



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO ULTRAMORFOLÓGICA DE FORMAS IMATURAS E
ADULTAS DE *Lutzomyia lonpipalpis* LUTZ E NEIVA, 1912) (Diptera:
Psychodidae) PROCEDENTES DO CAMPO E DE COLÔNIAS DE
LABORATÓRIO**

LUIZ AUGUSTO FRANÇA VALENÇA

RECIFE – PE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO ULTRAMORFOLÓGICA DE FORMAS IMATURAS E
ADULTAS DE *Lutzomyia. lonpipalpis* LUTZ E NEIVA, 1912) (Diptera:
Psychodidae) PROCEDENTES DO CAMPO E DE COLÔNIAS DE
LABORATÓRIO**

LUIZ AUGUSTO FRANÇA VALENÇA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE – PE

2015

Ficha Catalográfica

V152a Valença, Luiz Augusto França
Avaliação ultramorfológica de formas imaturas e adultas de
Lutzomyia lonpipalpis LUTZ E NEIVA, 1912) (Diptera:
Psychodidae) procedentes do campo e de colônias de laboratório /
Luiz Augusto França Valença. -- Recife, 2015.
65 f.: il.

Orientador (a): Leucio Câmara Alves.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2015.
Referências.

1. Saúde Pública 2. *Flebotomíneos* 3. *Lutzomyia* I. Alves,
Leucio Câmara, orientador II. Título

CDD 636.089

“Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica”

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO ULTRAMORFOLÓGICA DE FORMAS IMATURAS E
ADULTAS DE *Lutzomyia. lonpipalpis* LUTZ E NEIVA, 1912) (Diptera:
Psychodidae) PROCEDENTES DO CAMPO E DE COLÔNIAS DE
LABORATÓRIO**

LUIZ AUGUSTO FRANÇA VALENÇA

Aprovada em _____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

Orientador

Prof^ª. Dr^a Márcia Paula de Oliveira Fárias

UFPI

Dr^a Sandra Maria Torres.

UFRPE

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

UFRPE

Dedico a meus Pais, Hélio Cavalcanti Valença e Josefa França Valença.

Com INFINITO AMOR!

*“ O medo dá origem ao mal,
o homem coletivo sente a necessidade de lutar.
O orgulho, a arrogância, a glória enche a imaginação de domínio.
São Demônios os que destroem o poder brávil da humanidade.*

“Chico Science”

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todas as coisas.

A meu irmão, por ser meu grande amigo Hélio França Valença, o qual foi diretamente responsável pela minha chegada ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos.

A Bruna Denize Mendes de Moraes pelo apoio, companherismo, por está sempre ao meu lado em todos os momentos, onde tive abrigo e pude me suprir de afeto carinho e atenção.

Ao orientador Prof. Dr. Leucio Câmara Alves, o qual deu toda orientação, ajuda nos momentos difíceis, oportunidades e suporte nesta caminhada. Pessoa Iluminada.

A professora Ivete Lopes de Medonça pelo apoio na obtenção do material para estudo.

A Dra Sandra Maria de Torres pela co-orientação, encorajamento, apoio e pela amizade ao longo desses meses.

Aos Drs. Luiz Carlos Alves e Fábio Brayner, responsáveis pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pela oportunidade de realização do processamento do material e obtenção dos resultados.

Aos Amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos que nunca se omitiram em dar ajuda sempre que requisitada, Neurisvan Ramos Guerra, Maria Inês Cavalcanti, Marcia Paula Oliveira Farias, João Carlos Borges, Edna Michelle de Sá Santos, Nadine Louise, Carlos Diogenes, Luciana Ghinato em especial a Glaucia Grazielli Nascimento e Edson Moura da Silva.

Agradeço a CAPES, CNPq pelo apoio financeiro durante todo período de pesquisa.

A UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, por ser minha segunda casa durante todo esse período.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Flebotomíneos.....	17
2.2 Classificação Taxonômica	18
2.3 Biologia e Morfologia.....	20
2.3.1 Ciclo Biológico	20
2.3.2 Características Morfológicas.....	21
2.3.2.1 Ovos.....	21
2.3.2.2 Larva.....	22
2.3.2.3 Pupa.....	23
2.3.2.4 Insetos na Forma Adulta	23
3.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA X FLEBOTOMOS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
4. OBJETIVOS.....	33
Objetivo Geral.....	33
Objetivo Específico.....	33
ARTIGO 1: ANÁLISE DA MORFOLOGIA EXTERNA DE FORMAS IMATURAS DE COLÔNIAS DE LABORATÓRIO DE <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz e Neiva, 1912) (DIPTERA: PSICHODIDAE) Através da Utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura.	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1.INTRODUÇÃO.....	37

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Colonia de Flebotomíneos.....	37
2.2 Coleta de Material Biológico.....	38
2.3 Processamento das Amostras.....	38
3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	38
4. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ARTIGO 2: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE ESPÉCIMES ADULTOS DE <i>Lutzomyia longipalpis</i> (LUTZ E NEIVA, 1912) (DIPTERA: PSICHODIDAE)	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Amostras de Flebotomíneos de Campo.....	51
2.2 Processamento das Amostras.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ciclo de Vida do *L. Longipalpis* modificado20

Figura 2. Fêmea e macho de *L. longipalpis*..... .21

ARTIGO 1

Figura 1: Eletromicrografias de ovos de *Lutzmyia longipalpis* obtidas de colônias de laboratório.....39

Figura 2: Eletromicrografias da larva em primeiro estágio.....40

Figura 3. Eletromicrografia de larvas de *L. longipalpis* em segundo estágio.....41

Figura 4. Eletromicrografia de larvas de *L. longipalpis* em terceiro estágio..... 42

Figura 5. Eletromicrografia de Larvas de *L. longipalpis* em quarto estágio.....43

Figura 6. Eletromicrografia Pupa de *L. longipalpis*44

ARTIGO 2.

Figura 1: Micrografia de macho adulto de campo com detalhamento das estruturas ...52

Figura 2: Micrografia de genitália em macho adulto de campo com detalhamento das estruturas.....54

Figura 3: Micrografia de fêmea adulta de campo com detalhamento das estruturas55

Figura 4: Micrografia de fêmea adulta de campo com detalhamento das estruturas.....56

Figura 5: Micrografia de fêmea adulta de campo com detalhamento das estruturas61

RESUMO

Lutzomyia longipalpis tem grande importância na saúde pública por ser transmissor da leishmaniose visceral no Novo Mundo. O presente estudo teve como objetivo observar com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura os aspectos morfológicos e ultraestruturais relevantes das formas imaturas (ovos e larvas e pupa) e adultos de laboratório da espécie *L. longipalpis*, comparando os oriundos de campo com os oriundos em colônia de laboratório. Observações do exocório dos ovos mostraram que a espécie *L. longipalpis* possui ornamentações de cristas não conectadas e presença de tubérculos ao longo de toda sua superfície. Em geral, todas as fases larvais da espécie são similares. Contudo, tanto características morfológicas quanto ultraestruturais distintas foram observadas. Na morfologia: tamanhos das larvas nas diferentes fases de crescimento apresentavam forma vermiforme, coloração branca translúcida, cerdas caudais pequenas e delicadas nas larvas de primeiro estágio desenvolvendo-se ao longo do crescimento larval, detalhamento da parede frontal da larva de primeiro estágio, segmentos caudais. Características ultraestruturais como pseudo-pés, mandíbula, cerdas tricóides, cerdas filiformes foram observadas. Podemos observar nas pupas exuvia larval, segmentos do corpo, formação das asas, antenas e pernas. Já em relação à análise dos adultos tanto de campo quanto dos oriundos de colônia em laboratório, podemos observar suas características morfológicas das genitálias masculina e feminina e sensilas. Sobre as observações ultraestruturais foram visibilizados: formas e distribuição de cerdas e espinhos ao longo do corpo do vetor, além das sensilas escamiformes, tricóides e capamiformes. Este estudo poderá estabelecer novas bases para a taxonomia desse importante vetor na busca de mais informações visando maior entendimento sobre biologia e capacidade de adaptação em regiões com diferentes características edafoclimáticas.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, Flebotomíneos, *Lutzomyia*.

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis has a great importance in public health to be transmitter of visceral leishmaniasis in the New World. This study aimed to observe, with the aid of scanning electron microscopy, the morphological and ultrastructural relevant aspects of the immature forms (eggs and larvae and pupae) and the laboratory adults species of *L. longipalpis*, comparing those from the field with those from laboratory colony. Eggs exochorion observations showed that the species *L. longipalpis* has unconnected crest ornaments and the presence of tubercles along its entire surface. In general, all larval stages of this species are similar. However, both morphological characteristics as distinct ultrastructural were observed. Morphology: size of the larvae in the different stages of growth had wormlike form, translucent white color, small and delicate caudal bristles developing along the larval growth, detailing the front wall of the first-stage larva, caudal segments. Ultrastructural characteristics as pseudo-feet, jaw, trichodea bristles, filiform bristles were observed. We can see in the larval exuvia pupae, body segments, forming the wings, antennae and legs. Regarding the analysis of adults both from field as those from colony in the laboratory, we can observe their morphological characteristics of male and female genitalia and sensilla. About the ultrastructural observations were seen: forms and distribution of setae and spines along the vector of the body, besides the sensilla escamiformes, trichodea and capamiformes. This study may provide a new basis for the taxonomy of this important vector in the search for more information in order to promote better knowledge about the biology and adaptability in regions with different soil and climatic characteristics.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, sandfly, *Lutzomyia*.

1. INTRODUÇÃO

Flebotomíneos são insetos hematófagos pertencente à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (SHIMABUKURO et al., 2011).

Estes dípteros são capazes de transmitir várias doenças aos animais e ao homem, como: arboviroses, phlebovíroses, bartonelose, leishmanioses (ALEXANDER, 2000; DANTAS-TORRES, 2009; RASSI et al., 2012), além da reação de urticária local denominada Harara, e transmissão de tripanossomatídeos para répteis e anfíbios (ADLER & THEODOR, 1957).

Os flebotomíneos possuem plasticidade alimentar, pois em ambiente peridomiciliar eles encontram condições adequadas para o seu desenvolvimento, criadouro e fonte alimentar, passando a se adaptar aos ambientes antrópicos estabelecendo um ciclo de transmissão peridomiciliar (ASFORD, 2000; SHAW, 2007; LAINSON e RANGEL, 2003; 2007).

Por possuir distribuição cosmoplita sendo encontrado desde as zonas temperadas até as regiões elevadas, com cerca de 3.300 metros (FORATTINI, 1973; AGUIAR e MEDEIROS, 2003). No Brasil, 260 espécies de flebotomíneos já foram registradas. (GALATTI, 2003) em diferentes biomas com características vegetativas e climáticas distintas, como: caatinga, cerrado, floresta amazônica e chaco (AGUIAR e VILELA, 1987).

São insetos holometábolos, com quatro estádios de desenvolvimento, ovo, larva, pupa e adulto, sendo a morfologia importante na identificação e diferenciação entre as espécies existentes tendo como base o estudo das estruturas visíveis do inseto com auxílio de microscopia óptica (BARRETO 1941; GUITTON e SHERLOCK 1969; WARD, 1972; YOUNG & DUNCAN, 1994).

Atualmente a colonização de flebotomíneos é uma realidade para os pesquisadores brasileiros que trabalham com estes insetos na tentativa de conhecer um pouco mais sobre sua biologia, comportamento e sua competência vetorial na leishmaniose. Contudo até o momento não foi realizado nenhum trabalho sobre alterações ultraestruturais em populações de flebotomíneos capturados a campo e colonizadas em laboratório.

Com o aumento na colonização e criação de muitas espécies de flebotomíneos em laboratório (KILLICK-KENDRICK et al. 1991), aumentaram significativamente as possibilidades para descrever os aspectos morfológicos de ovos, larvas e pupas das espécies colonizadas (PISTA e EL SAWAF 1986, KILLICK-KENDRICK et al. 1989, ENDRIS et al. 1987, FAUSTO et al. 1992, 1993, FELICIANGELI et al. 1993, RIOS e WILLIAMS, 1995, GHOSH e MUKHOPADHWAY 1996).

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada por um número cada vez maior de taxonomistas e morfologistas, se tornando uma ferramenta útil para esclarecer o status taxonômico de alguns complexos de espécies (FAUSTO et al., 2000; ALMEIDA et al., 2004) e observação de detalhes da ornamentação do exocório de ovos, larvas e adultos de flebotomíneos (WARD e READY, 1975).

Tendo em vista a escassez de literatura nacional sobre a utilização da MEV em populações de flebotomíneos, este trabalho teve como objetivo a utilização da microscopia eletrônica de varredura na análise das ultraestruturas em populações de flebotomíneos oriundos de campo e em colônias de laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos pertencentes à subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, a qual é composta por seis gêneros: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileyia* que são encontrados no novo mundo; e *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, encontrados no velho mundo (YOUNG e DUNCAN, 1994; SHIMABUKURO et al., 2011).

Originado no Cretáceo Inferior (LEWIS, 1982), sua evolução teve a mesma origem monofilética que conduziu posteriormente para a formação de diferentes gêneros no Velho e Novo Mundo (KETTLE, 2000).

Na região Neotropical estes insetos não se afastam das zonas temperadas e podem ser encontrados em altitudes que variam desde o nível do mar até alturas de 3.300 metros (m) (LANE, 1993), podendo ser encontrado em áreas de floresta com índice pluviométrico em torno de 2000 milímetros (mm) por ano, bem como áreas semi-áridas, com cobertura vegetal arbustiva (FORATTINI, 1973; YOUNG, 1979).

Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia* tem a maior distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina (KILLICK-KENDRICK, 1989). Das mais de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas, um pouco mais de 400 são deste gênero (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Lutzomyia longipalpis tem distribuição cosmopolita no Brasil, podendo ser encontrado em todos os estados da Federação (RANGEL e VILELA, 2008), em diferentes Biomas como Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica e Chaco, (LEWIS, 1982), popularmente conhecido como mosquito-palha; asa-branca, asa-dura, tatuquira, arrepiado e pula-pula, (NASCIMENTO, 2006).

No estado de Pernambuco, são encontradas mais de 30 espécies do gênero *Lutzomyia*, destas, cinco possuem importância médica, por serem suspeitas ou comprovadamente vetores: *L. longipalpis*, a principal espécie responsável pela transmissão da leishmaniose Visceral, e *L. whitmanni*, *L. intermedia*, *L. migonei* e *L.*

evandroi, diretamente relacionadas com a transmissão da Leishmaniose Cutânea (BALBINO et al. 2003).

2.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Os métodos empregados para classificar as espécies do gênero *Lutzomyia* são baseados na observação de características morfológicas presentes nestes insetos (AZEVEDO et al 2000, ARRIVILLAGA e FELICIANGELI, 2001).

A primeira chave de classificação do gênero *Lutzomyia* foi realizada com base na observação da relação entre o tamanho dos segmentos da antena, morfologia dos ascóides, dos palpos, do lábio, extensão da sutura interocular, cibário nas fêmeas, presença ou não de espinhos femurais, genitália masculina e feminina e espermateca (YOUNG e DUNCAN, 1994) subdividindo o gênero *Lutzomyia* em 15 subgêneros e 11 grupos, sendo que apenas o grupo *Verrucarum* possui subgêneros (CACERES, 1993). Assim, alguns grupos e subgêneros anteriores à classificação foram elevados a gênero, o grupo *Verrucarum*, foi incluído no gênero *Pintomyia*, subgênero *Pifanomyia*, mas a maior mudança ficou na segregação do gênero antes conhecido como *Lutzomyia* (BEATI et al., 2004).

A segunda e atual fonte de consulta para a classificação de *Lutzomyia* do novo mundo data de 2003, onde 88 caracteres morfológicos são utilizados para a taxonomia flebotomíneos do novo mundo, valorizando particularmente as cerdas ao longo do corpo do inseto, além das outras estruturas para um melhor entendimento entre os grupos (GALATI 2003). A taxonomia clássica utiliza várias características morfológicas para a identificação dos flebótomos (CIDEIM, 1994). A procura de mais caracterestaxonômicos e métodos para a identificação e classificação dos flebotomíneos têm sido constantes, devido à ocorrência de espécies crípticas, difíceis de serem distinguidas morfológicamente.

Com Relação classificação taxonômica de flebotomíneos em estágio imaturo, existe desconhecimento quase que absoluto, em função da dificuldade de encontrar estas formas jovens em campo (FELICIANGELI, 2004).

Neste sentido Grassi e Bhatthacharya (1907) realizaram o primeiro registro de *Phlebotomus papatasi* imaturo. Subsequentemente, Belcour (1928), Hanson (1968) e Forattini (1973) deram contribuições para o estudo dos estágios imaturos de

Flebotomíneos. No que se refere na análise da diferenciação enquanto a morfologia visando fazer a identificação das diferentes espécies.

Todos esses padrões foram agrupados em oito categorias morfológicas denominadas: poligonal (pentagonal, retangular, hexagonal), com coluna conectada e não conectada paralela, vulcânico, reticular, verrugosa, elíptica e dispersa. (ENDRIS et al. 1987; FELICIANGELI et al., 1993; PÉREZ e OGUSUKU, 1997; BEJARANO et al., 2003, SIERRA et al. 2000). Assumindo caráter organizacional com base nas características particulares das espécies, de forma a estabelecer diferenciações capazes de serem usadas para a identificação.

Com relação a larva, os estudos sugerem o uso de padrões de quetotaxia (distribuição de cerdas e espinhos no corpo), principalmente por não haver uma nomenclatura uniforme, como também, chaves dicotômicas, para permitir a realização da identificação taxonômica (WARD, 1976).

Fausto et al 2001, sugere o relato da presença de dois pares de espiráculos localizados no tórax, abdômen e o número de papilas nestes espiráculos de 8, 10 a 14 a nível abdominal de larvas de quarto estágio. Contudo, apesar de descrições feitas objetivando o fechamento das chaves taxonômicas para a identificação das formas jovens, recai numa dificuldade comum que essas formas imaturas possuem, de serem encontradas na natureza.

Segundo Young e Duncan (1994) e Galati (2010), o estudo de estruturas externas e internas dos flebótomos tem sido a base para a identificação taxonômica de espécies de Flebotomíneos.

2.3 BIOLOGIA E MORFOLOGIA

2.3.1 Ciclo biológico

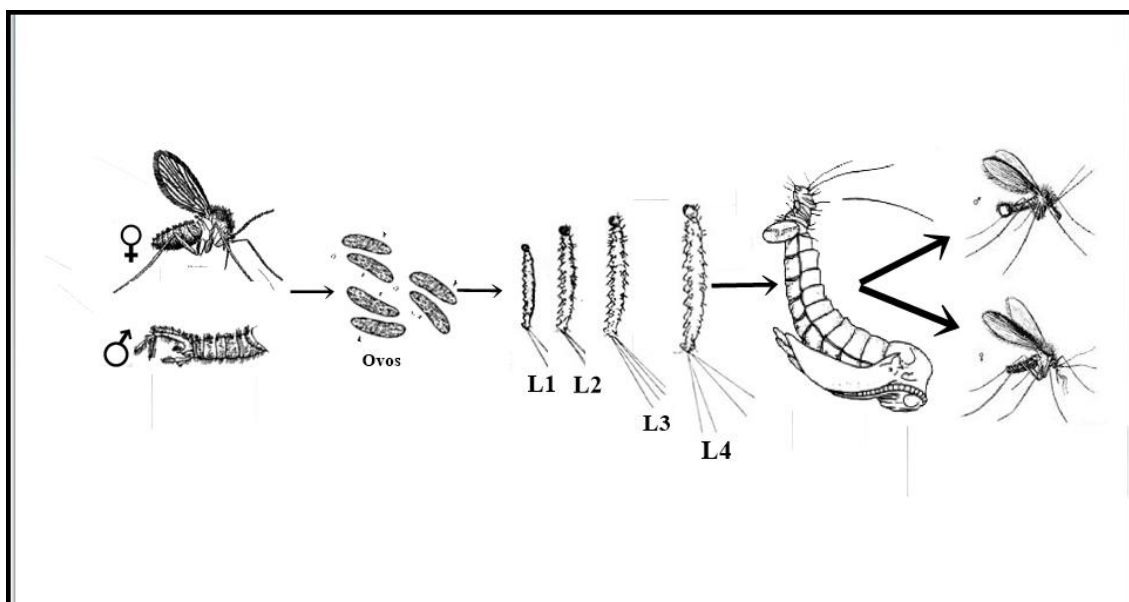


Figura 1. Ciclo de Vida do *L. Longipalpis* modificado.

Seu ciclo biológico possui quatro fases distintas de desenvolvimento, a saber: ovo, larva (dividida em quatro instares distintos), pupa e adulto. (YOUNG DUNCAN, 1994; KILLICK-KENDRICK 1999; MUNSTERMANN, 2004). O tempo de duração de cada estágio de vida depende com a espécie envolvida e/ou condições ambientais (BAHIA, et. al. 2007).

A temperatura para o desenvolvimento dos flebotomíneos encontrasse na faixa de 17°C a 31°C. Apesar de haver uma tolerância na variação destes valores para o desenvolvimento destes insetos, danos significativos nos ovos e larvas têm sido observados (YOUNG DUNCAN, 1994) quando expostos a temperatura acima de 40°C e abaixo de 10°C. São insetos exigentes por ambientes com umidade relativa do ar entre 70 e 80%, no entanto, o solo que apresenta alta umidade impede o desenvolvimento larval e pupal das espécies (LUCIENTES et al. 2005).

As peças bucais dos flebotomíneos são curtas e rígidas, por isso não se alimentam de sangue diretamente nos vasos sanguíneos. Assim, para obterem alimento as fêmeas dilaceram a pele do hospedeiro formando uma poça subcutânea de sangue e restos de tecido que então são ingeridos. Esse processo é chamado de telmatofagia (BATES, 2007).

2.3.2 Características Morfológicas

São insetos, de metamorfose completa, de pequeno porte (Fig. 2), cujo tamanho varia de 1,5 a 3mm, corpo piloso, delgado e diferem-se dos demais dípteros por, principalmente, desenvolverem todo seu estágio larvar em matéria orgânica contida no solo e não em água (BAHIA NASCIMENTO et al., 2010).



Figura 2. Fêmea e macho de *L. longipalpis*

2.3.2.1 Ovos

Após repasto sanguíneo das fêmeas adultas, inicia-se a oviposição em microhabitats terrestres, ricos em matéria orgânica (ALEXANDER, 2000), com um número variável entre 30 e 70 ovos (ALEXANDER, 1994; FELICIANGELI, 2004; MASCARI, 2008), com média em 28 ovos por fêmea (MORALES et al., 2005), o qual tem duração em torno de seis a nove dias (MIRANDA, 1998).

Os ovos possuem uma coloração esbranquiçada no momento da postura, tornando-se acastanhados em pouco menos de um dia, no entanto, antes da eclosão tornam-se turgidos com a ornamentação do exocório bem evidente facilitando a identificação taxonômica (BARRETO, 1941; BAHIA NASCIMENTO et al., 2010).

Do ponto de vista morfológico, são fusiformes de aspecto elíptico, longitudinalmente, com tamanho variando entre 300 a 500 micrometros (μm) e possuem protuberâncias em forma de cristas esculpidas sobre o cório, o qual pode ser útil para a

diferenciação da forma intra e/ou interespecífica (FELICIANGELI et al., 1993; YOUNG e DUNCAN, 1994; SIERRA et al., 2000; OVIEDO e FELICIANGELI, 2007).

2.3.2.2 Larva

A eclosão das larvas ocorre depois de seis a nove dias pós-postura, dando origem a uma pequena, larva de forma cilíndrica e com a cabeça bastante conspícua, como é comum aos insetos do gênero (RANGEL et al., 1986), apresentando coloração esbranquiçada, com uma cápsula cefálica esclerotizada diferenciada do resto do corpo com um par de setas caudais bastante delicadas. (WARD 1985; ALEXANDER, 1994; YOUNG e DUNCAN, 1994; NIEVES e RIBEIRO, 1997; MONTOYA e FERRO, 1999).

Os estágios larvares dos flebotomíneos ocorre fora do ambiente aquático, o que os diferem dos demais psicodídeos, sendo saprófagas, anfipneusticas, do tipo eruciforme (BRAZIL & BRAZIL, 2003). Em geral, são quatro estádios larvares e assim que eclodem já inicia-se a alimentação em matéria orgânica em decomposição.

No entanto, larvas de segundo (L2), terceiro (L3) e quarto (L4) estádios se distinguem por apresentar dois pares de setas no gênero *Lutzomyia*, já as L4 se diferencia, por possuir um esclerito escuro, no dorso do oitavo segmento abdominal (ALEXANDER, 1994; YOUNG e DUNCAN, 1994).

O corpo das larvas de *L. longipalpis* no enquanto L4 está dividido em cabeça, três segmentos torácicos e nove segmentos abdominais (ALEXANDER, 1994; YOUNG e DUNCAN, 1994). Exceto pela cabeça e pelo último segmento abdominal, o tegumento da larva é coberto por pequenos tubérculos, que podem ou não conter espinhos (COSCARÓN et al., 1998).

O último segmento das L4 exibe dois lobos caudais, cada um contendo duas grandes setas (LEITE e WILLIAMS, 1996), tórax saliente. Após um período entre 15 a 20 dias, interrompe a alimentação procurando um local onde abriga-se para evoluir para o estágio pupal (YOUNG e DUNCAN, 1994; MONTOYA e FERRO, 1999).

Possui comportamento de se ancorar no substrato, pelo último segmento abdominal do quarto estágio larval, o que faz assumir a posição ereta (YOUNG e DUCAM 1994).

Apesar do fenômeno da diapausa ocorrer em flebotomíneos (TESH, 1988), o que prolonga a fase larval, o período médio em dias para o desenvolvimento de cada estágio

larval da espécie *Lutzomyia shannoni*, é de 9,6 dias para L1, 9,2 dias para L2, 11,8 dias para L3 e 19,9 dias para L4 (FERRO et al., 1988).

2.3.2.3 Pupa

O período de desenvolvimento da pupa varia em torno de 10 a 20 dias, podendo variar de acordo com as condições de temperatura e umidade. Possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen, com quatro seguimentos ligeiramente fundidos e nove restantes individualizados, respectivamente (YOUNG e DUNCAN, 1994), apresentando tonalidade branco-amarelado, ficando aderida a um substrato até o momento da emergência das formas adultas (FERRO et al., 1998). Durante este período o corpo pupal, realiza apenas movimentos de extensão e flexão.(FORATTINI, 1973).

Quando o adulto está totalmente formado dentro da pupa há o rompimento da bainha através de movimentos contínuos resultando na sua liberação (YOUNG e DUNCAN, 1994; MONTOYA e FERRO, 1999).

2.3.2.4 Insetos na Forma Adulta

Quando adultos, apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos são exclusivamente fitófagos, e as fêmeas, além de ingerirem seiva vegetal também realizam hematofagismo para maturação ovariana e assim prosseguir com a oviposição e manutenção do ciclo biológico (FORATTINI, 1973; BASTOS, 2012). Possuem três pares de pernas longilíneas, asas dispostas em forma de lança, cerdas e tórax, com o corpo quase que completamente coberto por pelos (YOUNG e DUNCAN, 1994; MONTOYA e FERRO, 1999; IBÁÑEZ, 1999; GALATI, 2003).

Apresenta cabeça pequena, posicionada a 90° formando um ângulo reto em relação ao tórax, olhos compostos e suas antenas com 16 segmentos, tanto no macho quanto nas fêmeas (YOUNG e DUNCAN, 1994).

O abdome é composto por dez segmentos, onde os três últimos trazem uma modificação formando a porção genital do inseto, na fêmea, estes segmentos abdominais possuem dois lóbulos como também guias laterais onde são observados por estruturas de forma circular, no macho a modificação observada é através de uma espécie de “armadura” genital constituída por, apêndices aparelhados, úteis durante a cópula (YOUNG E DUNCAN, 1994; GALATI, 2003).

Geralmente, os machos emergem antes das fêmeas, e alcançam sua maturidade sexual após 24 horas. (ALEXANDER, 1994; FERRO et al. 1997).

2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA X FLEBÓTOMÍNEOS

No passado, todas as descrições e observações morfológicas eram feitas por microscopia óptica. A utilização de MEV somente foi iniciada por Killick - Kendrick et al. (1989) ao estudar larvas de *Phlebotomus tobbi* no Velho Mundo. Observando a diferenciação dos espiráculos abdominais e número de papilas torácicas entre as espécies de flebotomíneos. Na América do Sul por Leite e Williams (1996,1997) descreveram com a utilização deste tipo de microscopia larvas de quarto e primeiro estágio de *L. longipalpis*, verificando sua forma, cor dentre outras características morfológicas e estruturais. Na América do Sul, Fausto et al.(1998) e Pessoa et al. (2000) estudaram os espiráculos de flebotomíneos. Onde verificaram que espiráculos tanto torácicos e abdominais estão localizados na parte superior de um bojo globular. A sua estrutura é composta por uma placa espiracular com uma porção central e um esclerotizado porção periférica.

Só foram estudadas, através de seus caracteres morfológicos, algumas espécies de flebotomíneos (GRASSI 1907, SACCÀ 1950, ABONNENC 1956, ABONNENC e LARIVIÈRE 1957, TROUILLET 1976, 1977, 1979). No entanto, com o aumento da atividade na criação e colonização em laboratório de muitas espécies que até então não eram estudadas (KILLICK-KENDRICK et al. 1991), as possibilidades de se realizar um estudo mais detalhado, não só do inseto adulto, mas também de suas formas jovens ovo, larva e pupa (PISTA e EL SAWAF 1986, KILLICK-KENDRICK et al. 1989, ENDRIS et al. 1987, FAUSTO et al. 1992, 1993, FELICIANGELI et al. 1993, RIOS e WILLIAMS, 1995, GHOSH e MUKHOPADHWAY 1996).

A partir de 1965 com o advento da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) muitos taxonomistas e morfologistas, que até o momento não dispunham dessa tecnologia, puderam fazer uso dessa ferramenta útil na observação e análise, visando esclarecer o status taxonômico de alguns complexos de espécies (FAUSTO et al., 2000; ALMEIDA et al., 2004).

Sendo assim, Leite e Williams (1996, 1997) se referiram a prováveis estruturas nas sensilas e no tegumento em antenas e boca de *L. longipalpis*. Já Coscarón et al. estudou algumas estruturas morfológicas de antenas, papilas de palpos maxilares e

cerdas caudal de larvas de quarto instar de flebotomíneos neotropicais através da MEV. Perfil'ev (1968), Abonnenc (1972) e Forattini (1973), descreveram em detalhes a morfologia das larvas de flebotomíneos.

Segundo Abonnenc, (1972); Maroli et al. (1992), até o presente momento, espiráculos das larvas de flebotomíneos têm sido descritos para um número limitado de espécies de flebótomos. Como consequência a não existência de dados disponíveis sobre a ultraestrutura e sua importância taxonômica é um problema latente. De acordo com Zacharuck et al.,1971. Há poucos estudos sobre as estruturas sensorias das formas jovens destes vetores.

Com a utilização de MEV se fez, pela primeira vez, a observação da morfologia detalhada de antenas, papilas de palpos maxilares e cerdas caudais de espécies de larvas de *Lutzomyia* que apresentaram uma variação considerável na forma e posição das antenas.

De acordo com Hanson (1968) quando propõe que: “Nas espécies que escavam em seu meio de alimentação em culturas de laboratório (e provavelmente, no solo, em seu hábitat natural), as antenas são curtas e, em algumas espécies, muito reduzidas em tamanho, em espécies que se alimentam na superfície, no entanto, as antenas são eretas e muitas vezes apresentam tubérculos proeminentes”. Este ainda não detinha a tecnologia da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Segundo Leite e Williams 1997, Secundino e Pimenta 1999 que descrevem as formas jovens, onde as larvas de primeiro estágio L1 de Flebotomíneos se dá através do rompimento de uma espécie de fissura existente na parede do ovo, como se mostra semelhante em outros dípteros, com uso de uma estrutura conhecida como *eggbuster*. Através do MEV visualizamos detalhes da estrutura do órgão perfurador. Esse órgão é apenas encontrado nas larvas de primeira fase, sendo perdido após a muda para as larvas L2. Esta estrutura tem sido utilizada como ferramenta taxonômica para diferenciar as larvas L1 das L2 nos mosquitos e simulídeos (Breland 1959, Alvan-Aguilar & Hamada 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABONNENC E. Sur la morphologie de *Phlebotomus freetownensis* var. *magnus* Sinton, 1932 et de *Phlebotomus freetownensis* var. *sudanicus*, Theodor, 1933, d'après des individus provenat d'élevage. **Archive Institut Pasteur**, Alger 34: 388-399 1956.

ABONNENC E, LARIVIÈRE M. Les formes larvaires de quelques Phlébotomes des régions Méditerranéenne et Ethiopienne. **Archive Institut Pasteur**, Alger 35: 391-403 1957.

AGUIAR, G.M & W.M. Medeiros. Distribuição Regional e Hábitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil, p.207- 255 *In* E.F. Rangel & R. Lainson (org.), **Flebotomíneos do Brasil**, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro. p.368.,2003.

ALEXANDER B, USMA MC. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals Tropical Medicine Parasitol**; Liverpool 88(5):543-9.,1994.

ALMEIDA, D. N., O. R. DA SILVA, B. G. Brazil, and M. J. Soares Patterns of Exchorion Ornaments on Eggs of Seven South American species of *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae). **Journal Medical Entomology**, Honolulu 41: 819-25. 288, 2004.

ALMEIDA, A. B. P. F. Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP. Dissertação (Mestrado). Ciência Veterinária. Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

ALVAN-AGUILAR MA, Hamada N. Larval biometry of *Simulium rubrithorax* (Diptera: Simuliidae) and size comparison between populations in the states of Minas Gerais and Roraima, Brazil. **Memorial Insitute Oswaldo Cruz**. 98: 507-11, 2003.

ARRIVILLAGA J, NAVARRO J, FELICIANGELI D. Morfología y quetotaxia del tagma cefálico larval de *Lutzomyia* França 1924 (Diptera: Psychodidae): Proposición de un sistema de nomenclatura. **Boletín de Entomologia Venezolana**. Caracas v. 14 p. 1-13, 1999.

ASHFORD R. W. - A new morphological character to istinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. **Parassitologia**. Roma v.33 p.79-83. 1991.

AZEVEDO AC, SOUZA NA, MENESES CR, COSTA WA, COSTA SM, LIMA JB, RANGEL EF. Ecology of sand flies (Diptera: psychodidae: phlebotominae) in the north of the state of Mato Grosso, Brazil. **Memorial Insitute Oswaldo Cruz**. Mato Grosso; 97(4): 459-64, 2000.

BAHIA-NASCIMENTO, A.; SECUNDINO, N. F. C. ; MIRANDA, J. C.; PRATES, D. ;SOUZA, A.; FERNANDES, F. F. ; BARRAL, A. ; PIMENTA, P. F. P. - Comparação Ultrastructural da morfologia externa dos estágios imaturos de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) intermedia e *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) whitmani (Diptera: Psychodidae), vetores da leishmaniose tegumentar, por microscopia eletrônica de varredura. **Journal Medical Entomology**, Honolulu 2007 2010.

BARRETO, M.P. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae) São Paulo. Tipografia Rossolito, p162, 1943.

BARRETO MP. Morfologia dos ovos, das larvas e das pupas de alguns flebótomos de São Paulo. **Anais da Faculdade de Medicina** de São Paulo v.17 p.357-532, 1941.

BATES PA. Leishmania Manipulation of sand fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission. **Plos Pathogens** San Francisco; 3(6): 818-25, 2007.

BEJARANO EE, SIERRA D, VÉLEZ ID. Novedades en la distribución geográfica del grupo verrucarum (Diptera: Psychodidae) en Colombia. **Biomédica**. 23: 341-350, 2003.

BEATI, L.; CÁCERES, A. G.; LEE, J. A.; MUNSTERMANN, L. E. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. **Int. Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 2, p. 225-234, 2004.

BELCOUR J. Contribuição para o estudo do desenvolvimento e biologia de formas larvares de flebotomíneos. p 92, 1928.

BRELAND OP. The first instar of *Orthopomyia alba* (Beker) and *Orthopomyia singifera* (Coquillet) with comparative notes (Diptera: Culicidae). **Annals Entomology Society of America**. 137-41, 1959.

CASANOVA, C. A soil emergence trap for collections of phlebotomine sand flies. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**: 96, 237–275, 2001.

CÁCERES A. Distribución geográfica de *Lutzomyia verrucarum* (Townsend 1913) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector de la bartonellosis humana en el Perú. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 35: 485-490, 1993.

CIDEIM. **Manual de Entomologia Médica para Investigadores da América Latina**, 1994.

COUTINHO, J.O., BARRETO, M.P. Dados bionômicos sobre o “*Phlebotomus fischeri*” Pinto, 1926 (Diptera: Psychodidae). **Revista Brasileira Biologia**. São Carlos v.1, p.423–429, 1941.

COSCARÓN S, MANCEBO OA, COSCARÓN-ARIAS CL. The Preimaginal Stages of *Cryptotylus unicolor* (Wiedermann) and *Tabanus Nebulosus ornalventris* Kroeber (Tabanidae - Diptera - Insecte). **Memorial Institute Oswaldo Cruz** v.93 p.91-98, 1998.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** . Brasília, v.43, n.6, p. 733-736, nov./dez, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** Brasília, v. 38 (supl. 1), p. 411-412, 2005.

ENDRIS RD, YOUNG DG, P PERKINS. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). **Journal Medical Entomology**. Honolulu v.24 p.412- 415, 1987.

FAUSTO AM, MAROLI M, MAZZINI M. O. Taxonomy and eggshell structure of *Phlebotomus* sandflies. **Medical and Veterinary Entomology** Oxford v.6 p.201-208, 1992.

FAUSTO AM, MAROLI M, MAZZINI, M. Scanning electron microscopical study of the eggshell of three species of *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae). **Insect Science Application**, Oxford v.14 p.483-488, 1993.

FAUSTO AM, FELICIANGELI MD, MAROLI M, MAZZINI M. Ootaxonomic investigation of Five *Lutzomyia* species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.96, p.197, 2001.

FELICIANGELI MD. Natural Breeding Places of Phlebotomine Sandflies. **Medical and Veterinary Entomology** Oxford v.18: p.71-80, 2004.

FELICIANGELI MD, RODRIGUEZ N, BRAVO A, ARIAS F, GUZMÁN B. Vectors of Cutaneous Leishmaniasis in north-central Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology** Oxford v.8: p.317-324, 1994.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology** Oxford v.18: p.71-80, 2004

FELICIANGELI MD, CASTEJON OC, LIMONGI J. Egg Surface Ultrastructure of Eight New World Phlebotominae sand fly Species (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology** Oxford v.30: p.651-656, 1993.

FERRO C, PARDO R, TORRES M, MORRISON A. Larval Microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) In an Endemic Focus of Visceral

Leishmaniasis in Colombia. **Medical and Veterinary Entomology** Oxford v.34: p.719-728, 1997.

FERREIRA, A.L., P.A SESSA, J.B. VAREJÃO & A. FALQUETO. Distribution of sand flies (Diptera:Psychodidae) at Different Altitudes in an Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.96: p.1061–1067, 2001.

FORATTINI, O.P. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose, Edgar Blucher Editora Ltda. **Entomologia Médica** São Paulo, v. 4., 1973.

GALATI E. Morfologia e Taxonomia dos Flebotomíneos. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz.: p. 23-206, 2003.

GALATI EAB. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. p.53-175. In: Rangel EF, Lainson R (eds.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio do Janeiro.Editora Fiocruz.: p368, 2003.

GALATI EAB. Classificação Morfologia e Terminologia e Identificação de Adultos Vol.I.Apostila Disciplina Hepidemiologia 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae.Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública. USP, Brasil. 2010.

GHOSH KN, MUKHOPADHWAY JA. A Comparison of Chorionic Sculpturing of four Indian Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by Scanning Electron Microscopy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** Liverpool v.3, p.61-68, 1996.

HANSON WS. The Immature Stages of the Subfamily Phlebotomine in Panama (Diptera: Psychodidae), Doctoral Thesis, University of Kansas, Kansas, p.102., 1968.

HANSON W. The immature stages of the subfamily Phlebotominae in Panama (Diptera: Psychodidae). Doctoral Thesis from University of Kansas. Available from: University Microfilms, Ann Arbor, MI. 1968.

IBÁÑEZ BS. Phlebotominae de México. I. Brumptomyia França y Parrot; Lutzomyia França, las especies de *L. (Lutzomyia) França* y del grupo verrucarum. **Folia Entomol Mexicana**. Caracas v.107, p.61-116, 1999.

KILLICK- KENDRICK, R. Phlebotominae vectors of leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology** Oxford v.4: p.1-24, 1990

LEITE ACR, WILLIAM P. Description of the fourth larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microcopy. **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.9, p.571-578, 1996.

LEITE ACR, WILLIAM P. The first instar larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.91, p.571-578, 1997.

LEWIS,D.J.A Taxonomic review of the genys Phlebotomus (Diptera: Psychodidae) **Bulletin of the British Museum (Natural History). Entomology**, London v.45, p. 121-209, 1982.

LUCIENTES J, ANTONIO J, GRACIA MJ, PERIBAÑEZ MA. Flebotomos, de la biología al control. **Revista Electronica de Veterinária**, Espanã 2005.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero Phlebotomus existentes no Brasil. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.4, n.1, p. 84-95, 1912.

MAROLI M., MAZZINI M. - Ootaxonomy and eggshell structure of Phlebotomus sandflies. **Medical Veterinary Entomology** Oxford v.6, p. 201-208, 1992.

MIRANDA JC. Combinação da captura dirigida e PCR na detecção de flebotomíneos naturalmente infectados por *Leishmania*, **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 1998.

MONTOYA-LERMA J, CADENA H, SEGURA I, TRAVI B. Association of *Lutzomyia Columbianana* (Diptera: Psychodidae) with a leishmaniasis focus in Colombia due to species of the *Leishmania mexicana* complex. **Memorial Insitute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.94: p.277-83, 1999.

MUNSTERMANN LE. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: Marquardt, W.C.;Black,WC, Freier JE; Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B,Moore CG. (Eds.). **Biology of Disease Vectors**, Second edition. Elsevier, San Diego, CA. p. 141–151, 2004.

NASCIMENTO, A, C, B. Microanatomia ultraestrutural dos ovos, larvas e órgãos sensoriais de vetores de leishmanioses através da microscopia eletrônica de varredura. **Fundação Oswaldo Cruz**, Centro de Pesquisas René Rachou, Mestrado em Ciências da Saúde. 2006.

OGOSUKU E, PEREZ JE, PAZ L, NIETO E, MONJE J, GUERRA H. Identification of bloodmeal sources of *Leishmania* spp. in Peru. **Annals Tropical Medicine and Parasitology** Liverpool v.88, p.329-335, 1994.

PERFIL'IEV PP. Phlebotominae (sandflies). In: Fauna of the USSR. Israel Program for of Scientific Translations. Jerusalem: Academy of Sciences of USSR. p. 362, 1968.

PIFANO, F. La leishmaniosis tegumentaria em el Estado Yaracuy, Venezuela. **Gaceta Medica. Caracas** Caracas v.48, p.292-299, 1941.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, AZEVEDO ACR, BARBOSA AF, ANDRADE C. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar do Estado do Rio de Janeiro. **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.81(3) p.347-349, 1986.

RASSI, Y.; ALIREZA, S.D.; MOHAMMAD, A.O.; MOHAMMAD, R.A.; FATEMEH, M.; AHMADALI, E.; ZABIHOLAH, Z.; EZATOLDIN, J. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in northwestern Iran. **Experimental Parasitology**. New York., v.131, n.3, p.344-349, 2012.

SACCÀ G. Stadi preimaginali di *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, *P. papatasi* Scop., *P. perniciosus* Newstead (Diptera: Psychodidae). **Rend Istituto Superior Sanità** Roma v.13, p.680-688, 1950.

SIERRA A, Vélez B, Uribe S. Identificación de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo verrucarum por medio de microscopia electrónica de sus huevos. **Revista Biología Tropical** San Jose v48 (2-3) p615-622, 2000.

SHERLOCK I. Sobre alguns *Phlebotomus* e *Brumptomyia* da Colombia (Diptera: Psychodidae). **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.60, p.321-336, 1962.

SHERLOCK IA, SHERLOCK VC. Sobre a infecção experimental de “*Phlebotomus longipalpis*” pela “*Leishmania donovani*”. **Revista Brasileira Biologia** Rio de Janeiro v.2, p.409-418, 1961.

SHERLOCK IA, GUITTON N. Observações sobre a calazar em Jacobina, Bahia III Alguns dados sobre o *Phlebotomineo longipalpis*, O Principal Transmissor. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** Brasilia v.21, p.541-548, 1969.

SHIMABUKURO, P.H.F.; TOLEZANO, J.E.; GALATI, E.A.B. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo**. v.51, p.399-441, 2011.

TROUILLET J. *Sergentomyia (Grassomyia) ghesquierei* Parrot 1929 (Diptera, Phlebotomidae). Etude morphologique des stades pré-imaginaux et notes bio-écologiques. Cah ORSTOM Ser **Journal Entomol Medicine Parasite** London v.14, p.347-356, 1956.

TROUILLET J. *Sergentomyia (Sergentomyia) bedfordi firmatus* Parrot et Malbrant, 1945 et *Sergentomyia (Sergentomyia) bedfordi medius* Kirk et Lewis, 1950 (Diptera, Phlebotomidae). Etude morphologique des stades pré-imaginaux et notes bio-écologiques. **Annalises Parasitologie Humaine et Comparee**, Roma v.52, p.35-52, 1977.

ZACHARUCK RY, BLUE SG. Ultrastructure of the peg and hairsensilla on the antenna in larval of *Aedes aegypti*. *J Morph* v.135, p.433-456, 1971.

ZACHARUCK RY, RU-SIU L, BLUE SG. Fine structure of the antenna and its sensory cone in larvae of *Aedes aegypti*. v.135, p.273-298, 1971.

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). **Memoirs of the American Entomological Institute**. Gainesville v.54, p.1-81, 1994.

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). **Memoirs of the American Entomological Institute**. Gainesville v.54, p.1-81, 1994.

YOUNG, D.G. A Review of the Bloodsucking Psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoacinae). **Technical Bulletin Agriculture Experimental Station, IFAS**, Univ. Florida, Gainesville. v.806, p.226 1979.

WARD R. D. A revised numerical chaetotaxy for neotropical Phlebotomine sandfly larvae (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**. Oxford v1, p.89-94, 1976.

WARD, R. D. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v.66, p.718-723, 1972.

WARD R.D . Some observation on the biology and morphology of the immature stages of *Psychodopygus Wellcomei* Fraiha, Shaw and Laison, 1971. (Diptera: Psychodidae). **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.70, p.15-28, 1972.

WARD, R. D., and P. A. Ready. Chorionic sculpturing in some sand flies from Brazil (Diptera:Psychodidae). **Journal Entomology**, Honolulu v.50, p.127-134 1975.

WARD R.D. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sexpheromone? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** Liverpool v.79, p.225-229, 1985.

2.5 OBJETIVOS

2.5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação através da microscopia eletrônica de varredura da morfologia de formas imaturas e adultas de *Lutzomyia longipalpis* procedentes do campo e de colônias em laboratório

2.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

* Analisar a morfologia externa de formas imaturas de colônias de laboratório de *Lutzomyia longipalpis* através da utilização da microscopia eletrônica de varredura.

* Analisar a morfologia externa de espécimes adultos de *Lutzomyia longipalpis* através da utilização da microscopia eletrônica de varredura.

ARTIGO 1

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EXTERNA DE FORMAS IMATURAS
DE *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (DIPTERA:
PSICHODIDAE).**

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EXTERNA DE FORMAS IMATURAS
DE *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (DIPTERA:
PSICHODIDAE)**

**EXTERNAL ULTRAESTRUTURAL ANALYSIS OF THE IMMATURE
STAGES OF *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (DIPTERA:
PSICHODIDAE)**

Resumo

Lutzomyia longipalpis é um díptero de importância médico veterinária por ser a fêmea desta espécie responsável por hospedar o protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, e assim atuar como vetor da leishmaniose visceral americana. Dentre as mais de 260 espécies encontradas no Brasil, o *L. longipalpis* é o mais estudado mediante sua importância. No entanto, as formas imaturas deste vetor só foram estudadas de forma breve com uso da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como também foram observadas características do ovo no seu exocório. Objetivou-se com esta pesquisa estudar as formas jovens de *L. longipalpis* com auxílio da MEV e realizar comparação morfológica de formas imaturas deste vetor oriundas de colônias. Para observação em MEV, foram utilizados as formas jovens (ovo, larvas: L, L2, L3 e L4) em número de 05 (cinco) por fase do flebótomo, adquiridos no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí, onde foram postos em eppendorfs com cerca de 1 (um) ml da solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico, metalizadas com ouro e levadas para análise em microscópio JEOL-5600LV para análises das imagens obtidas, e estudo morfométrico das formas jovens e adultas.

Palavras chave: Saúde Pública, Protozoário, Leishmaniose Visceral, Microscopia Eletrônica.

Abstract

Lutzomyia longipalpis is a Diptera of veterinary importance whose the female of the species is responsible for hosting the protozoan *Leishmania (Leishmania) chagasi*, and thus act as a vector of American visceral leishmaniasis. Among more than 260 species found in Brazil, the sand fly is the most studied by its importance. However, the immature forms of this vector has only been studied briefly with use of the electron microscope (SEM), as were also egg characteristics observed in its exochorion. This study aimed to study the young forms of *L. longipalpis* with the aid of SEM and to perform morphological comparison of immature and adult forms of this vector derived from colonies and nature. For observation in SEM, young forms were used (egg, larvae: L, L2, L3 and L4) in number of five (05) per phase of the sandfly, acquired in Laboratório de Sanidade Animal of the Universidade Federal do Piauí, where the samples were placed in eppendorfs with about one (1) ml of fixative solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 and post-fixed in osmium tetroxide (OsO₄) to 2%. Subsequently, samples were submitted to drying by the critical point method, metallized with gold and taken for analysis at JEOL-5600LV microscope for analysis of the images obtained, and morphometric study of young and adult forms.

Keywords: Public Health, Protozoan, Visceral Leishmaniasis, Eletronic Microscopy.

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são dípteros holometábolos, de pequeno porte, cujo tamanho varia de 1,5 a 3 mm, corpo piloso e delgado, diferem-se dos demais dípteros por, principalmente, desenvolverem todo seu estágio larvar em matéria orgânica contida no solo e não em água (BAHIA NASCIMENTO et al., 2010), apresentando grande importância médica em função da transmissão de vários agentes patogênicos aos animais e ao homem, particularmente as leishmanioses (ALEXANDER, 2000; NASCIMENTO, 2006; DANTAS-TORRES, 2009; RASSI et al., 2012).

Seu tamanho reduzido e poucas diferenças entre as espécies levaram os pesquisadores a estudar detalhes morfológicos (YOUNG e DUNCAN, 1994) particularmente os segmentos da antena, morfologia dos ascóides, dos palpos, do lábio, extensão da sutura interocular, cibário em fêmeas, presença ou não de espinhos femurais, genitália masculina, genitália feminina (ADLER e THEODOR 1926; CACERES, 1993) nos estudos envolvendo a taxonomia.

Galati (2003) valorizou a presença das cerdas ao longo do corpo para uma melhor classificação das espécies existentes. Entretanto para os estágios imaturos de flebotomíneos a chave descrita por Young e Ducan, (1994) ainda permanece imutável.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem sido utilizada desde 1975 por vários taxonomistas, a fim de descrever em características ornamentais do exocório de ovos em espécies de flebotomíneos (WARD e READY, 1975) e morfologia de estádios larvais L1 e L4 de *Lutzomyia longipalpis* (Leite et al., 1991; LEITE e WILLIAM 1996; 1997; SECUNDINO e PIMENTA, 1999).

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi analisar a morfologia externa de formas imaturas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de colônias de laboratório através da MEV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colônia de Flebótomos

Foram obtidos estágios imaturos de *Lutzomyia longipalpis* em todas as fases de desenvolvimento, provenientes da colônia do Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), localizado no Centro de Ciência Animal (CCA) na Universidade Federal do Piau (UFPI).

Os insetos foram mantidos em colônia com temperatura variando entre 25 a 30°C e a umidade relativa do ar entre 60 a 80%, os quais foram constantemente aferidos com uso de termômetro e higrômetro. Após a oviposição a umidade relativa dentro dos potes plásticos foi controlada através da adição de água destilada.

Após a eclosão e surgimento das larvas, estas foram mantidas com uma mistura de alimento industrializado, fezes de coelho, húmus e ração para peixes ornamentais até o surgimento das pupas. Os adultos emergidos foram transferidos para as gaiolas de nylon e alimentados inicialmente com solução de sacarose 30% e posterior repasto sanguíneo das fêmeas.

2.2 Coleta e processamento das Amostras

Vinte espécimes de cada estágio imaturo (ovo, Larva 1, L₂, L₃, L₄ e pupa) foram obtidos da colônia mantida em laboratório, e foram fixadas em solução de glutaraldeído tamponada a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e mantidas sob temperatura de refrigeração entre 4° - 6°C e encaminhadas para o laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) onde foram submetidas ao processamento da MEV.

As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 2%, em temperatura ambiente e no escuro por 24 horas, em seguida foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool (70, 80,90 e 100%) e submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico com CO₂. Posteriormente, foram montadas em suportes metálicos, utilizando fita dupla face. Estes foram metalizados com banho de ouro e posteriormente submetidos à análise em microscópio JEOL-5600LV (BORGES et al., 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente cortes semifinos do estágio imaturo de *L. longipalpis* evidenciaram ovos de formato elíptico e alongado, com média de comprimento de 400µm e largura 110µm, sendo observado no exocório cristas arranjadas longitudinalmente em fileiras paralelas, com estruturas palisádicas individualizadas com diâmetro de 300µm (Figura 1a), sem conexão ao exocório (Figura 1b), pequenos tubérculos em toda superfície

dos ovos (Figura 1c) além da presença de material de consistência viscosa aderida aos ovos de todas as amostras de *L. longipalpis* (Figura 1d).

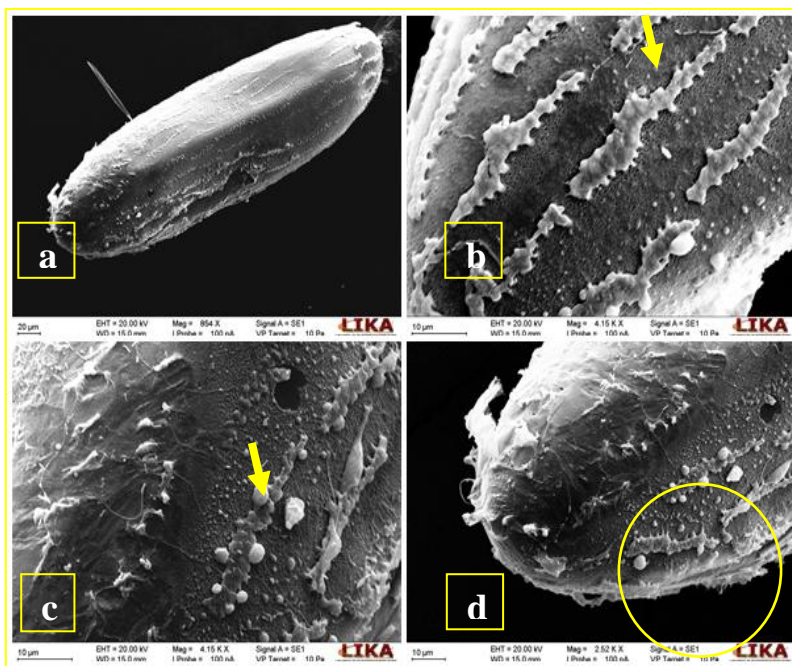


Figura 1: Eletromicrografias de ovos de *Lutzmyia longipalpis* obtidas de colônias de laboratório. (a) Visão Geral do ovo; (b) Detalhamento do corion evidenciando as cristas paralelas não conectadas; (c) Presença de tubérculos ao longo da estrutura; (d) Vista frontal do ovo, mostrando material de consistência viscosa aderida aos ovos.

Segundo Costa et al., (2012) a ocorrência de cristas de aspecto longitudinal sem conexão ao exocório é uma característica comum aos flebotomíneos.

Não obstante a disposição destas cristas podem representar estruturas adaptativas que facilitam a postura de ovos em distintos ambientes (WARD e READY, 1975; ENRIQUE PEREZ e OGUSUKU, 1997) ou ainda refletir relações filogenéticas entre as espécies (ENDRIS et al. 1987, FELICIANGELI et al. 1993, ENRIQUE PEREZ e OGUSUKU 1997, FAUSTO et al. 2001).

Por outro lado este padrão morfológico aqui observado tem sido utilizado como ferramenta na identificação de diversas espécies de flebotomíneos (ZIMMERMAN et al., 1977; FAUSTO et al. 1992; ROGO et al., 1992;; GHOSH e BHATACHARYA 1993, SIERRA, VELEZ, URIBE, 2000; ALMEIDA et al., 2004).

Com relação à substância aderida a superfície dos ovos aqui observada, está em concordância a descrição de Forattini (1973), onde assegura que os ovos dos flebotomíneos são revestidos individualmente com material impermeável de consistência viscosa aderente que tem a função de ajudar a fixação dos ovos aos substratos (RANGEL e LAISON, 2003).

No que concerne às pequenas projeções ou tubérculos com distribuição aleatória ao longo do exocório não seguindo uma padronização definida, por toda superfície dos ovos aqui observados, deve se tornar útil para diferenciação morfológica dos ovos de *L. longipalpis*, assim como foi, descrito por Costa et al., (2012) um padrão definido destas projeções que ajudou na diferenciação entre outros espécimes tais como: *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai*.

A análise ultraestrutural das larvas de primeiro estágio de *L. longipalpis*, revelaram mensuração média de 1,5 mm, apresentando cabeça proeminente quanto ao resto do corpo de coloração escura esclerotizada e aspecto vermiforme, ápodas, medindo, em média, cerca de 40 µm, apresentando um par de cerdas caudal, além de revestimento elíptico da cápsula cefálica compostos com espinhos distribuídos irregularmente na porção lateral da cabeça. (Figura 2).

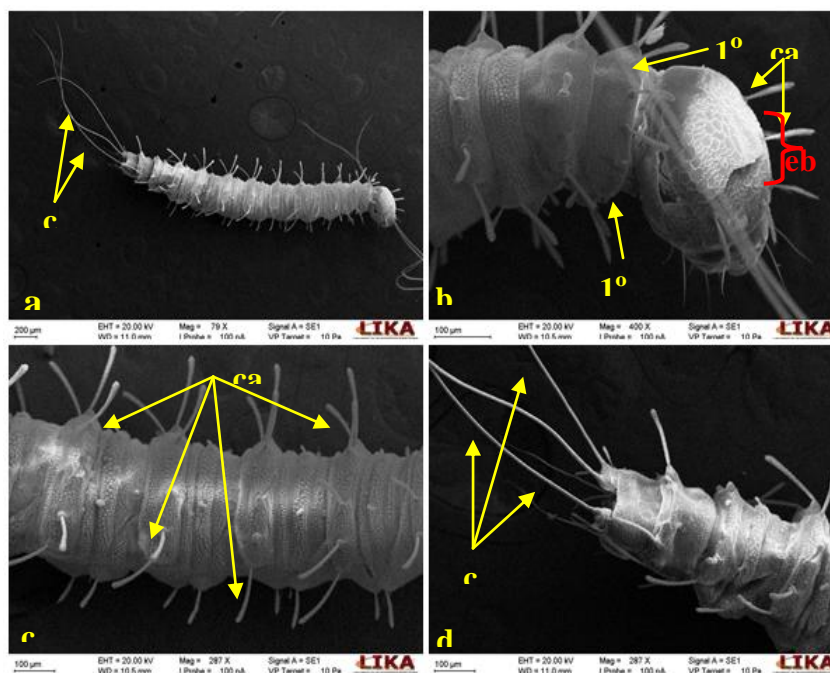


Figura 2: Eletromicrografias da larva em primeiro estágio: (a) Visão geral da larva de primeiro estágio de *L. Longipalpis* evidenciando as cerdas caudais (cc), (sa) segmentos abdominais, (st) segmentos do tórax, (cab) cabeça; (b) Detalhamento da parede frontal da larva do primeiro estágio: (eb) *Egg buster*, (1°tg) primeiro tergito e primeiro esternito (1° est), espinhos na capsula cefálica (quadrado), mandíbula, cerda antenal, cerdas. (c) Segmentos abdominais, cerdas; (d) cerdas caudais.

Através do MEV tornou-se possível visibilizar o *Egg Buster*, que é apenas encontrado nas larvas de primeira fase. Esta estrutura tem sido utilizada como ferramenta taxonômica para diferenciar as larvas L1 das L2 de outros insetos (BRELAND 1959, ALVAN-AGUILAR e HAMADA, 2003).

A visibilização do *Egg Buster* nas larvas de 1° estágio de *L. longipalpis* está compatível com a descrição de Leite e Williams, (1997); Secundino e Pimenta, (1999);

Pereira et al, (2006) que assinalaram a presença desta estrutura na região dorsal da cabeça de flebotomíneos, que utilizam, dessa estrutura para auxiliar no rompimento do ovo e eclosão das larvas.

Os estádios 2º, 3º e 4º apresentaram estruturação idêntica, variando apenas de tamanho.

As larvas de segundo estágio apresentaram-se com tamanho ligeiramente maior em relação às de 1º estágio, com destaque para cabeça, em relação aos segmentos corpóreos (em número de nove) bem individualizados e podendo ser observados. Além de já possuírem o segundo par de cerdas caudais como também cerdas tricóides e filiformes, que são inclusões epidérmicas responsáveis pelo senso tátil, e que estão distribuídas em grande número ao longo do corpo da larva (Figura 3).

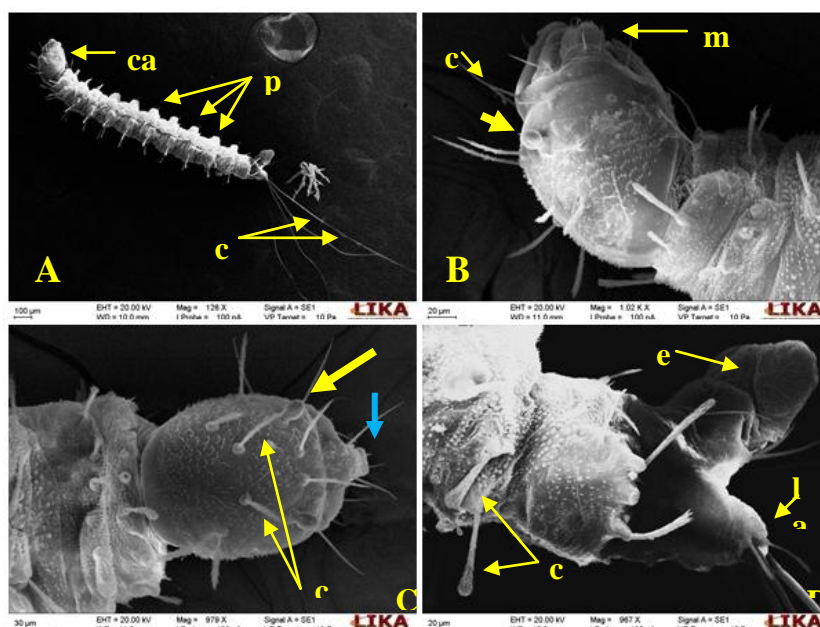


Figura 3: Eletromicrografia de larvas de 2º estágio de *L. longipalpis* obtidas de colônias de laboratório (A) Visão geral da larva de *L. longipalpis* em seu segundo estágio de crescimento, evidenciando cabeça, pseudo-pés e cerdas caudais. (B) Mandíbula, cerdas em forma de gota (seta maior). (C) Cerdas tricóides, mandíbula (seta azul). (D) Vista terminal: cerdas, espiráculo anterior respiratório, (la) lobo anal

De acordo com Barreto, 1941 estas cerdas podem variar em número de 160 a 210 em toda sua extensão.

Seguindo o padrão de crescimento da espécie, em larvas de terceiro estágio pode-se observar na cabeça o surgimento de cerdas tricóide e filiforme, aparelho bucal totalmente desenvolvido com mandíbulas pronunciadas (Figura 4).

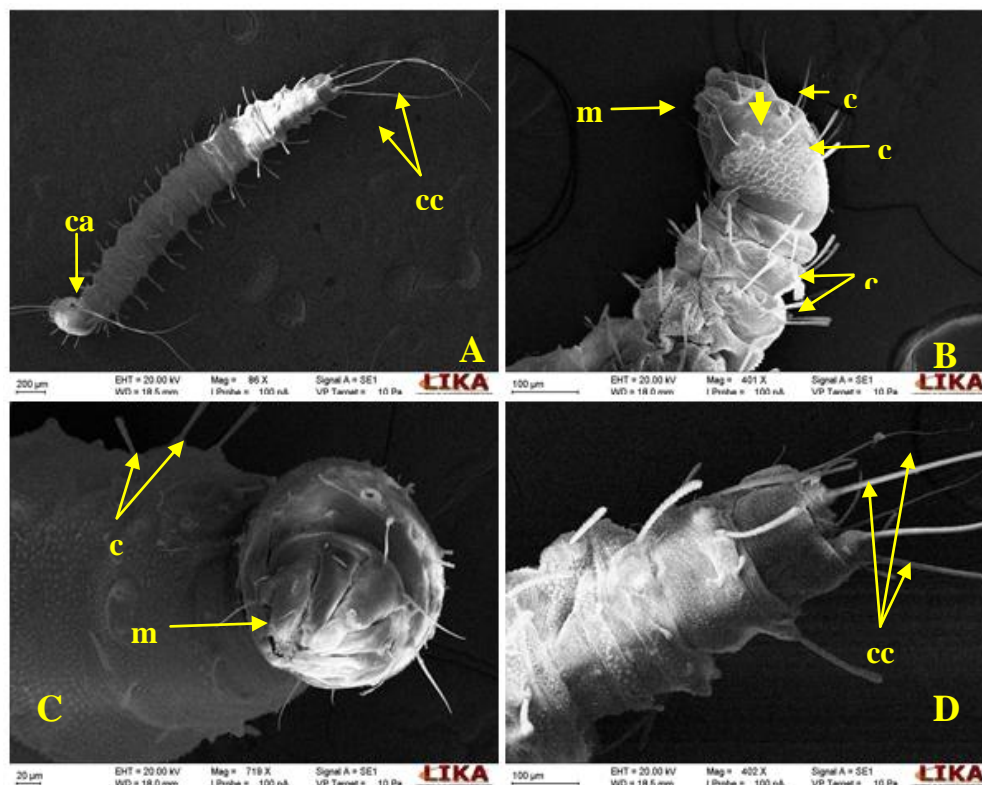


Figura 4: Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *L. longipalpis* obtidas de colônias de laboratório. (A) Visão Geral da larva de terceiro estágio de *L. longipalpis* (cab) Cabeça, (cc) Cerdas caudais, (B) (ma) Mandíbula, (ct) Cerdas tricóides, (cf) Cerdas filiformes, (C) Cerdas corporais; (C) (ma) Mandíbula, (C); (D) (cc) Cerdas caudais.

No quarto estágio larval, foram visibilizadas mandíbula, cerdas filiformes e tricóides, cerdas corporais em número variável, cerdas em forma de gota presentes na face frontal da cabeça apresentando pequenas cerdas presentes nos segmentos abdominais, com exceção da maxila e da mandíbula (Figura 5. Tanto nas superfícies, dorsal quanto à torácica, juntamente com o sétimo segmento abdominal foi observado áreas isoladas e sem cerdas, ao longo do corpo larval estas cerdas se distribuem de forma a lembrar “escovas” pela ordenação destas no segmento, além de presença de cerdas tricóides e filiformes na face frontal da cabeça e na sua parte posterior onde são cobertas por pequenos espinhos.

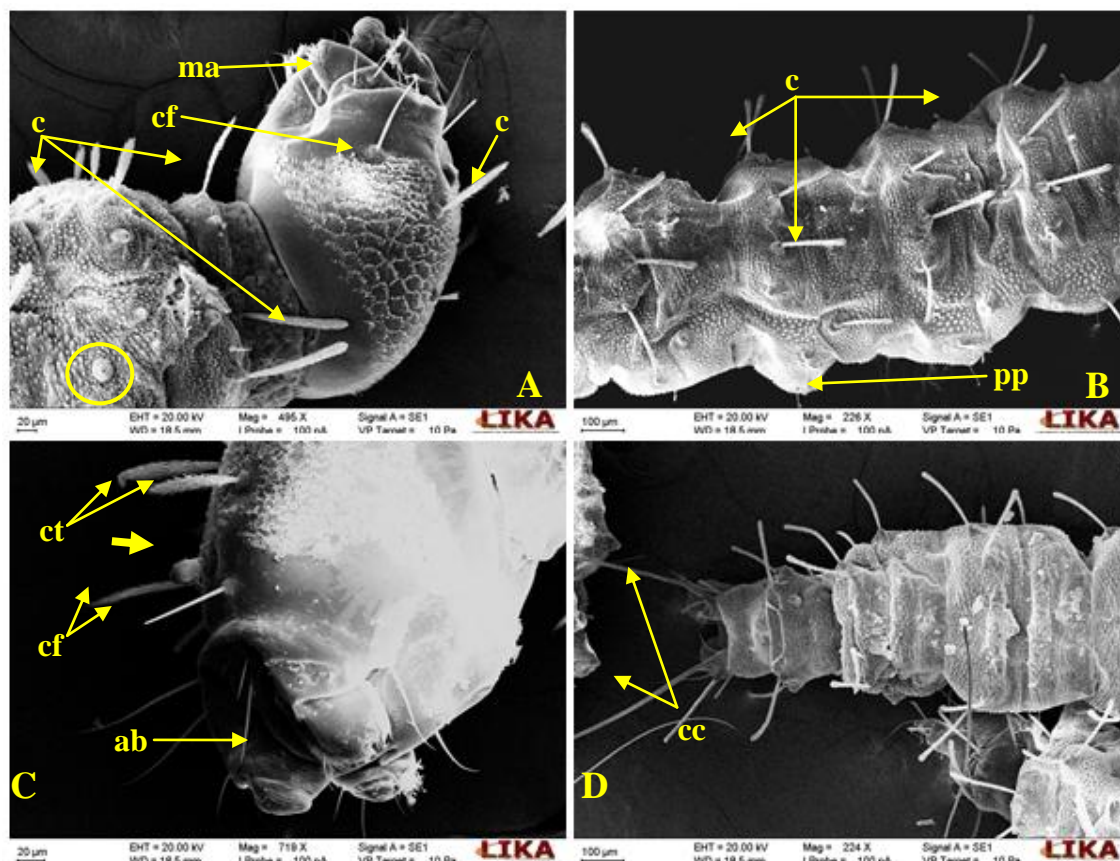


Figura 5: Eletromicrografia de larvas de 4º estágio de *L. longipalpis* obtidas de colônias de laboratório. (A) Visão lateral do primeiro segmento torácico e cabeça, evidenciando: (ma) mandíbula, (cf) cerdas filiformes, (ct) cerdas tricóides, (c) cerdas corporais, tubérculos (círculo). (B) (cc) Cerdas corporais, (pp) Pseudo-pés. (C) Cerdas tricóides, cerdas filiformes, Cerdas em forma de gota (seta maior), (ab) aparelho bucal. (D) Cerdas caudais.

Inúmeros estudos das formas imaturas de *L. longipalpis* foram amplamente realizados (LEITE et al., 1991), LEITE e WILLIAMS 1996,1997; SECUNDINO e PIMENTA, 1999), cujo resultados mostraram que apenas larvas de primeiro estágio de crescimento possui diferenças significativas em detrimento aos estádios subsequentes, principalmente pela presença da estrutura *Egg Buster*, bem como, através do tamanho das antenas e o número de cerdas caudais.

Durante o estudo não foi encontrado nenhuma estrutura variante aos demais estádios larvares analisados com o uso da MEV. Levando-se a crer que, os instares, segundo e terceiro serem idênticos estruturalmente ao quarto, havendo variação apenas em tamanho.

Com a observação e análise das imagens microestruturais obtidas pela MEV da estrutura pupal (Figura 6) foi observado a exúvia larval, a qual é formada pela transformação do último segmento do abdome que serve como estrutura fixadora da pupa no substrato, como também foi possível verificar o desenvolvimento das antenas,

pernas, asas e segmentos abdominais do inseto adulto em formação, além de uma fina cobertura de espículas.

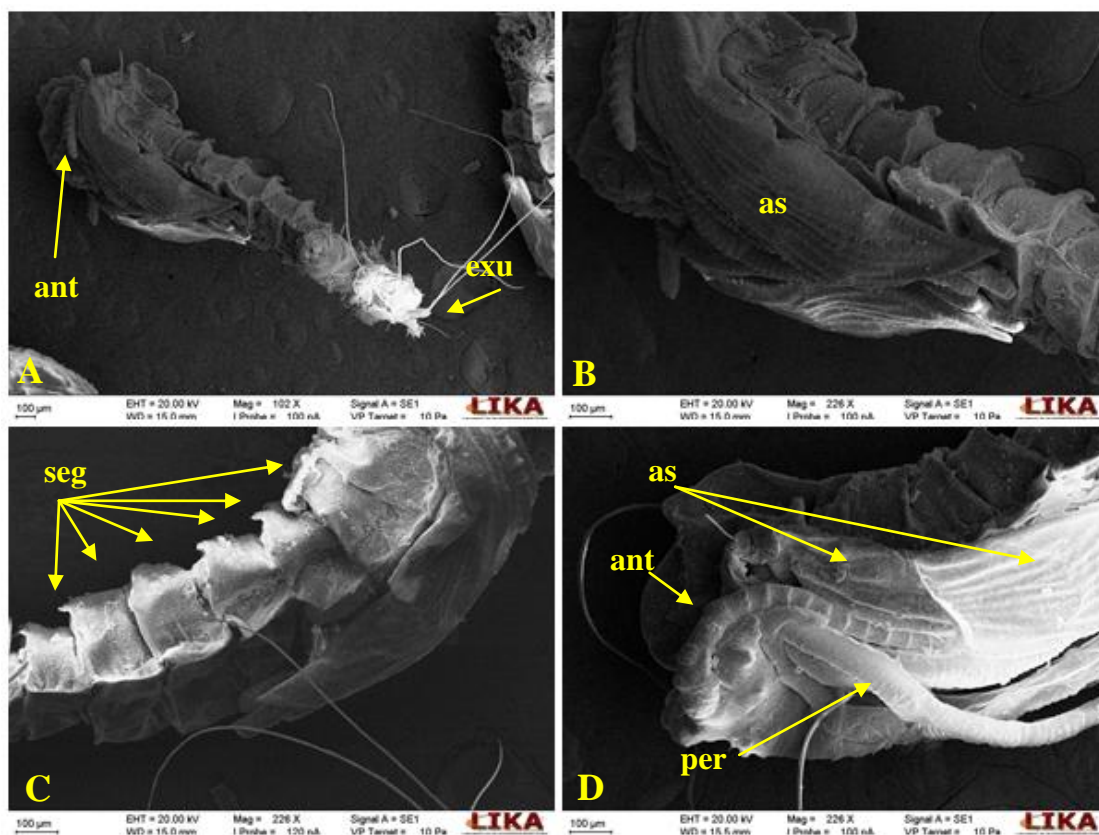


Figura 6: Eletromicrografia de pupas de *L. longipalpis* obtidas de colônias de laboratório. (A) Vista Geral da pupa de *L. longipalpis*, exu: exuvia larval; (B) Vista lateral, (A) Ant: Antena; (C) Segmentos do corpo; (D) as: asas, ant: antenas, per: perna.

Os resultados aqui encontrados estão de acordo com Leite et al. (1991) que visibilizaram as estruturas em formação do adulto (antenas, patas e asas).

4. CONCLUSÃO

As formas imaturas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de colônias de laboratório mantiveram o padrão morfológico da espécie nas diferentes fases de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. and THODOR, O. The mouthparts, alimentary tract and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. **Annals Tropical Medicine Parasitology**. v.20, p. 109-142.

ALMEIDA, D. N. OLIVEIRA, R. S., Brasil, B. G. Soares, M. J. Patterns of Exochorion Ornaments on Eggs of Seven South American Species of *Lutzomyia* Sand Flies (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology** Honolulu v.41(5), p.819-825, September, 2004.

ALEXANDER B, USMA MC. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals Tropical Medicine Parasitology** Liverpool v.88(5):543-9, 1994.

ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.

BAHIA-NASCIMENTO, A.; SECUNDINO, N. F. C. ; MIRANDA, J. C. ; PRATES, D. SOUZA, A.; FERNANDES, F. F. ; BARRAL, A. ; PIMENTA, P. F. P. Ultrastructural comparison of the external morphology of the immature stages of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu 2007 2010.

BARRETTO MP. Morfologia dos ovos, larvas e pupas de alguns flebótomos de São Paulo. **Anais Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo** v.17, p.356-427, 1941.

BORGES, R.A., ARRUDA, W. OLIVEIRA, E.S.F.,CAVASIN, G.M.; SILVA, H.H.G. SILVA, I.G. Mecanismos de Ação Larvicida do Diflubenzuron sobre *Aedes aegypti*, evidenciadas Pelas Alterações Ultrasestruturais. **Revista de Patologia Tropical**. Goiania v.41, n. 2, p. 222-223, 2012.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**., Brasília, v.43, n.6, p.733-736, nov./dez, 2010.

ENRIQUE PEREZ, E. J., AND E. OGUSUKU. Chorion patterns on eggs of *Lutzomyia* sand flies from the Peruvian Andes. **Medicine Veterinary. Entomolgy**. v.11, p. 127 - 133, 1997.

FAUSTO AM, Feliciangeli MD, Maroli M, Mazzini M. Ootaxonomic investigation of Five *Lutzomyia* species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.96, p.197, 2001

FELICIANGELI MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical Veterinary Entomology**. Oxford v.18, p.71-80, 2004.

GUITTON N, SHERLOCK IA. Descrição das fases imaturas do *Phlebotomus longipalpis* Lutz e Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). **Revista Brasileira de Biologia**. São Carlos v.29, p.383-389, 1969.

HARVEY D J. Higher classification of the Nymphalidae. Appendix B, p.255-273. In Nijhout H F (ed) The development and evolution of butterfly wing patterns. Washington, **Smithsonian Institution**, p.297, 1991.

MASCARI, T.M., MITCHELL, M.A., ROWTON, E.D. and Foil, L.D. Ivermectin as a rodent feedthrough insecticide for control of immature sand flies (Diptera: Psychodidae). **Journal of the American Mosquito Control Association** Fresno Ca v.24, p. 323-326, 2008.

LEITE ACR, WILLIAM P Description of the fourth larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microscopy. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.9, p. 571-578, 1996.

LEITE ACR, WILLIAM P The first instar larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.91, p.571-578, 1997.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 4, n.1, p. 84-95, 1912.

MANGABEIRA O. 8ª contribuição ao estudo dos *Phlebotomus* (Diptera:Psychodidae) *Phlebotomus (Brumptomyia) avellari* Costa Lima,1932. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.37, p.225-240, 1942a.

MANGABEIRA O. 9ª contribuição ao estudo dos *Phlebotomus* (Diptera:Psychodidae) *Phlebotomus (Pressatia) triacanthus* Mangabeira, 1942. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.37, p.241-250,1942b.

MANGABEIRA O. 10ª contribuição ao estudo dos *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) *Phlebotomus longispinus* Mangabeira, 1842. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.37, p.251-257, 1942c.

MANGABEIRA O. 11ª contribuição ao estudo dos *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) *Phlebotomus oswaldoi* Mangabeira, 1942. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.37, p.287-295,1942d.

MANGABEIRA O. 13ª contribuição ao estudo dos *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) *Phlebotomus (Brumptomyia) travassosi* Mangabeira, 1942. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.37 p.375-381,1942e.

Mangabeira O, Sherlock IA. Sobre o *Phlebotomus brasiliensis* Costa Lima, 1932 (Diptera: Psychodidae). **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.60, p.311-319, 1962.

NASCIMENTO, A, C, B. Microanatomia ultraestrutural dos ovos, larvas e órgãos sensoriais de vetores de leishmanioses através da microscopia eletrônica de varredura. **Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou**, Tese de Mestrado em Ciências da Saúde.2006.

RASSI, Y.; ALIREZA, S.D.; MOHAMMAD, A.O.; MOHAMMAD, R.A.; FATEMEH, M.; AHMADALI, E.; ZABIHOLAH, Z.; EZATOLDIN, J. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in northwestern Iran. **Experimental Parasitology**. New York. v. 131, n. 3, p. 344-349, 2012.

ROGO LM, KOKWARO ED, MUTINGA MJ, KHAMALA CP. Differentiation of vector species of phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Kenya by chorionic sculpturing of their eggs. **Journal of Medical Entomology** v.29, p. 1042-1044, 1992.

SECUNDINO, N. F. C. & PIMENTA, P.F. P. Scanning Eletron Microscopic Study of the Egg and Immature Stages of the Sandfly *Lutzomyia longipalpis* – **Acta Microscopia**. London v.8 (2) 33-38, 1999.

SHERLOCK IA. Sobre o “*Phlebotomus lenti*” Mangabeira, 1936 (Diptera: Psychodidae). **Revista Brasileira de Biologia** Rio de Janeiro v.17, p.77-88, 1957a.

SHERLOCK IA, CARNEIRO M. Descrição das fases imaturas de *Phlebotomus bahiensis* Mangabeira & Sherlock, 1964 (Diptera: Psychodidae). **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.61, p.491-494, 1963.

SIERRA D, URIBE S, VELEZ ID. Egg surface ultrastructure of New World phlebotomine sandfly *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae), **Second International Symposium on Phebotomine Sand Flies**, Mérida, Venezuela, p. 96. 2000.

WARD RD. Some observations on biology and morphology of the immature stages of *Psychodopygus wellcome* Fraiha, Show and Lainson, 1971 (Diptera: Psychodidae). **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.70, p.15-28,1972.

WARD, R. D., and P. A. READY. Chorionic sculpturing in some sand flies from Brazil (Diptera:Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. Honolulu v.50, p.127-134, 1975.

WARD RD. A revised numerical chaetotaxy of neotropical phlebotomines sandfly larvae (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology** Oxford v.1, p.89-94, 1976a.

WARD RD. The immature stages of some Phlebotominae sandflies from Brazil (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology** Oxford v.1, p.227-240, 1976b.

ARTIGO 2

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE ESPÉCIMES ADULTOS DE *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ E NEIVA, 1912) (DIPTERA: PSICHODIDAE)

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE ESPÉCIMES ADULTOS DE *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ E NEIVA, 1912) (DIPTERA: PSICHODIDAE)

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF ADULT STAGES SPECIMENS OF *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ AND NEIVA, 1912) (DIPTERA: PSICHODIDAE)

Resumo

Inúmeros estudos já foram realizados com enfoque nos estágios imaturos do inseto vetor da leishmaniose visceral americana no Velho e Novo Mundo. Suas características morfológicas e ultraestruturais são amplamente investigadas. No entanto, existe pouca informação sobre os insetos adultos. Foram estudados insetos machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em duas diferentes cepas. Exemplares coletados no campo, com uso de armadilhas tipo CDC (Center of Diseases Control) postas ao entardecer e coletadas ao amanhecer, visando o maior período de atividade do inseto, e oriundo de colônia em laboratório. Através do processamento e obtenção das imagens micrográficas, foram analisadas de forma sistemática algumas estruturas relevantes para angariar informações a respeito desse vetor.

Palavras chave: Saúde Pública, Vetor, Diagnóstico.

Abstract

Numerous studies have been conducted focusing on the immature stages of the insect vector of the American visceral leishmaniasis in the Old and New World. The morphological and ultrastructural features are thoroughly investigated. However, there are little informations about the adult insects. The male and female insects of *Lutzomyia longipalpis* were studied in two different strains. Samples collected in the field, using CDC (Center of Disease Control) traps putted at dusk and collected at dawn, aiming the greatest insect activity period, and come from colony in the laboratory. Through processing and obtaining of micrographic images, were systematically analyzed some relevant structures to gather information about this vector.

Keywords: Public Health, Vector, Diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são dípteros pequenos, frágeis, que possuem o corpo coberto por finas cerdas e quando em repouso mantém as asas em posição semieretas, além de darem voos em curtos saltos e raramente voam para distante de seus abrigos (CHANIOTS et al., 1974; KILLICK-KENDRICK, 1999; MUNSTERMANN, et al., 2004).

Esses dípteros possuem plasticidade alimentar, pois em ambiente peridomiciliar encontram condições adequadas para o seu desenvolvimento, criadouro e fonte alimentar, passando a se adaptar aos ambientes antrópicos estabelecendo um ciclo de transmissão peridomiciliar (ASFORD, 1991; SHAW, 2007; LAINSON e RANGEL, 2003; 2007) e intradomiciliar em áreas urbanas (LAINSON e RANGEL, 2005).

Em colônias, os flebotomíneos adultos vivem aproximadamente vinte e sete dias em laboratório (PESSOA e MARTINS, 1978), enquanto que em no ambiente natural o seu tempo de vida não ultrapassa quinze dias (BAHIA, et. al., 2007).

A estrutura externa dos flebotomíneos adultos tem sido utilizada para identificação e estudos morfoestruturais com o uso do microscópio eletrônico de varredura, o qual possibilita a visibilização de características e detalhes (NASCIMENTO, 2006).

Portanto, este trabalho teve como objetivo, analisar a ultraestrutura de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de colônias e de ambiente natural.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de Flebotomíneos Adultos de Campo

Os insetos adultos, de ambos os sexos de foram obtidos com o uso de armadilhas tipo CDC, colocadas no peridomicílio onde se mantinha uma criação de suínos. Após captura, os flebotomíneos, foram encaminhados ao Laboratório de Sanidade Animal LASAN/CCA/UFPI da Universidade Federal do Piauí. Após a identificação, um total de 20 espécimes de machos e fêmeas foram fixadas em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% tamponada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e mantidas sob temperatura de refrigeração 6°C.

2.2 Processamento das Amostras

Os insetos obtidos foram encaminhados para o Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), onde foram submetidos a estudos em microscópio eletrônico de varredura.

Espécimes de machos e fêmeas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%, em temperatura ambiente e no escuro por 24 horas, em seguida foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Assim sendo as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool (70, 80,90 e 100%) e submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico com CO_2 . Posteriormente, foram montadas em suportes metálicos, utilizando fita dupla face. Em seguida foram metalizados com banho de ouro e posteriormente submetidos à análise em microscópio JEOL-5600LV (BORGES et al, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as ultramicrografias dos machos adultos de *L. longipalpis* obtidos de campo (Figura 1a) pode-se observar a divisão anatômica da cabeça, tórax e abdome.

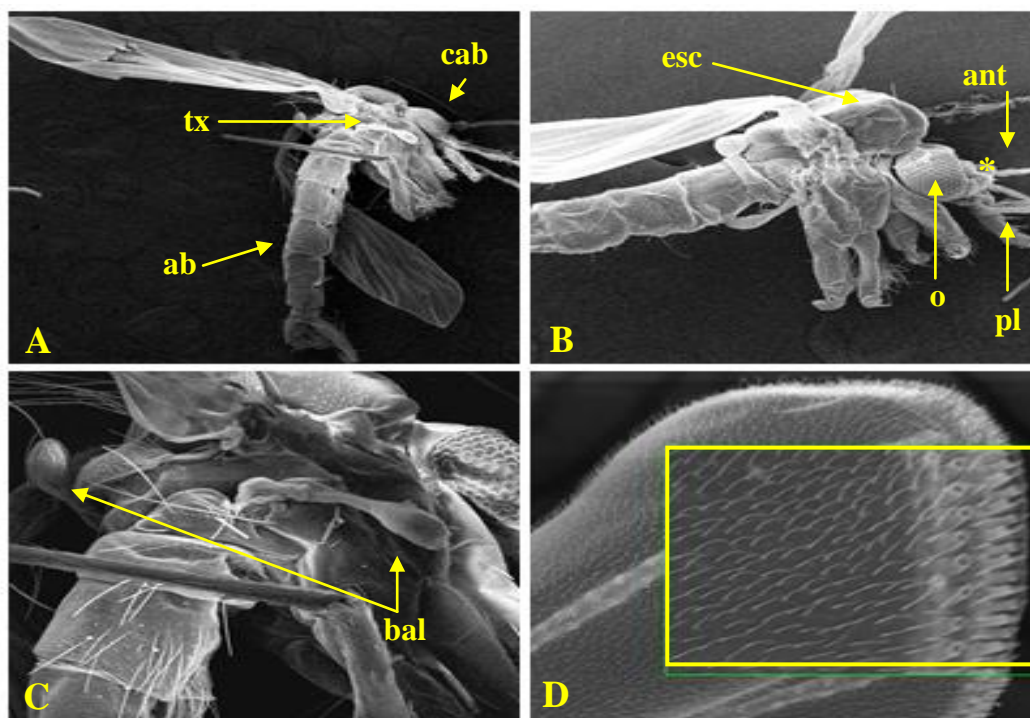


Figura 1: Micrografia de macho adulto de campo com detalhamento das estruturas. . (A) Vista geral lateral do macho adulto proveniente de captura em campo, cab: cabeça tx: tórax, ab: abdomem. (B) Vista lateral do tórax evidenciando esc: escudo, ant: antena, o: olhos compostos, pl: palpo labial, (*) escapo. (C) Vista lateral do torax mostrando balancins. (D) Detalhamento da distribuição dos pelos sobre a asa.

A cabeça apresenta-se articulada com a parte anterior do tórax possuindo aspecto piriforme, formando um ângulo de 90° em relação ao tórax, sendo pequena, com olhos compostos, antenas largas com 16 segmentos, o que esta em acordo com a descrição de Young e Duncan (1994), para machos e fêmeas desta espécie.

Olhos compostos e arredondados que ocupam grande espaço na superfície da cabeça, bem como presença de palpos lábios, antenas, escudo e escapo (Figura 1b), a presença de balancins ou halteres (Figura 1c), e o detalhamento da distribuição e ordenação dos pelos presentes na asa (Figura 1d). Os espécimes examinados da colônia também apresentaram as mesmas características.

Estes resultados aqui descritos são concordantes com a descrição de Young e Duncan (1994), assim como Nascimento, 2006 tanto para machos como fêmeas desta espécie.

Na Figura 2a pode-se observar micrografias do órgão reprodutor de macho proveniente de campo. Em vista frontal da genitália (Figura 2b) foram observadas cerdas do parâmero em número de duas, dispostas paralelamente em sua base, o que é característica pertencente à espécie *L. longipalpis*, sendo ferramenta para fins de identificação desta espécie, assim como os espinhos do disistilo e seu posicionamento na estrutura inerente a espécie de flebotomíneo. Na vista frontal da genitália masculina (Figura 2c), observa-se o formato assumido pelo parâmero do *L. longipalpis* as cerdas presentes no lóbulo lateral que se apresenta reto e longo, com presença de tufo “forma de escova” e cerdas na extremidade. Vale salientar que nos espécimes analisados da colônia não foram observadas diferenciação tanto morfológica quanto estrutural em relação aos espécimes de campo.

Os aspectos morfológicos no órgão reprodutor de *L. longipalpis* aqui observados são concordantes com as descrições realizadas por Montoya e Ferro, (1999; Ibáñez, (1999) e Galati (2003).

No que concerne às fêmeas de campo (Figura 3) foi possível observar espécimes com comprimento maior e diâmetro menor, apresentando 3,4mm de comprimento e variando de 1,8 a 2,3 mm de diâmetro em relação às fêmeas provenientes de colônia em laboratório, além de ser visualizada redução no número de cerdas no fêmur, porém as cerdas presentes no tórax e abdômen estão mais presentes nesses dípteros. As demais estruturas não diferiram entre as populações seguindo as mesmas características morfológicas do macho. A estrutura da genitália feminina pode ser visibilizada na Figura 3a, onde se pode observar detalhes do décimo segmento abdominal formador da genitália

feminina onde se observa o oitavo esternito como também orifício anal (Figura 3b). As mesmas estruturas foram identificadas nas fêmeas capturadas em campo, o que corrobora com Young e Duncan (1994) e Galati, (2003) no qual observaram as características das genitália feminina.

Apenas foi observada uma diferenciação em relação ao maior tamanho das fêmeas de campo, comparado com as aquelas provenientes de colônia, levando-se a crer que é esta diferença seja causada por fatores diversos, tais como: ambiente e/ou alimentação.

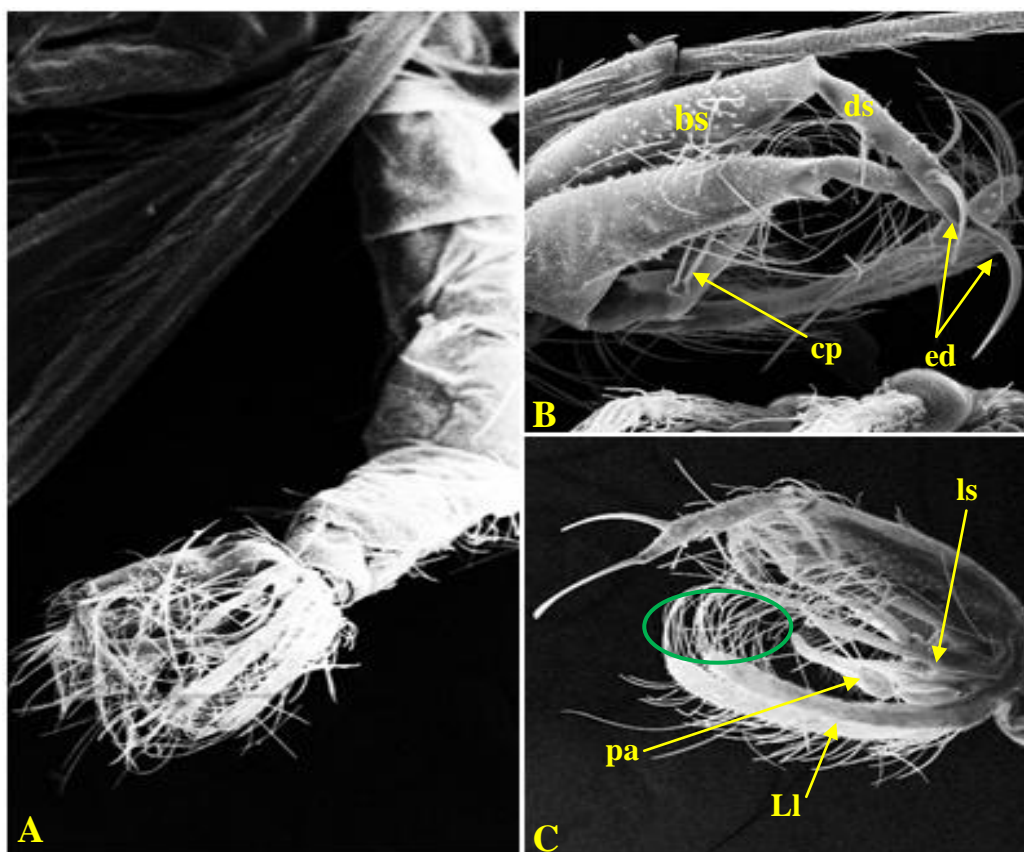


Figura 2: Micrografia de genitália em macho adulto de campo com detalhamento das estruturas. (A) Vista geral da genitália. (B) bs: basistilo, ds: disistilo, ed: espinhos do disistilo, cp: cerdas do parâmero. (C) pa: parâmero, ls: lamela submediana, Ll: lobo lateral.

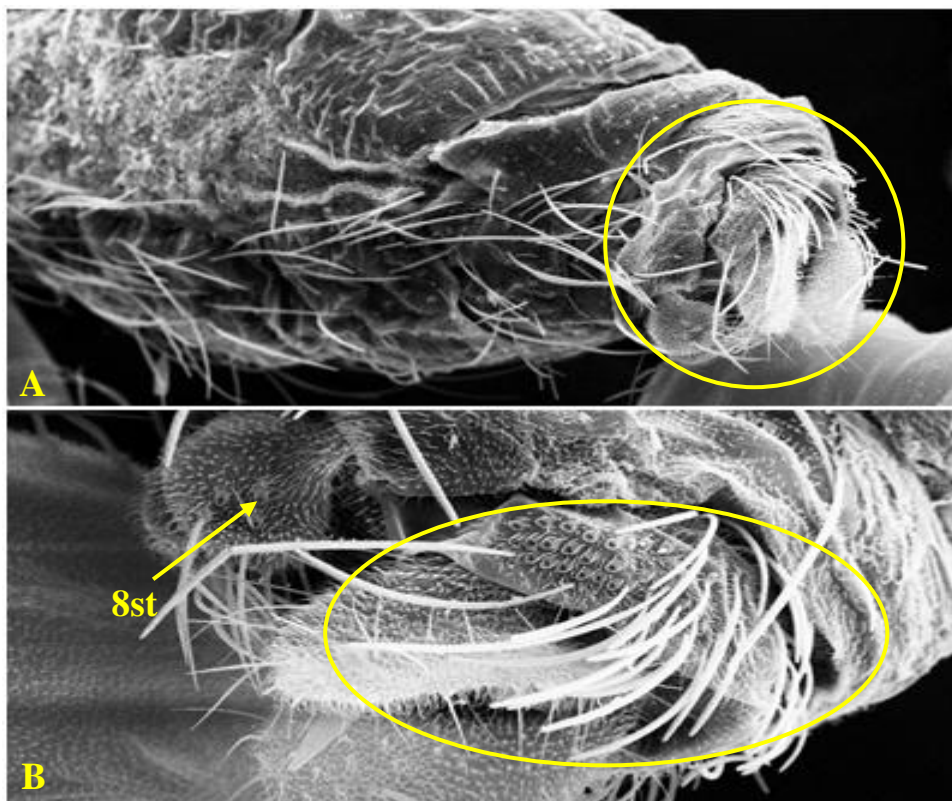


Figura 3: Micrografia de fêmea adulta de campo com detalhamento das estruturas.(A) detalhamento da genitália feminina. (B) Vista aproximada da genitália feminina; 8st: oitavo esternito; cerdas existentes no nono esternito e orifício anal (círculo amarelo).

Por outro lado independente do sexo dos insetos, foi possível observar pedicelos com microtríquias e sensilas tricóides de ponta romba, sensilas escamiformas (Figura 4^a).

Observam-se em destaque as sensilas escamiformas distribuídas de forma paralela ao longo da estrutura (Figura 4b). Como também ocelos com presença de pequenos tubérculos distribuídos de forma desordenada e microtríquias em destaque (Figura 4c). As sensilas presentes no pedicelo denominadas de tricóides, pequenas de ponta afiada e escamiformas que podem ser visibilizadas (Figura 4d).

No que concerne as microtríquias e sensilas tricóides pequenas de ponta afiada encontradas no pedicelo podem ser visibilizada em detalhe na figura 5a,b e o flagelômero e cerdas (Figura 5c,d), características estas encontradas em *L. longipalpis* e concordantes com a descrição de Hallberg e Hansson (1999) e Mitchell et al., (1999).

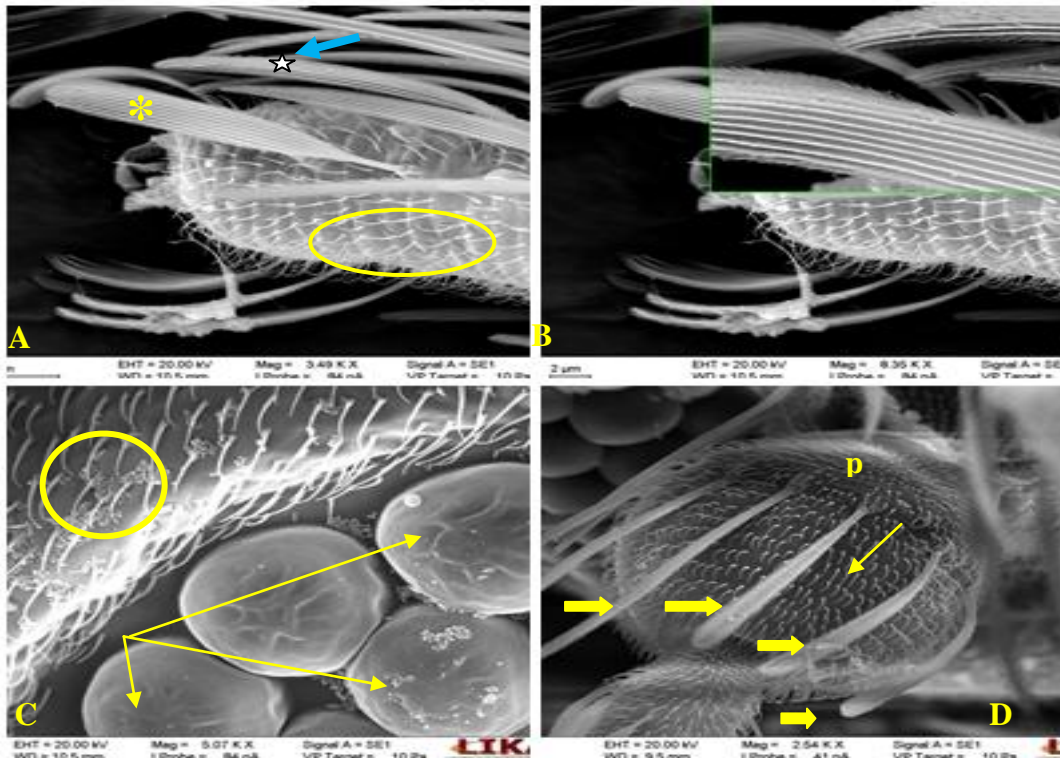


Figura 4: Micrografia de fêmea adulta de campo com detalhamento das estruturas. (A) Detalhamento de pedicelos com microtríquias; sensilas tricoides de ponta romba (estrela); sensilas escamiformas (asterisco amarelo). B): Detalhamento em destaque das sensilas escamiformas. C) oc: ocelos; destaque dos pedicelos com microtríquias. D) (p): pedicelo; sensilas tricoides pequenas de ponta afiada (seta fina); sensilas escamiformes (seta grossa).

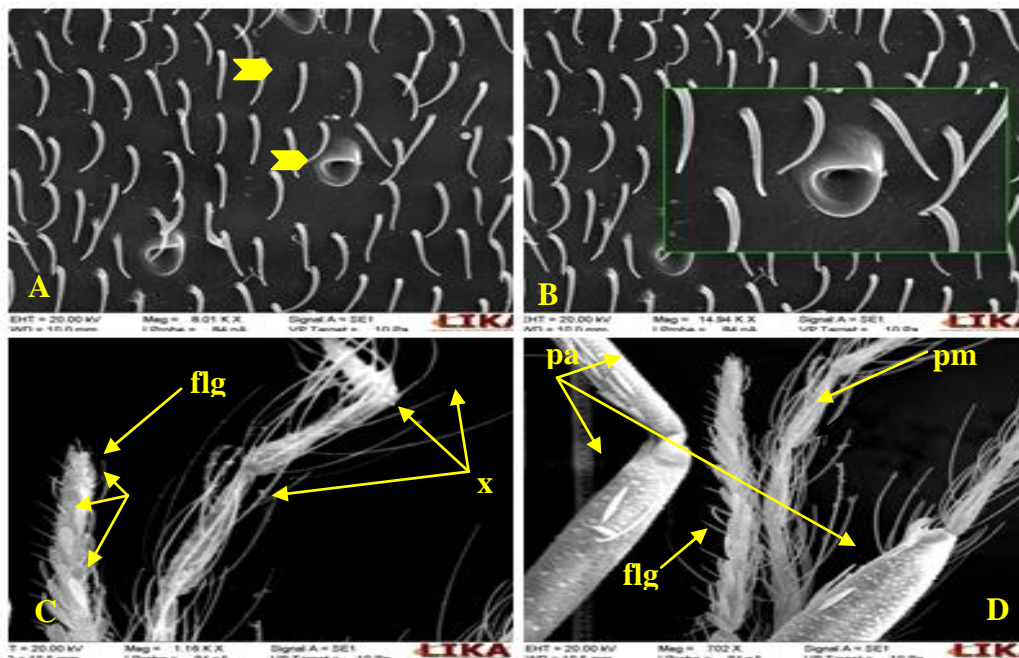


Figura 5: Micrografia de fêmea adulta de campo com detalhamento das estruturas. A) Microtríquias (cabeças de seta) e sensilas tricoides pequenas de ponta afiada encontradas no escapo e pedicelo; B) Grande aumento das sensilas campaniformas e pedicelos com microtríquias. C) Vista geral do flagelômero; x: cerdas encontradas ao longo do palpo maxilar; sensilas escamiformas (setas amarelas); (x) cerdas presentes no palpo maxilar. D) pa: pernas anteriores; flg: flagelômero; (pm): palpo maxilar.

4. CONCLUSÃO

A análise ultraestrutural revelou diferenças entre *L. longipalpis* de campo e de colônia laboratorial, particularmente no que concerne ao tamanho das fêmeas de acordo com as populações estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABONNENC E. Sur la morphologie de *Phlebotomus freetownensis* var. *magnus* Sinton, 1932 et de *Phlebotomus freetownensis* var. *sudanicus*, Theodor, 1933, d'après des individus provenat d'élevage. **Archive Institut Pasteur** Algér v.34, p.388-399, 1956.

ABONNENC E, LARIVIÈRE M. Les formes larvaires de quelques Phlèbotomes des régions Méditerranéenne et Ethiopienne. **Archive Institut Pasteur** Alger v35, p.391-403, 1957.

ALEXANDER B, USMA MC. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals Tropical Medicine Parasitology** Liverpool v.88(5), p.543-549,1994.

ARRIVILLAGA JC, NORRIS DE, FELICIANGELI MD, LANZARO GC. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Infect Genetics Evolucion**. Amsterdam v.2(2), p.83-95, 2001.

ARRIVILLAGA J, NAVARRO J, FELICIANGELI D. Morfología y quetotaxia del tagma cefálico larval de *Lutzomyia França* (Diptera: Psychodidae): Proposición de un sistema de nomenclatura. **Boletín de Entomología Venezolana**. Caracas 1999 v.14 (1): p.1-13, 1994.

ASHFORD R. W., - A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. **Parassitologia** Roma v.33 (1) p.79-83, 1991.

AZEVEDO AC, SOUZA NA, MENESES CR, COSTA WA, COSTA SM, LIMA JB, RANGEL EF. Ecology of sand flies (Diptera: psychodidae: phlebotominae) in the north of the state of Mato Grosso, Brazil. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro; v.97(4): p.459-64, 2000.

BAHIA-NASCIMENTO, A.; SECUNDINO, N. F. C. ; MIRANDA, J. C. ; PRATES, D. ; SOUZA, A.; FERNANDES, F. F. ; BARRAL, A. ; PIMENTA, P. F. P. - Ultrastructural comparison of the external morphology of the immature stages of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* and *lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu 2007 2010..

BALBINO, VD; ANDRADE, PP; LUNA, LKS. Acesso em 12/04/2001 2003.

BARRETTO MP. Sobre a sinonímia de flebótomos americanos (Diptera, Psychodidae). Segunda nota. **Anais Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo**. São Paulo 22: 1-27,1946.

BARRETO M. Morfologia dos ovos, larvas e pupas de alguns flebótomos de São Paulo. **Anais Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo** São Paulo. 17: 357-27, 1941.

BEJARANO EE, Sierra D, Vélez ID. Dos nuevos registros de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) para el departamento de Risaralda, Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia** Bogotá, v.33 p.43-44, 2007.

BEJARANO EE, SIERRA D, VÉLEZ ID. Novedades en la distribución geográfica del grupoverrucarum (Diptera: Psychodidae) en Colombia. **Revista Biomédica**, Bogotá v.23, p.341-350, 2003.

BELCOUR J. Contribution à l'étude du développement et de la biologie des formes larvaires des phlébotomes. **Thèse pour le doctorat en Médecine**. Faculté de Médecine de Paris, Paris, p.1-92, 1928.

CASANOVA, C.,. A soil emergence trap for collections of phlebotomine sandflies. **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.96, p.237-275, 2001.

CHIANOTIS BN. Sugar – feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera : Psychodidae) under experimental conditions **Journal Medical Entomology**. Oxford v.11, p.73 – 79, 1974.

COSCARÓN S, MANCEBO OA, COSCARÓN-ARIAS CL. The preimaginal stages of *Cryptotylus unicolor* (Wiedermann) and *Tabanus nebulosus ornalventris* Kroeber (Tabanidae - Diptera - Insecte). **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.93, p.91-98, 1998.

COUTINHO, SG et al. Pathogenesis and Immunopathology of leishmaniasis. da Saúde, ano III, n.4, p.11. 1998. des phlébotomes. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária: **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.82, p.214, 1987.

CUBAS, Z. S.; / SILVA, J. C. R., CATÃO, J. L., – **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária** São Paulo p. 274 -276, 2006.

ENDRIS RD, YOUNG DG, P PERKINS. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). **Journal Medical Entomology** Honolulu v.24, p.412- 415, 1987.

FAUSTO AM, MAROLI M, MAZZINI M. Ootaxonomy and eggshell structure of *Phlebotomus* sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford v.6, p.201-208, 1992.

FAUSTO AM, MAROLI M, MAZZINI, M. Scanning electron microscopical study of the eggshell of three species of *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae). **Insect Science and tis Application** Oxford v.14, p. 483-488,1993.

FAUSTO AM, FELICIANGELI MD, MAROLI M, MAZZINI M. Ootaxonomic investigation of five *Lutzomyia* species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. **Memorial Institute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.96, p.197-204, 1998.

FAUSTO AM, GAMBELLINI G, TADDEI AR, MAROLI M, MAZZINI M
Ultrastructure of the seminal vesicle of *Phlebotomus perniciosus* Newstead (Diptera, Psychodidae). **Tissue and Cell** Edinburgh v.32, p.228–237, 2000.

FELICIANGELI MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology** Oxford. v.18, p.71-80, 2004.

FELICIANGELI M, LAMPO, M. Phlebotomine sandflies in Venezuela. V. Review of the genus *Brumptomyia* (Diptera: Psychodidae), with description of the female of *Brumptomyia devenanzii*, re-description of the male and isozymatic profile. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** Liverpool. v.95(3), v.297-308, 2001.

FERRO C, PARDO R, TORRES M, MORRISON A. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis*(Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal Medical Entomology** Honolulu. v.34, p.719-728 1997.

FORATTINI, O. P. Phlebotominae – Leishmanioses – Bartonelose. In: **Entomologia Médica** ,São Paulo: Edgard Blucher,. v.4, 1973.

GALATI E. Morfologia e Taxonomia dos Flebotomíneos. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. p.23-206, 2003.

GALATI EAB. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América.Pp.53-175. Em: Rangel EF, Lainson R (eds.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio do Janeiro. FIOCRUZ. p.368, . 2003.

GALATI EAB. Classificação Morfologia e Terminologia E Identificação de Adultos Vol.I.Apostila Disciplina HEP 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil. 2010.

GHOSH KN, MUKHOPADHWAY JA. A comparison of chorionic sculpturing of four Indian phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) by scanning electron microscopy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** Liverpool v.3, p.61-68,1996.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, New York v.35, n.11-12, p.1169-1180, 2005.

GRASSI B, BHATTHACHARYA A. Ricerche sui flebótomo. **Memorie della Società Italiana di Scienze Naturali**. Milano v.4 p.353-394, 1907.

HANSON WS. The Immature Stages of the Subfamily *Phlebotomine* in Panama (*Diptera: Psychodidae*), Doctoral Thesis, University of Kansas, Kansas, p.102, 1968.

IBÁÑEZ BS.. Phlebotominae de México. I. *Brumptomyia* França y Parrot; *Lutzomyia* França, las especies de L. (*Lutzomyia*) França y del grupo verrucarum. **Folia Entomologica Mexicana**. Caracas v.107, p.61-116, 1999.

KILLICK-KENDRICK.; KILLICK-KENDRICK, M.; LEGER,N.; PESSON, B.;MADULOBLOND, M.- Absence of outer caudal setae on all larval instar of *Phlebotomus tobii* from Ionion Greek Island. **Medical and Veterinary Entomology**. Oxford. v.3, p.131-135, 1989.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**. Oxford v.4, p.1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, Maroli M, Killick-Kendrick M. Bibliography on the colonization of phlebotomine sandflies. **Parassitologia** Roma v.35, p.321-333,1991.

KILLICK-KENDRICK,. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.4, n.1, p.1-24, 1999.

KILLICK-KENDRICK R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinic and Experimental Dermatology** Oxford. v.17, p.279-89, 1999.

LANE, R.P. Sandflies (Phlebotominae) In Medical Insects and *Arachnids*. Chapman & Hall Ed., London , UK, 1993.

LAINSON, R. The american leishmaniasis: some observations on their and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicina and Hygiene**. London v.77, p.569, 1983.

LANZARO GC. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Infect Genetic Evolution**. New York. v.2(2), p.83-95,2002.

LEITE ACR, WILLIAM P. Description of the fourth larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microcopy. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.9, p.571-578, 1996.

LEITE ACR, WILLIAM P. The first instar larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro v.91, p.571-578,1997.

LEWIS, D.J. A Taxonomic Review of the Genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Bulletin of British Museum of Natural History**. London v.45(2), p.121-209, 1982.

LUCIENTES J, ANTONIO J, GRACIA MJ, PERIBAÑEZ MA. Flebotomos, de la biología al control. **Revista Eletronica de Veterinária Espanha**. 2005.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 4, n.1, p.84-95, 1912.

MASCARI T. Novel methods for the control of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). Doctoral Thesis. University of London. Inglaterra. 2008.

MONTOYA-LERMA J, CADENA H, SEGURA I, TRAVI B. Association of *Lutzomyia columbiana*(Diptera: Psychodidae) with a leishmaniasis focus in Colombia

due to species of the *Leishmania mexicana* complex. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**; Rio de Janeiro v.94, p.277-83. 1999.

MUNSTERMANN LE. PHLEBOTOMINE SAND FLIES, THE PSYCHODIDAE. IN: MARQUARDT, W.C.;BLACK,WC, FREIER JE; HAGEDORN HH, HEMINGWAY J, HIGGS S, JAMES AA, KONDRATIEFF B,MOORE CG. (Eds.). **Biology of Disease Vectors**, Second edition. Elsevier, San Diego, CA.. p.141–151, 2004.

NASCIMENTO, A, C, B. Microanatomia ultraestrutural dos ovos, larvas e órgãos sensoriais de vetores de leishmanioses através da microscopia eletrônica de varredura. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Mestrado em Ciências da Saúde. 2006.

NIEVES E, RIBEIRO A. Physical Factors Influencing the Oviposition of *Lutzomyia migonei*(Diptera: Psychodidae) in Laboratory Conditions. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v.92(6), p.733-737, 1997.

PESSOA FAC, QUEIROZ RG, WARD RD. Posterior spiracles of 4th Instar larvae of four species of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) underscanning electron microscopy. **Memorial Intitute Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro v.95, p. 689-691, 2000.

PERFIL'EV PP. Fauna of U.S.S.R. Diptera *Phlebotomidae* (*Sandflies*). 3. **Academy of Science of the USSR**, Zoological Institute New Series v.8, p. 46-59, 1968.

RANGEL EF, LAINSON R, SOUZA AA, READY P, AZEVEDO ACR. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v.91, p.43-50, 1996.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Orgs.) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003.

SACCÀ G. Stadi preimaginali di *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, *P. papatasi* Scop., *P. perniciosus* Newstead (Diptera: Psychodidae). **Rend Istituto Superiore di Sanità** Roma v.13, p.680-688, 1950.

SIERRA A, VÉLEZ B, URIBE S. Identificación de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo verrucarum por medio de microscopia electrónica de sus huevos. **Revista de biología Tropical**. San Jose. v.48 (2-3), p. 615-622, 2000.

TROUILLET J. *Sergentomyia (Grassomyia) ghesquierei* Parrot (Diptera, Phlebotomidae). Etude morphologique des stades pré-imaginaux et notes bio-écologiques. **Office de la recherche scientifique et technique outre-mer Serie Entomology Medical Parasite** Parma v.14, p.347-356, 1929.

TROUILLET J. *Sergentomyia (Sergentomyia) bedfordi firmatus* Parrot et Malbrant, 1945 et *Sergentomyia (Sergentomyia) bedfordi medius* Kirk et Lewis, 1950 (Diptera, Phlebotomidae). Etude morphologique dès stades pré-imaginaux et notes bio-écologiques. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris. v.52, p.35-52, 1977.

TROUILLET J 1979. *Sergentomyia (Rondanomyia) ingrami* Newstead, *Sergentomyia (Rondanomyia) dureni* Parrot, 1934 et *Sergentomyia (Sergentomyia) hamoni* Abonnenc, 1958 (Diptera, Phlebotomidae). Etude morphologique des stades pré-imaginaux et notes bio-écologiques. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris v.54, p.353-373, 1979.

WARD RD. A revised numerical chaetotaxy for neotropical Phlebotomine sandfly larvae (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**. Oxford. v.1, p. 89-94 1976.

YOUNG, D.G. A Review of the Bloodsucking Psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoacinae). Tech. Bull. 806, Agriculture and Expotion Station, IFAS, Univ. Florida, Gainesville. p.226, 1979.

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). **Memoirs of the American Entomological Institute Gainesville**. v.54, p.1-81, 1994.

VILELA ML, RANGEL EF, LAINSON R. Métodos de Coleta e Preservação de Flebotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. p. 353–367.

ZACHARUCK RY, BLUE SG. Ultrastructure of the peg and hairsensilla on the antenna in larval of *Aedes aegypti*. **Journal of Morphology** Philaderphia v.135, p.433-456, 1971.

ZACHARUCK RY, RU-SIU L, BLUE SG. Fine structureof the antenna and its sensory cone in larvae of *Aedes aegypti*. **Journal of Morphology** Philaderphia v135, p.273-298, 1971.