que a extensão árida do Sul do Texas (EUA) até o México pode ser uma barreira alopátrica que interrompeu o fluxo gênico entre as duas populações, diferenciando-as. Godoy (2014), estudando espécies dos gêneros *Nyssomyia*, *Bichromomyia* e *Migonemyia* obteve CC de 100% quando considerou a morfometria linear de espécimes de ambos os sexos de *Br. troglodytes* (Lutz, 1922), *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata*. Porém, *Ny. intermedia*, *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* tiveram CC de 95%, 87,5% e 97,5%, respectivamente. Em outro estudo, Godoy (2018) analisando fêmeas da série Chagasi de *Psychodopygus*, obteve 100% de classificação correta entre as espécies estudadas, exceto *Ps. complexus* (Mangabeira, 1941) que obteve 97,8% de classificação correta, sendo 2,2% classificados como *Ps. chagasi* (Costa Lima, 1941). Quando analisados os machos, a CC foi de 100% para todas as espécies, exceto *Ps. squamiventris maripaensis* (Floch & Abonnenc, 1946), cuja CC foi de 80%.

A ML junto à AD das estruturas analisadas mostrou-se uma ferramenta útil para verificar a identificação de espécimes como ferramenta complementar. A base de dados gerada poderá ser armazenada a fim de, ao se obter espécimes de *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) provenientes do estado de São Paulo que, por algum motivo, o tórax foi perdido e a cabeça está montada em lâmina, inviabilizando a identificação específica, possa ser feita a medição das estruturas da cabeça e realizada a AD para observar a alocação do espécime no *scatter plot* gerado.

Salienta-se que a dificuldade em coletar espécimes da série Shannoni no estado de São Paulo é a razão para o baixo número de *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis* analisados neste estudo, o

que justifica também o baixo número desses espécimes já depositados em coleções entomológicas e consultado (tabela 1), e a utilização de espécimes de *Pa. bigeniculata* do MS. Em estudos de levantamento de fauna do estado de SP as espécies da série Shannoni geralmente representam uma das menores frequências (CASTELO et al., 2015; MOSCHIN et al., 2013; TANIGUCHI et al., 1991), evidenciando a dificuldade de coletá-las. Também não foi possível realizar coletas frequentes na tentativa de analisar um maior número de indivíduos devido principalmente ao isolamento social requerido para contenção à pandemia ocorrente e à dificuldade de locomoção até o Parque Estadual Intervales, localidade-tipo de *Pa. ribeirensis*.

A análise da morfometria geométrica inicial utilizando 13 marcos anatômicos evidenciou que os pontos que melhor contribuíram na diferenciação das espécies foram os pontos 13 (base de R5), 12 (bifurcação de M1+2), 2 (bifurcação R2+3), 11 (ápice de M4), 3 (ápice de R1) e 7 (ápice de R5). Dessa forma, para as análises da MG propriamente dita, foram utilizados esses seis *landmarks*.

De maneira geral, a utilização de 13 marcos anatômicos evidenciou que há diferença entre as formas das asas. Tanto a ACP quanto a AVC evidenciaram que *Pa. baratai* apresenta asas mais largas e curtas se comparadas às demais espécies, ao passo que *Pa. ribeirensis* possui asas mais longas e estreitas.

A utilização dos seis *landmarks* passa a obedecer a premissa da MG em que o tamanho mínimo da amostra recomendado seja quatro vezes maior que o número de *landmarks* por indivíduo (MONTEIRO; REIS, 1999), nesse caso, sendo 24 o número mínimo de indivíduos analisados por espécie. Ainda assim, o número de indivíduos de *Pa. baratai* ($n = 7$) e *Pa. ribeirensis* ($n = 5$) permanecem em desacordo com essa premissa. Optou-se por mantê-las nas análises, mas destaca-se que um número baixo de indivíduos analisados traz prejuízos aos resultados, uma vez que as análises exploratórias, classificatórias e estatísticas requerem números amostrais suficientes para estimar parâmetros ou realizar operações matriciais (FORNEL; CORDEIRO-ESTRELA, 2012). Dessa forma, destacamos novamente que os resultados referentes à *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis* podem não representar seguramente a realidade em se tratando da morfometria geométrica. Mesmo assim, foi possível perceber a separação entre *Pa. baratai* e as demais espécies.

A ANOVA de centroides mostrou que há diferença entre os tamanhos das asas das espécies estudadas. *Psathyromyia bigeniculata* apresentou os menores tamanhos, enquanto *Pa. ribeirensis* apresentou os maiores. O gráfico apresentou diferença significativa de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* com *Pa. bigeniculata*, indicando que indivíduos dessa última espécie possuem asas estatisticamente menores. Apesar da ANOVA sobre o tamanho do centroide indicar que

Pa. baratai e *Pa. limai* têm tamanhos de asas similares, a ANOVA de procrustes mostrou que *Pa. baratai* tem asas menores que *Pa. limai*, e até mesmo menores que *Pa. bigeniculata*. Uma possível explicação para essa configuração do gráfico de *Pa. baratai* pode ser o baixo número de espécimes analisados e a grande variabilidade dos valores entre os indivíduos estudados. Seria interessante analisar um maior número de espécimes de *Pa. baratai*, a fim de observar se essa condição de similaridade com *Pa. limai* se sustentaria.

A ANOVA de procrustes mostrou diferença significativa na forma das asas entre os indivíduos das espécies estudadas. Os CP1 e CP2 foram os que melhor contribuíram para a diferenciação dos grupos. No CP1 houve deslocamento principalmente dos pontos 2 e 4, que assumiram posição mais externa e apical, gerando alargamento mais próximo à região apical e conferindo aspecto mais lanceolado às asas, correspondendo àquelas de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*. No CP2, o que melhor separa as espécies, percebe-se tendência ao deslocamento também dos pontos 2 e 4 para uma região mais externa, mas que agora dirigem-se para a base, alargando a asa na região mediana e conferindo aspecto menos afilado em direção ao ápice. Também no CP2, o deslocamento do ponto 2 desloca os pontos 1 e 6 para a região apical, encurtando a asa, tendência apresentada por *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata*.

Em relação à AVC, as duas primeiras corresponderam a 98,4% de toda a variação da amostra. A VC1 (81,5%) foi a que melhor separou as espécies, na qual a asa apresenta tendência ao alargamento e ao encurtamento à custa dos pontos 2, 4, 3 e 6. Percebe-se essa tendência de espécimes de *Pa. ribeirensis* e *Pa. limai* até *Pa. baratai*, os pontos mais positivos no gráfico, passando por *Pa. bigeniculata*. Na VC2 (16,9%) pode-se perceber a tendência ao estreitamento e alongamento da asa à custa dos pontos 2 e 5, que tendem a aproximar do ponto 1, estreitando a asa em sua região basal e dos pontos 3 e 6, que tendem a afastar-se entre si, alongando a asa. Novamente percebe-se a tendência das asas de *Pa. baratai* serem menores e mais largas, ao passo que *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* parecem ter as asas mais alongadas e estreitas, com *Pa. bigeniculata* em situação intermediária entre esses dois formatos. Estudos têm evidenciado que padrões de formas e tamanhos alares estão relacionados ao genoma (KLINGENBERG; GIDASZEWSKI, 2010; MUÑOZ-MUÑOZ; TALAVERA; PAGÈS, 2011), sugerindo que a morfometria geométrica alar é uma ferramenta importante para a distinção de espécies, mesmo aquelas consideradas crípticas. Entretanto, não se pode negligenciar as influências também do ambiente (e. g. altitude, clima) no formato (forma + tamanho) das asas (DUJARDIN; LE PONT, 2004; PRUDHOMME et al., 2012), fato este que pode gerar críticas ao usar a MG para inferir filogenia de grupos.

Em relação ao uso da MG para separar táxons, Giordani et al. (2017), analisando variações de tamanho e forma das asas de machos e fêmeas de 18 espécies dos gêneros *Brumptomyia*, *Lutzomyia* e *Micropygomyia* e subgêneros *Lutzomyia s. str.* e *Helcocyrtomyia*, utilizando 6 *landmarks*, identificaram diferenças na forma das asas entre os gêneros e entre os dois subgêneros de *Lutzomyia*, com separação do subgênero *Lutzomyia s. str.* em dois grupos de espécies. Em relação ao tamanho das asas, houve também diferenças entre as espécies, inclusive entre aquelas do subgênero *Lutzomyia*, com asas das fêmeas geralmente estatisticamente maiores que as asas de machos, indicando dimorfismo sexual. Nesse trabalho, fêmeas morfologicamente idênticas não foram separadas, assim como as fêmeas de *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* deste estudo, indicando que a técnica da MG pode apresentar falhas na diferenciação de algumas espécies, sendo necessário o uso de outras fontes de evidência para diferenciá-las. Mikery et al. (2019), estudando quatro populações de *Lutzomyia cruciata* (Coquillett, 1907) de diferentes localidades de Chiapas, no México, conseguiram separar as diferentes populações e ambos os sexos por meio da morfometria geométrica utilizando 13 marcos anatômicos, ao passo que a morfometria tradicional foi capaz de separar três das quatro populações. Esses autores discutem que a MG se mostra uma ferramenta importante para a diferenciação de diferentes populações e perfis fenotípicos associados a regiões geográficas distintas. Godoy et al. (2014), utilizando 13 marcos anatômicos para estudo da morfometria geométrica alar de espécies dos gêneros *Nyssomyia*, *Bichromomyia*, *Brumptomyia* e *Migonemyia*, conseguiram diferenciar os quatro gêneros, inclusive as espécies *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*, apesar de com menores valores de classificação correta.

Neste estudo, as dM e dP, utilizadas para verificar a proximidade entre os táxons estudados, indicaram que *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* são as espécies que mais se aproximam, com valores sem significância estatística de diferença. Depois disso, todos os pares apresentaram significância estatística na diferenciação, sendo *Pa. baratai* e *Pa. bigeniculata* as mais próximas entre si, seguidas de *Pa. bigeniculata* e *Pa. limai*, *Pa. bigeniculata* e *Pa. ribeirensis*, *Pa. baratai* e *Pa. limai* e, por último, *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis* sendo as mais distantes entre si. Esses resultados novamente sugerem que as formas das asas de *Pa. bigeniculata* são mais próximas às de *Pa. baratai* e que as asas de *Pa. limai* são mais semelhantes às de *Pa. ribeirensis*.

Em relação aos valores de t^2 , evidencia-se que o par *Pa. limai/Pa. ribeirensis* é o mais próximo e sem significância estatística para separá-lo, corroborando resultados anteriores. Os demais padrões de variação foram semelhantes aos obtidos pela dM e dP antes do teste de permutação, com a diferença que o par *Pa. bigeniculata/Pa. ribeirensis* mostrou-se como o

segundo mais próximo, o que pode ser explicado pelo baixo número de espécimes de *Pa. ribeirensis* analisado, seguido do par *Pa. baratai/Pa. bigeniculata* e novamente o par *Pa. baratai/Pa. ribeirensis* sendo o que apresenta maiores valores de distância entre si, concordando que essas duas espécies possuem a maior diferença fenética alar entre si.

Observando os valores de classificação correta do estudo, o resultado mostra a forte similaridade fenotípica entre as espécies, por isso pertencem a uma mesma série dentro de um subgênero. Apesar disso, é interessante destacar que os pares *Pa. baratai/Pa. limai* e *Pa. baratai/Pa. ribeirensis*, os mais distantes dentre todos, permaneceram com 100% de CC mesmo após o teste de validação cruzada, evidenciando uma considerável diferença fenotípica entre asas de *Pa. baratai* e *Pa. limai/Pa. ribeirensis*.

As análises discriminantes comparando as formas médias de asas de cada uma das espécies evidencia mais uma vez a tendência de espécimes de *Pa. baratai* terem as asas menores e mais largas em sua região mediana, ao passo que *Pa. bigeniculata* tem asas em situação intermediária entre *Pa. baratai* e *Pa. limai*, ou seja, um pouco maior que *Pa. baratai* e um pouco mais larga que *Pa. limai*, e *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis* tendo asas mais estreitas e compridas, sendo mais notável essas características em *Pa. ribeirensis*.

Os resultados baseados na análise do fragmento do gene *COI* deste estudo foram efetivos na identificação das três espécies estudadas molecularmente. No dendrograma gerado, espécimes *Pa. limai* e *Pa. baratai* separaram-se de *Pa. bigeniculata*, que foi separada em duas MOTUs. Ao incluir também as espécies importadas do *GenBank*, a árvore gerada indicou a separação das cinco espécies da série Shannoni do subgênero *Psathyromyia* em clados bem apoiados (*bootstrap* > 70%), o mesmo ocorrendo na análise pelo algoritmo ABGD, que recuperou a delimitação de seis MOTUs, na qual também separou *Pa. bigeniculata* em duas MOTUs, sugerindo diversidade críptica na espécie.

As quatro amostras de *Pa. baratai* foram agrupadas em um clado separado, indicando que realmente se trata de uma espécie diferente das outras da série Shannoni, corroborando os estudos de Sábio, Andrade e Galati (2015) e Sábio (2017).

Analisando a máxima distância intraespecífica de *Pa. bigeniculata* deste estudo (4,7%), percebe-se a alta diversidade molecular entre indivíduos dessa espécie, assim como no estudo de Pinto et al. (2015). Essas evidências parecem indicar que essa espécie apresenta diversidade críptica intraespecífica. Nesse caso, seria interessante elucidar essa questão utilizando outras ferramentas da taxonomia integrativa, (ex.: análise molecular *multilocus*, análises químicas, ecológicas) bem como utilizar espécimes de outras diferentes localidades nas análises.

Florin et al. (2011), estudando espécimes de *Pa. shannoni* de sete diferentes localidades dos Estados Unidos, observaram que utilizando o fragmento do gene *COI* como DNA *barcode*, todas as amostras foram sustentadas por um único *cluster* bem apoiado. Florin e Rebollar-Téllez (2013), agora comparando espécimes das mesmas sete localidades dos EUA com espécimes do Sul do México, observaram a formação de dois *clusters*, sugerindo que a expansão árida ou semiárida do Sul dos EUA pode ser uma barreira alopátrica que impediu a migração e, logo, o fluxo gênico, resultando em diferentes composições genéticas entre as duas populações.

No dendrograma gerado neste estudo, espécimes de *Pa. bigeniculata* provenientes do estado do Espírito Santo (ES) formam um *cluster* diferente daqueles provenientes dos estados de Mato Grosso (MT) e MS, o que pode ser explicado por evento de isolamento por distância com interrupção do fluxo gênico, já que a população do ES ocupa áreas de mata atlântica enquanto a de MS e MT ocupa áreas de cerrado. Este estudo, portanto, corrobora Pinto et al. (2015) e evidencia que a população de *Pa. bigeniculata* do MS é mais próxima àquela de MT do que à do ES. Seria interessante o estudo da população de *Pa. bigeniculata* do estado de São Paulo, a fim de observar qual seria a sua relação com as populações de MS, MT e ES. Não foi possível a coleta de espécimes de *Pa. bigeniculata* do estado de SP, sendo essa uma das limitações do trabalho.

Uma outra limitação deste estudo foi a falta de espécimes de *Pa. ribeirensis* para as análises do DNA *barcoding*, cuja obtenção permitiria verificar se a espécie se separaria das outras da série Shannoni e principalmente de *Pa. limai*, cujas fêmeas permanecem indistinguíveis tanto pela morfologia quanto pelas morfometrias linear e geométrica das asas.

De forma geral, a utilização da taxonomia integrativa da série Shannoni baseada em estudos de morfometria linear de estruturas da cabeça, morfometria geométrica das asas e DNA *barcoding* utilizando o fragmento do gene *COI* foi útil para diferenciar fêmeas de três das quatro espécies que ocorrem no estado de São Paulo, corroborando a retirada de *Pa. bigeniculata* e *Pa. limai* da sinonímia de *Pa. shannoni* e a descrição de *Pa. baratai* como táxon distinto (SÁBIO, ANDRADE E GALATI, 2014, 2015). Fêmeas de *Pa. ribeirensis* são distinguíveis daquelas de *Pa. bigeniculata* e *Pa. baratai* pela distribuição da coloração do tórax, análise discriminante da morfometria linear de estruturas da cabeça e morfometria geométrica das asas, porém, permanecem indistinguíveis daquelas de *Pa. limai* por todos esses enfoques.

Como corolário deste estudo, propõe-se a utilização de um maior número de espécimes analisados tanto para as morfometrias linear e geométrica quanto para as análises moleculares, e a utilização de espécimes provenientes de diversas regiões em que as espécies da série

Shannoni ocorrem. Outros aspectos da taxonomia integrativa também podem fornecer informações relevantes sobre esse grupo de flebotomíneos.

7 CONCLUSÕES

- As análises discriminantes da morfometria linear de estruturas da cabeça das fêmeas possibilitaram a separação das espécies da série Shannoni do estado de São Paulo, exceto o par *Pa. ribeirensis*/*Pa. limai*.
- A morfometria geométrica das asas foi capaz de separar as fêmeas das espécies da série Shannoni do estado de São Paulo, exceto o par *Pa. ribeirensis*/*Pa. limai*.
- *Psathyromyia baratai* apresenta forma média das asas mais próxima daquela de *Pa. bigeniculata*, com tendência a ser mais curta na primeira espécie, enquanto *Pa. limai* apresenta forma média mais próxima de *Pa. ribeirensis*, na qual, nessa última espécie, tende a ser mais longa.
- O tamanho do centroide mostrou diferenciação significativa entre *Pa. bigeniculata* e *Pa. limai* e *Pa. ribeirensis*.
- Exceto para *Pa. ribeirensis*, que não foi possível realizar análises do fragmento do gene *COI*, essas foram úteis para separar *Pa. baratai*, *Pa. limai* e *Pa. bigeniculata*.
- As análises do fragmento do gene *COI* indicaram que *Pa. bigeniculata* pode representar diversidade críptica.
- As análises corroboraram a revalidação de *Pa. bigeniculata* e *Pa. limai*.
- As análises corroboram a descrição de *Pa. baratai* e *Pa. ribeirensis* como táxons distintos na série Shannoni.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**, v. 71, n. 1, p. 5-16, 2004.
- ADAMSON, R. E.; CHANCE; M. L.; WARD, R. D.; FELICIANGELI, D.; MAINGON, R. D. 1991. Molecular approaches applied to the analysis of sympatric sandfly populations in endemic areas of western Venezuela. **Parassitologia**, v. 33, p. 45-53, 1991.
- AGUIAR, G. M.; VIEIRA, V. R. Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control. *In*: RANGEL, E. F.; SHAW, J. J. (Ed.). **Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. Switzerland: Springer International Publishing, p. 251-298, 2018.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p.1-40, 2016.
- ANDERSEN, S.O. Insect cuticular sclerotization: a review. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 3, p. 166-178, 2010.
- ARRIVILLAGA, J. C.; RANGEL, Y. N.; OVIEDO, M.; FELICIANGELI, M. D. Correlated morphologic and genetic diversity among *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) collections in Venezuela. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.** v. 16, p. 171– 174, 2000.
- ARTEMIEV, M. M. A classification of the subfamily Phlebotominae. **Parassitologia**, v. 33, p. 69-77, 1991.
- BARRETTO, M. P. New subgenera of *Lutzomyia* Franca, 1924 (Diptera, Psychodidae, subfamily Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 91-100, 1962.
- BARRETTO, M. P. Sobre a sistemática da subfamília Phlebotominae Rondani (Diptera, Psychodidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 3, p. 173-190, 1955.
- BOOKSTEIN, F. L. Foundations of morphometrics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, n. 1, p. 451-470, 1982.
- BOOKSTEIN, F. L. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. **Cambridge University Press**, 1991.
- BOOTH, D. R.; READY, P. D.; SMITH, D. F. Retrotransposons and evolution in phlebotomines. **Parassitologia**, v. 33, p. 105-112, 1991.

- BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia, Biologia dos flebotomíneos neotropicais. In: Rangel E. F., Lainson, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 257-274. 2003.
- BRILHANTE, A. F.; DORVAL, M. E. M. C.; GALATI, E. A. B.; ROCHA, H. C.; CRISTALDO, G.; NUNES, V. L. B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) in an area of fishing tourism in Central-Western Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 3, p. 233-238, 2015.
- BRUFORD, M.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J. F. Y.; BUERKE, T. **Multilocus and single locus DNA fingerprinting**. Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. 2nd edition, IRL, Press Oxford, UK, p. 287-336, 1998.
- CAILLARD, T.; TIBAYRENC, M.; LE PONT, F.; DUJARDIN, J. P.; DESJEUX P.; AYALA, F. J. Diagonosis by isozyme methods of two cryptic species *Psychodopygus carrerai* and *P. yucumensis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, v. 23, n. 5, p. 489-492, 1986.
- CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. Biologia Molecular e Evolução (MATIOLI, S. R., ed.). **Ed. Holos**, Ribeirão Preto, p. 51-63, 2001.
- CALLE, D. A.; QUIÑONES, M. L.; ERAZO, H. F.; JARAMILLO, N. Differentiation by geometric morphometrics among 11 *Anopheles (Nyssorhynchus)* in Colombia. **Biomedica**, v. 28, n. 3, p. 371-385, 2008.
- CARVALHO, G. M. L.; FALCÃO, A. L.; ANDRADE FILHO, J. D. Taxonomic revision of phlebotomine sand fly species in the series *davisi* and *panamensis* of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 129-136, 2006.
- CASTELO, N. O.; NASCIMENTO, A. C. P.; OLIVEIRA, R. C.; MARQUES, S. G.; BERTOLETTI, E. F.; GALATI, E. A. B. Fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) em parques do município de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil. **Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista**, p. 1-9, 2015.
- 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, 1943.
- CHAVY, A.; NABET, C.; NORMAND, A. C.; KOCHER, A.; GINOUVES, M.; PRÉVOT, G.; SANTOS, T. V.; DEMAR, M.; PIARROUX, R.; THOISY, B. Identification of French Guiana sand flies using MALDI-TOF mass spectrometry with a new mass spectra library. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007031, 2019.

COMER, J. A.; KAVANAUGH, D. M.; STALLKNECHT, D. E.; CORN, J. L. Population dynamics of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to the epizootiology of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia. **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 6, p. 850-854, 1994.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological journal of the Linnean society**, v. 85, n. 3, p. 407-417, 2005.

DE LA RIVA, J.; LE PONT, F.; ALI, V.; MATIAS, A.; MOLLINEDO, S.; DUJARDIN, J. P. Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1089-1094, 2001.

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

DEPAQUIT, J.; PERROTEY, S.; LECOINTRE, G.; TILLIER, A.; TILLIER, S.; FERTÉ, H.; KALTENBACH, M.; LÉGER, N. Systématique moléculaire des Phlebotominae: étude pilote. Paraphylie du genre Phlebotomus. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie**, v. 321, n. 10, p. 849-855, 1998.

DIAS, E. S.; FORTES-DIAS, C. L.; STITELER, J. M.; PERKINS, P. V.; LAWYER, P. G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 1, p. 49-54, 1998.

DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875-890, 2008.

DUJARDIN, J. P.; CHAVEZ, T.; MORENO, J. M.; MACHANE, M.; NOIREAU, F.; SCHOFIELD, C. J. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Journal of medical entomology**, v. 36, n. 6, p. 653-659, 1999.

DUJARDIN, J.; LE PONT, F. 2004. Geographic variation of metric properties within the neotropical sandflies. **Infection Genetics and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 353- 359. 2004.

DUJARDIN, J. P.; TORREZ, E. M.; LE PONT, F.; HERVAS, D.; SOSSA, D. Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 4, p. 394-400, 1997.

FAZEKAS, A. J.; BURGESS, K. S.; KESANAKURTI, P. R.; GRAHAM, S. W.; NEWMASER, S. G.; HUSBAND, B. C.; PERCY, D. M.; HAJIBABAEI, M.; BARRETT, S. C. H. MultipleMultilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. **PLoS ONE**. v. 3, n. 7, p. e2802, 2008.

- FLORIN, D. A.; REBOLLAR-TÉLLEZ, E. A. Divergence of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) is indicated by morphometric and molecular analyses when examined between taxa from the southeastern United States and southern Mexico. **Journal of medical entomology**, v. 50, n. 6, p. 1324-1329, 2013.
- FLORIN, D. A.; DAVIES, S. J.; OLSEN, C.; LAWYER, P.; LIPNICK, R.; SCHULTZ, G.; ROWTON, E.; WILKERSON, R.; KEEP, L. Morphometric and molecular analyses of the sand fly species *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected from seven different geographical areas in the southeastern United States. **Journal of medical entomology**, v. 48, n. 2, p. 154-166, 2011.
- 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. **Mol Mar Biol Biotechnol.** v. 3, p. 294–9, 1994.
- FONSECA, F. Nova espécie de *Flebotomus* do Brasil (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 10, p. 61-62, 1935.
- FORATTINI, O. P. Entomologia médica: 4o volume: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. In: **Entomologia médica: 4o volume: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose.** 1973.
- FORATTINI, O. P.; RABELLO, E. X.; SERRA, O. P.; COTRIM, M. D.; GALATI, E. A. B.; BARATA, J. M. S. Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 10, p. 31-43, 1976.
- FORATTINI, O. P. Sobre a classificação da subfamília Phlebotominae nas Américas (Diptera, Psychodidae). **Pap Avulsos Depto Zool S Paulo.** v. 24, p. 93-111, 1971.
- FORD, C. S.; AYRES, K. L.; TOOMEY, N.; HAIDER, N.; STAHL, J. V. A.; KELLY, L. J.; WIKSTROM, N.; HOLLINGSWORTH, P. M.; DUFF, R. J.; HOOT, S. B.; COWAN, R. S.; CHASE, M. W.; WILKINSON, M. J. Selection of candidate coding DNA Barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.159, p.1-11, 2009.
- FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. **Temas em Biologia: Edição comemorativa**, v. 20, p. 101-120, 2012.
- GALATI, E. A. B.; ANDRADE-FILHO, J. D.; SILVA, A. C. L.; FALCÃO, A. L. Description of a new genus and new species of New World Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 1, p. 63-70, 2003.
- GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Eds.) **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, p. 23-51, 2003.

- GALATI, E. A. B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae)**. Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. 133p. 2021.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; GONÇALVES-ANDRADE, R. M.; NAUFEL, G. Attractiveness of black Shannon trap for phlebotomines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 641-647, 2001.
- GALATI, E. A. B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classification, Morphology and Terminology of Adults and Identification of American Taxa. In: RANGEL, Elizabeth F; SHAW, Jeffrey J. (Ed.). **Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. Switzerland: Springer International Publishing, p. 9-212, 2018.
- GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. **Bol Dir Malariol San Amb**, v. 35, n. Supl 1, p. 133-142, 1995.
- GIORDANI, B. F.; ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B.; GURGEL-GONÇALVES, R. The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*. **Medical and veterinary entomology**, v. 31, n. 4, p. 373-380, 2017.
- GODOY, R. E.; GALATI, E. A. B.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; SOUZA, N. A.; SANTOS, T. V.; SOUSA, L. C.; RANGEL, E. F. 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**, v. 3838, n. 5, p. 501–517-501–517, 2014.
- GODOY, R. E.; SHIMABUKURO, P. H. F.; SANTOS, T. V.; PESSOA, F. A. C.; CUNHA, A. E. F. L.; SANTOS, F. K. M.; VILELA, M. L.; RANGEL, E. F.; GALATI, E. A. B. Geometric morphometry of the head in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an alternative approach to taxonomy studies. **Zootaxa**, v. 4504, n. 4, p. 566-576, 2018.
- GODOY, R. E. **Taxonomia integrativa de espécies, com fêmeas morfologicamente similares, 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.
- GUTIÉRREZ, M. A. C.; VIVERO, R. J.; VÉLEZ, I. D.; PORTER, C. H.; URIBE, S. DNA Barcoding for the Identification of Sand Fly Species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85496, 2014.

HAIR, J.; F. BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAN, R. L. **Análise multivariada de dados**. Bookman, 2009.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 270, p.313-321, 2003.

HERTIG, M. A new genus of bloodsucking psychodids from Peru (Diptera: Psychodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 41, n. 1, p. 8-16, 1948.

JIRAKANJANAKIT, N; DUJARDIN, J. P. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): laboratory lines based on wing geometry. **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 36, n. 4, p. 858-861, 2005.

KAMHAWI, S.; MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R.; MILLIGAN, P. J.; PHILLIPS, A., WILKES, T. J.; KILLICK-KENDRICK, M. Two populations of *Phlebotomus ariasi* in the Cévennes focus of leishmaniasis in the south of France revealed by analysis of cuticular hydrocarbons. **Medical and veterinary entomology**, v. 1, n. 1, p. 97-102, 1987.

KILLICK-KENDRICK, M.; KILLICK-KENDRICK, R. The initial establishment of sandfly colonies. **Parassitologia**, v. 33, p. 315-320, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A.; READY, P.D. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 13, 429-440, 1977.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

KLINGENBERG, C.P.; GIDASZEWSKI, N.A. Testing and quantifying phylogenetic signals and homoplasy in morphometric data. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 245-261. 2010.

KOSMANN, C. **Código de barras (DNA barcode) de dípteros de interesse forense**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2009.

KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A.; JANZEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, n.23, p.8369–8374, 2005.

KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

- LAWYER, P. G.; YOUNG, D. G.; BUTLER, J. F.; AKIN, D. E. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, v. 24, n. 3, p. 347-355, 1987.
- 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.
- LYRA, M. L.; HATADANI, N. L.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. CLACZKO, L. B. Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. **Bulletin of entomological research**, v. 100, n. 1, p. 19-26, 2010.
- LOZANO-SARDANETA, Y. N.; PATERNINA, L. E.; SÁNCHEZ-MONTES, S.; QUINTERO, A.; IBÁÑEZ-BERNAL, S.; SÁNCHEZ-CORDERO, V.; BEJARANO, E. E.; BECKER, I. DNA barcoding and fauna of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. **Acta Trop**, 2020.
- MAHAMAT, H.; HASSANALI, A. Cuticular hydrocarbon composition analysis for taxonomic differentiation of phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Kenya. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 5, p. 778-781, 1998.
- MAINGON, R.; FELICIANGELI, D.; WARD, R.; CHANCE, M.; ADAMSON, R.; RODRIGUEZ, N.; CONVIT, J.; PETRALANDA, I.; HERNANDEZ, A.; SEGOVIA, M. Molecular approaches applied to the epidemiology of leishmaniasis in Venezuela. **Archives de L'institut Pasteur de Tunis**, v. 70, n. 3-4, p. 309-324, 1993.
- MARCONDES, C. B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. **Entomological News**, v. 118, n. 4, p. 351-356, 2007.
- MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, L.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.
- MARTINS, A. V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. American Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 1978.
- MEYER, D. Análise filogenética de seqüências de DNA. **Elementos Básicos de Sistemática Filogenética. Holos, Ribeirão Preto**, p. 187-212, 1997.
- MIKERY, O. F.; REBOLLAR-TÉLLEZ, E. A.; CRUZ-LÓPEZ, L. C.; MARINA, C. F.; CASTILLO, A. Traditional and geometric morphometry analyses of *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations of Chiapas, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p. 697-707, 2019.

- MIN, Z. L.; JIA, L. Y. Chinese phlebotomine sandflies of the subgenus *Adlerius* Nitzulescu, 1931 (Diptera: Psychodidae) and the identity of *P. sichuanensis* Leng & Yin, 1983. II- Genotyping and numerical analysis. **Parasite**, v. 9, n. 4, p. 287-291, 2002.
- MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. Princípios de Morfometria Geométrica. **Holos**, Ribeirão Preto. 1999.
- MORALES, A.; DE RODRÍGUEZ, M. C.; IBAGOS, A. L. Descripción de la hembra de *Lutzomya scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956) (Diptera, Psychodidae). **Biomédica**, v. 2, n. 1, p. 17-21, 1982.
- MOSCHIN, J. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; SEI, I. A.; GALATI, E. A. B. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 1, p. 190-201, 2013.
- MUÑOZ-MUÑOZ, F., TALAVERA, S. & PAGÈS, N. Geometric morphometrics of the wing in the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratoponidae): from practical implications to evolutionary interpretations. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 129-139. 2011.
- NATAL, D.; MARUCCI, D.; REIS, I. M.; GALATI, E. A. B. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). **Revista Brasileira de Entomologia** [S.l.], v. 35, n. 4, p. 697-700, 1991.
- NEWSTEAD, R. The papataci flies (*Phlebotomus*) of the Maltese Islands. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 5, n. 2, p. 139-186, 1911.
- NEWSTEAD, R. Notes on *Phlebotomus*, with descriptions of new species. **Bulletin of Entomological Research**, v. 5, n. 2, p. 179-192, 1914.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. 26 jul. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 26 jul. 2020. (a)
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. 26 jul. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 26 jul. 2020. (b)
- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2010.
- PERROTEY, S.; BENABDENNBI, I.; HADDAD, N.; PESSON, B.; LÉGER, N. Electrophoretic and morphological differentiation between two sympatric species of *Adlerius*: *Phlebotomus brevis* and *Phlebotomus simici* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 2, p. 289-294, 2000.

PHILLIPS, A.; MILLIGAN, P. J.; MAROLI, M.; LANE, R. P.; KAMHAWI, S.; BROOMFIELD, G.; MOLYNEUX, D. H. Intraspecific variation in the cuticular hydrocarbons of the sandfly *Phlebotomus perfiliewi* from Italy. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 4, p. 451-457, 1990.

PINTO, I. S.; CHAGAS, B. D.; RODRIGUES, A. A. F.; FERREIRA, A. L.; REZENDE H. R.; BRUNO, R. V.; FALQUETO, A.; ANDRADE-FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; SHIMABUKURO, P. H.; BRAZIL, R. P.; PEIXOTO, A. A. DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil. **PLoS One**, 2015.

PRUDHOMME, J.; GUNAY, F.; RAHOLA, N.; OUANAIMI, F.; GUERNAOUI, S.; BOUMEZZOUGH, A.; BAÑULS, A. L.; SERENO, D.; ALTEN, B. Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. **Journal of vector ecology**, v. 37, n. 1, p. 137-147, 2012.

PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864-1877, 2012.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

RODRIGUES, B. L.; BATON, L. A.; SHIMABUKURO, P. H. Single-locus DNA barcoding and species delimitation of the sandfly subgenus *Evandromyia* (*Aldamyia*). **Medical and Veterinary Entomology**. v. 34, n. 4, p. 420-431. 2020.

RODRIGUES B. L.; CARVALHO-COSTA, L. F.; PINTO, I. S.; REBÊLO, J. M. M. DNA Barcoding Reveals Hidden Diversity of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Fine and Broad Spatial Scales in Brazilian Endemic Regions for Leishmaniasis. **J Med Entomol**, 2018.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in ecology & evolution**, v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.

ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 21:299-316. 1990.

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

ROMERO-RICARDO, L.; LATRE-MEZA, N.; PÉREZ-DORIA, A.; BEJARANO, E. E. DNA barcoding to identify species of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) in the mixed leishmaniasis focus of the Colombian Caribbean. **Acta tropica**, v. 159, p. 125-131, 2016.

SÁBIO, P. B.; ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Assessment of the taxonomic status of some species included in the Shannoni complex, with the description of a new species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **J Med Entomol**, v. 51(2), p. 331-341, 2014.

SÁBIO, P. B.; ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Description of *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) *baratai* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Cantareira State Park, São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 1, p. 83-90, 2016.

SÁBIO, P. B. **Definição do status taxonômico do complexo Shannoni (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Brasil**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2013.

SÁBIO, P. B. **Revisão taxonômica e análise filogenética morfológica do subgênero *Psathyromyia* Barretto, 1962 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017.

SLICE, D. E. Modern morphometrics. In: **Modern morphometrics in physical anthropology**. Springer, Boston, MA. p. 1-45. 2005.

STRUCK, T. H.; FEDER, J. L.; BENDIKSBY, M.; BIRKELAND, S.; CERCA, J.; GUSAROV, V. I.; KISTENICH, S.; LARSSON, K. H.; LIOW, L. H.; NOWAK, M. D.; STEDJE B.; BACHMANN, L.; DIMITROV, D. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. **Trends in Ecology & Evolution**. p. 153-63. 2018.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. São Paulo, 22 jul. 2020. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-tegumentar-americana/situacao-atual>. Acesso em: 22 jul. 2020.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. **Leishmaniose Visceral**. São Paulo, 22 jul. 2020. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/>. Acesso em: 22 jul. 2020.

TANIGUCHI, H. H.; TOLEZANO, J. E.; CORRÊA, F. M. A.; MORAES, R. H. P.; VEIGA, R. M. O.; MARASSÁ, A. M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. I-Composição da fauna flebotomínica no município de São Roque, Região de Sorocaba. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 51, n. 1-2, p. 23-30, 1991.

THEODOR, O. Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). **Bulletin of Entomological Research**. 39, p. 85-115, 1948.

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

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

VIRGENS, T. M.; REZENDE, H. R.; PINTO, I. S.; FALQUETO, A. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) from the Goytacazes National Forest and surrounding areas of southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 1, p. 28-35, 2015.

VIVERO, R. J.; BEJARANO, E. E.; ESTRADA, L. G.; FLÓREZ, F.; ORTEGA-GÓMEZ, E.; APARICIO, Y.; TORRES-GUTIÉRREZ, C.; URIBE-SOTO, S.; MUSKUS-LÓPEZ, C. DNA barcode for identification of immature stages of sand flies (Diptera: Psychodidae) collected from natural breeding sites. **Zootaxa**, 2017.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC, 1994.

YOUNG, D. G.; FAIRCHILD, G. B. Studies on Phlebotominae sandflies. **Ann Rep Dep Entomol Nematol**. Univ. of Florida, 151p. 1974.

ZELEDON, R.; MAINGON, R.; WARD, R.; ARANA, B.; BELLI, A.; DE CARREIRA, P.; PONCE, C. The characterization of *Leishmania* parasites and their vectors from Central America using molecular techniques. **Archives de L'institut Pasteur de Tunis**, v. 70, n. 3-4, p. 325-329, 1993.

ANEXOS

A – Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para a coleta de flebotomíneos



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74974-1	Data da Emissão: 14/04/2020 19:54:16	Data da Revalidação*: 14/04/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Leonardo Estevam Honorato da Silva	CPF:
Título do Projeto: Taxonomia integrativa de espécies de Psathyromyia (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do estado de São Paulo	
Nome da Instituição: Faculdade de Saúde Pública, USP	CNPJ: 63.025.530/0017-71

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de flebotomíneos	03/2020	12/2021
2	Coleta de espécimes	03/2020	12/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	EUNICE APARECIDA BIANCHI GALATI	Orientadora	056.110.168-04	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0749740120200414

Página 1/3

B – Autorização do Instituto Florestal para a coleta de Flebotomíneos em Unidades de Conservação

Página: 47



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE INFRAESTRUTURA E MEIO AMBIENTE

INSTITUTO FLORESTAL
Rua do Horto, 931 | CEP. 02377-000 | Horto Florestal | São Paulo, SP |
Telefone: (11) 2231- 8555



PROCESSO DIGITAL IF. : 006609/2020-83
INTERESSADO : Leonardo Estevam Honorato da Silva
ASSUNTO : Encaminha o projeto de pesquisa: "Taxonomia integrativa de espécies de *Psathyromyia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do estado de São Paulo"
EQUIPE : Leonardo Estevam Honorato da Silva e Eunice Aparecida Bianchi Galati
VIGÊNCIA : Março de 2020 a Março de 2022

Carta COTEC nº 672/2020 D102/2020 WLS

São Paulo, 11 de Dezembro de 2020.

Senhor
Leonardo Estevam Honorato da Silva

São Paulo-SP
CEP:
Tel.:
E-mail: leolehs@usp.br

Apraz-nos informar que o projeto "Taxonomia integrativa de espécies de *Psathyromyia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do estado de São Paulo", constante do processo em referência, de autoria de Leonardo Estevam Honorato da Silva e Eunice Aparecida Bianchi Galati foi aprovado para ser executado, no período de Março de 2020 a Março de 2022, nas seguintes Unidades:

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
Parque Estadual Cantareira Ao responsável pela Unidade Gestor: Vladimir Arrais de Almeida	<p>a) Sede Administrativa: Endereço: Rua do Horto, 1.799, Horto Florestal, São Paulo-SP, CEP: 02.377-000 Telefones para informação: (11) 2203-0115 E-mail: tecnicapec.fflorestal@gmail.com</p> <p>Dias e horário de funcionamento: de segunda-feira a sexta-feira das 8h às 17h.</p> <p>b) Visitação: Dias e horário de funcionamento: sábado, domingo e feriados, das 8h às 17h. O acesso às trilhas é permitido somente até às 15h.</p> <p>Endereço: Núcleo Pedra Grande: Rua do Horto, 1799 – São Paulo-SP, Tel. (11) 2203-0115 Núcleo Águas Claras: Av. Senador José Ermírio de Moraes, s/n – Mairiporã – SP Núcleo Cabuçu: Av. Pedro de Souza Lopes, 7903 – Guarulhos-SP, Tel. (11) 2401-6217 Núcleo Engordador: Av. Cel. Sezefredo Fagundes (altura do nº 19100) – São Paulo-SP, Tel. (11) 2995-3254</p> <p>Estacionamento (Núcleos Águas Claras, Engordador e Cabuçu) Informações: (11) 2203-3266 – de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h ou por e-mail.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Com relação à realização do projeto no Parque Estadual da Cantareira, manifestamo-nos: De acordo com a execução do projeto; Com relação aos resultados do projeto, as informações geradas serão de: Média prioridade; Com relação ao planejamento da Unidade, o Parque Estadual da Cantareira possui: Plano de Manejo; Com relação às atividades previstas pelo projeto, existem restrições quanto: Ao Plano de Manejo; As seguintes colocações devem ser observadas pelos autores, por ocasião da visita a esta Unidade: Pede-se que todo e qualquer material (texto, relatório, lista, material didático, etc.) tenha uma cópia encaminhada à gestão da Unidade de Conservação, mesmo que em formato digital ou link; É essencial que toda a equipe de campo, incluído mateiro e motorista, se houver, estejam previamente imunizados contra febre amarela a pelo menos 15 dias da primeira data de campo; A agenda de campo deve ser previamente acertada com a equipe técnica, pois sempre que possível, um funcionário da unidade acompanhará as atividades; Demais esclarecimentos entrar em contato através do telefone da Unidade de Conservação; Em virtude da pandemia da COVID-19, o pesquisador deve se atender às regras e orientações enviadas através da Portaria Normativa FF nº 322/20 sobre a Regulamentação de Atividades de Pesquisas em UCs durante a pandemia; Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual da Cantareira, para serem juntados ao acervo da Unidade.

1

O original deste documento é eletrônico e foi assinado digitalmente por PAULA GUNTHER HAACK. Para verificar a autenticidade desta cópia impressa, acesse o site <https://e-ambiente.sp.gov.br/atendimento> e informe o processo IF.006609/2020-83 e o código RZYWYDOM.

C – Cadastro da pesquisa no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AB856E9

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AB856E9**
 Usuário: **Leonardo Estevam Honorato da Silva**
 CPF/CNPJ:
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Psathyromia limai/baratai/ribeirensis/bigeniculata

Título da Atividade: **Taxonomia integrativa de espécies de Psathyromyia (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do estado de São Paulo**

Equipe

Leonardo Estevam Honorato da Silva	Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Pa
Eunice Aparecida Bianchi Galati	Faculdade de Saúde Pública USP

Data do Cadastro: **04/11/2020 12:48:37**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12:49 de 04/11/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

D – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Taxonomia integrativa de espécies de Psathyromyia (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Estado de São Paulo**” registrada com o nº **1546/2020**, sob a responsabilidade de **Eunice Aparecida Bianchi Galati e Leonardo Estevam Honorato da Silva**, apresentada pela Faculdade de Saúde Pública da USP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 02/09/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 21-01-2020 Término: 23-05-2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c Hamster
Nº de animais	5 camundongos 1 hamster
Peso/Idade	3 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 02 de setembro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

APÊNDICES

A – Resultado das coletas realizadas em São Paulo e em Mato Grosso do Sul na tentativa de coletar espécimes da série Shannoni de *Psathyromyia* (*Psathyromyia*)

a) Coletas em São Paulo:

- Coleta 1 - Parque Jaraguá 03/12/2020 - 33 flebotomíneos, nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - 3 CDCs;
- Coleta 2 - Parque Jaraguá 20/01/2021 - 50 flebotomíneos, nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - 3 CDCs;
- Coleta 3 - Parque Cantareira 02/02/2021 - nenhum flebotomíneo - 3 CDCs;
- Coleta 4 - Parque Jaraguá 03/02/2021 - nenhum flebotomíneo - 3 CDCs;
- Coleta 5 - Parque Cantareira 03/06/2021 - 5 flebotomíneos, nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - 3 CDCs;
- Coleta 6 - Parque Jaraguá 16/06/2021 - 7 flebotomíneos, nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - 3 CDCs;
- **Coleta 7** - Parque Cantareira 26/07/2021 - 5 flebotomíneos, **1 macho** de *Psathyromyia limai* - **coleta por aspiração elétrica em troncos de árvore, tocas de tatu e frestas de rochas;**
- **Coleta 8** - Parque Cantareira 24/08/2021 - ca. 60 flebotomíneos - **4 machos** de *Psathyromyia limai* - 3 CDCs;
- Coleta 9 - Parque Jaraguá 25/08/2021 - ca. 150 flebotomíneos, nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - 3 CDCs;
- **Coleta 10** - Parque Cantareira 08/09/2021 - 53 flebotomíneos, **3 fêmeas** de *Psathyromyia limai* e **1 fêmea** de *Psathyromyia baratai* - Shannon;
- **Coleta 11** - Parque Cantareira 21/09/2021 - 15 flebotomíneos, **2 fêmeas** de *Psathyromyia limai* - Shannon;
- **Coleta 12** - Cotia 28/09/2021 - ca.150 flebotomíneos, **1 fêmea** de *Psathyromyia limai* - Shannon;
- **Coleta 13** - Parque Cantareira 28/09/2021 - ca. 80 flebotomíneos, **2 fêmeas** de *Psathyromyia baratai* e **2 fêmeas** de *Psathyromyia limai* - Shannon;
- **Coleta 14** - São Lourenço da Serra 11/12/2021 - ca. 1.135 flebotomíneos, **9 fêmeas** de *Psathyromyia limai* - Shannon e 2 CDCs;
- Coleta 15 - Parque Intervales 22/01/2022 e 23/01/2022 - ca. 60 flebotomíneos, nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - Shannon e 6 CDCs;
- **Coleta 16** - São Lourenço da Serra 29/03/2022 - 46 flebotomíneos, **3 fêmeas** de *Psathyromyia limai* - Shannon e 4 CDCs.

b) Coletas em Mato Grosso do Sul:

- Coleta 1 - Bodoquena, Bonito 07/10/2020 - nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - CDCs;
- Coleta 2 - Bodoquena, Bonito 12/11/2020 - nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - CDCs;
- Coleta 3 - Bodoquena, Bonito 19/02/2022 - nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - CDCs;
- Coleta 3 - Bodoquena, Bonito 07-09/03/2022 - nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - CDCs;
- Coleta 4 - Bodoquena, Bonito 15/03/2022 - nenhuma *Psathyromyia* série Shannoni - CDCs.

B – Estruturas, metodologia e objetiva utilizada para medição na análise da morfometria linear

Estrutura	Metodologia para medição	Objetiva utilizada
Arco esclerosado (altura)	linha reta entre as maiores distâncias do ponto médio do arco esclerosado	40
Câmara cibarial (comprimento)	linha reta do início da câmara cibarial até a linha da base dos dentes posteriores	40
Câmara cibarial (largura)	linha reta entre as maiores distâncias do ponto médio do comprimento	40
Cibário (comprimento)	início da câmara cibarial até o início do clipeo	40
Fileira dentes externos da lacínia da maxila (comprimento)	do primeiro dente mais basal até o último dente mais distal	40
Fileira dentes internos da lacínia da maxila (comprimento)	do primeiro dente mais basal até o último dente mais distal	40
Fileira de dentes da região apical da hipofaringe (comprimento)	linha reta entre o ápice do primeiro dente até o ápice do último	40
Fileira de dentes da região apical do labro-epifaringe (comprimento)	linha reta da base do dente mais basal até a base do dente mais distal	40
Fileira de dentes da mandíbula (comprimento)	linha reta da base do dente mais basal até a base do dente mais distal	40
Forquilha labial (comprimento)	do ponto médio da largura até a parte mais basal da forquilha	40
Forquilha labial (largura)	linha reta entre os dois pontos mais largos da bifurcação após a sutura labial	40
Mandíbula (comprimento)	da inserção no clipeo até a extremidade	20
Labro-epifaringe (comprimento)	da inserção no clipeo até a extremidade	20
Hipofaringe (comprimento)	da inserção no clipeo até o ápice do dente mais distal	20
Lacínia da maxila (comprimento)	da inserção no clipeo até a extremidade distal	20
Omatídeos (diâmetro)	da linha mais proximal até a linha mais distal do mesmo omatídeo (média de dez da vista dorsal)	40

C – Identificação da amostra, espécie, sexo, local de coleta e datas de espécies do subgênero *Psathyromyia* amplificadas nesse estudo e extraídas do *GenBank* para o gene *COI*

ID da amostra/lâmina	Espécie	Sexo	Local de coleta	Estado/Departamento de coleta	País de coleta	Coordenada geográfica	Data da coleta	Referência	Código do projeto	Código GenBank	ID do processo no BOLD	Sample ID	Observação
CAN10	<i>Psathyromyia limai</i>	M	Cantareira	SP	Brasil	23°26'49" S; 46°38'02" W	24/IV/2021	este estado	PSABR	N/A	PSABR001-22	SH_CAN10	N/A
CAN9	<i>Psathyromyia limai</i>	M	Cantareira	SP	Brasil	23°26'49" S; 46°38'02" W	24/IV/2021	este estado	PSABR	N/A	PSABR002-22	SH_CAN09	N/A
CAN21	<i>Psathyromyia limai</i>	F	Cantareira	SP	Brasil	23°26'49" S; 46°38'02" W	08/IX/2021	este estado	PSABR	N/A	PSABR003-22	SH_CAN21	N/A
COT1	<i>Psathyromyia limai</i>	F	Cotia	SP	Brasil	23°41'11" S; 46°54'26" W	28/IX/2021	este estado	PSABR	N/A	PSABR004-22	SH_COT1	N/A
SL2	<i>Psathyromyia limai</i>	F	São Lourenço da Serra	SP	Brasil	23°53'08" S; 46°54'58" W	11/XII/2021	este estado	PSABR	N/A	PSABR005-22	SH_SL2	N/A
PR11	<i>Psathyromyia baratai</i>	M	Embu das Artes	SP	Brasil	N/A	13/IV/2012	este estado	PSABR	N/A	PSABR006-22	SH_PR11	Espécime cedido por P. B. Sibbo
PR14	<i>Psathyromyia baratai</i>	M	Embu das Artes	SP	Brasil	N/A	11/II/2012	este estado	PSABR	N/A	PSABR007-22	SH_PR14	Espécime cedido por P. B. Sibbo
CAN19	<i>Psathyromyia baratai</i>	F	Cantareira	SP	Brasil	23°26'49" S; 46°38'02" W	29/II/2019	este estado	PSABR	N/A	PSABR008-22	SH_CAN19	N/A
CAN29	<i>Psathyromyia baratai</i>	F	Cantareira	SP	Brasil	23°26'49" S; 46°38'02" W	28/IX/2021	este estado	PSABR	N/A	PSABR009-22	SH_CAN29	N/A
PR10	<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	M	Alcântara	MS	Brasil	N/A	29/IV/2014	este estado	PSABR	N/A	PSABR012-22	SH_PR10	Espécime cedido por P. B. Sibbo
N/A	<i>Lu. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909471.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Lu. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909467.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Lu. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909470.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Lu. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909469.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Lu. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909468.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Lu. abnormanci (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909487.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Lu. abnormanci (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909486.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Lu. abnormanci (Pa. limai)</i>	N/A	Sucelejo	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Romero-Ricardo et al., 2016	N/A	GU909485.1	N/A	N/A	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Itaguapá	Sucelejo	Colômbia	N/A	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112918.1	ACK6674	LBM100553	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Marilândia	Sucelejo	Colômbia	19°44'13" S; 40°58'09" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112919.1	ACK6674	LBM100539	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Santa Maria de Jetibá	Sucelejo	Colômbia	19°58'54" S; 40°48'46" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112920.1	ACK6674	LBM100325	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Alfredo Chaves	Sucelejo	Colômbia	20°29'25" S; 40°57'28" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112921.1	ACK6674	LBM100310	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Santa Maria de Jetibá	Sucelejo	Colômbia	19°58'54" S; 40°48'46" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112922.1	ACK6674	LBM100326	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Domingos Martins	Sucelejo	Colômbia	20°24'01" S; 40°45'11" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112923.1	ACK6674	LBM100627	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	João Neiva	Sucelejo	Colômbia	40°45'11" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112924.1	ACK6674	LBM100290	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Itaguapá	Sucelejo	Colômbia	40°30'23" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112925.1	ACK6674	LBM100564	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Itaguapá	Sucelejo	Colômbia	19°44'13" S; 40°58'09" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112926.1	ACK6674	LBM100555	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Itaguapá	Sucelejo	Colômbia	19°44'13" S; 40°58'09" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112927.1	ACK6674	LBM100554	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Santa Maria de Jetibá	Sucelejo	Colômbia	19°44'13" S; 40°58'09" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112928.1	ACK6674	LBM100324	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Domingos Martins	Sucelejo	Colômbia	20°24'01" S; 40°45'11" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112929.1	ACK6674	LBM100628	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Marilândia	Sucelejo	Colômbia	19°58'54" S; 40°31'01" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112930.1	ACK6674	LBM100540	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	João Neiva	Sucelejo	Colômbia	19°48'07" S; 40°30'23" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112931.1	ACK6674	LBM100289	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Santa Maria de Jetibá	Sucelejo	Colômbia	19°58'54" S; 40°48'46" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112932.1	ACK6674	LBM100551	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Itaguapá	Sucelejo	Colômbia	19°44'13" S; 40°58'09" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112933.1	ACK6674	LBM100552	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Alfredo Chaves	Sucelejo	Colômbia	20°29'25" S; 40°57'28" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112934.1	ACK6674	LBM100313	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Alfredo Chaves	Sucelejo	Colômbia	20°29'25" S; 40°57'28" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112935.1	ACK6674	LBM100314	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Alfredo Chaves	Sucelejo	Colômbia	20°29'25" S; 40°57'28" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112936.1	ACK6674	LBM100315	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Alfredo Chaves	Sucelejo	Colômbia	20°29'25" S; 40°57'28" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112937.1	ACK6674	LBM100316	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni (Pa. limai)</i>	N/A	Alfredo Chaves	Sucelejo	Colômbia	20°29'25" S; 40°57'28" W	N/A	Pino et al., (2015)	N/A	KP112938.1	ACK6674	LBM100312	N/A

Legenda: N/A: não se aplica.

(Continua)

(Continuação)

ID da amostra/lâmina	Espécie	Sexo	Local de coleta	Estado/Departamento de coleta	País de coleta	Coordenada geográfica	Data da coleta	Referência	Código do projeto	Código GenBank	ID do processo no	Sample ID	Observação
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Santa Leopoldina	ES	Brasil	20°08'16" S; 40°30'57" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112915.1	ACM6810	LBMI#0507	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Santa Leopoldina	ES	Brasil	20°08'16" S; 40°30'57" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112917.1	ACM6810	LBMI#0503	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Santa Leopoldina	ES	Brasil	20°08'16" S; 40°30'57" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112916.1	ACM6810	LBMI#0502	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Santa Leopoldina	ES	Brasil	20°08'16" S; 40°30'57" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112914.1	ACM6810	LBMI#0499	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Santa Leopoldina	ES	Brasil	20°08'16" S; 40°30'57" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112913.1	ACM6810	LBMI#0505	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Santa Leopoldina	ES	Brasil	20°08'16" S; 40°30'57" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112910.1	ACM6810	LBMI#0504	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Cáceres	MT	Brasil	16°24'08" S; 57°29'55" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112911.1	ACM6710	LBMI#0404	N/A
N/A	<i>Pa. shannoni</i> (<i>Pa. bigeniculata</i>)	N/A	Cáceres	MT	Brasil	16°24'08" S; 57°29'55" W	N/A	Pinto et al., (2015)	N/A	KPI112912.1	ACM6710	LBMI#0402	N/A

(Conclusão)

Legenda: N/A: não se aplica.