

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Antonio Carlos Ferrari Júnior

**Estabelecimento de colônia de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae:
Phlebotominae) em laboratório**

**DOURADOS-MS
DEZEMBRO DE 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Antonio Carlos Ferrari Júnior

**Estabelecimento de colônia de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae:
Phlebotominae) em laboratório**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para o título de Bacharel em Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes
Co-Orientadora: Profa. Dra. Magda Freitas Fernandes

**DOURADOS-MS
DEZEMBRO DE 2014**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD

Ferrari Júnior, Antonio Carlos.

Estabelecimento de colônia de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em laboratório / Antonio Carlos Ferrari Júnior – Dourados, MS: UFGD, 2014.
36f.

Orientador: Profa. Dr Wedson Desidério Fernandes.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Magda Freitas Fernandes.

Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Flebotomíneos. 2. Leishmaniose Tegumentar. 3. Leishmânias. 4. Incriminação Vetorial I. Estabelecimento de colônia de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em laboratório.

**Estabelecimento de colônia de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae:
Phlebotominae) em laboratório**

Por

ANTONIO CARLOS FERRARI JÚNIOR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande
Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes
Presidente

Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
Membro Titular

Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes
Membro Titular

Aprovado em: 12 de Dezembro de 2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que tem derramado suas bênçãos em minha vida, dando-me saúde e forças para superar as dificuldades.

A Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Ao corpo Docente e Direção da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais pelas oportunidades que proporcionaram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes, pela orientação, apoio e confiança.

A minha co-orientadora Dra. Magda Freitas Fernandes, pelos ensinamentos e pelo empenho dedicado na condução e no desenvolvimento e nas correções deste trabalho.

Ao Biólogo, MSc. Kleiton Maciel dos Santos pelo auxílio nas coletas de campo e nos experimentos realizados em laboratório.

Ao Prof. Dr. Josué Raizer pelas análises estatísticas.

Agradeço aos professores por proporcionar-me o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e efetividade da educação no processo de formação profissional, o meu eterno agradecimento.

Aos meus familiares, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus amigos, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	iv
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	1
4.1 Flebotomíneos, inseto vetor	1
4.2 Biologia dos flebotomíneos	2
4.3 Importância médica e veterinária	3
2 INTRODUÇÃO	5
3 OBJETIVOS	6
3.1 OBJETIVO GERAL	6
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
4 METODOLOGIA.....	7
4.1 Local e período de coleta.....	7
4.2 Obtenção da progênie.....	8
4.3 Duração do ciclo gonotrófico.....	11
4.4 Dietas alimentares oferecidas para acompanhamento e desenvolvimento das formas imaturas	11
4.4.1 Para <i>Ny. neivai</i>	12
4.5 Emergência dos espécimes adultos.....	13
4.6 Testes de incriminação vetorial de <i>Ny. neivai</i> para <i>L. (L.) amazonensis</i>	13
4.6.1 Procedimento a cada etapa do teste de suscetibilidade e de transmissão via picada.....	14
4.6.1.1 Primeiro repasto infectivo	14
4.6.1.2 Segundo repasto infectivo	15
4.6.1.3 Terceiro repasto infectivo.....	15
4.7 Aspectos éticos e de biossegurança.....	15
4.8 Análise estatística	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.2 <i>Nyssomyia neivai</i>	17
5.2.1 Testes de incriminação vetorial de <i>Ny. neivai</i> para <i>L. (L.) amazonensis</i> ...	22
5.2.1.1 Primeiro repasto infectivo	22

5.2.1.2 Segundo repasto infectivo	22
5.2.1.3 Terceiro repasto infectivo.....	22
6 CONCLUSÕES	23
7 REFERÊNCIAS.....	24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fragmento de mata às margens do Rio Brilhante, município de Rio Brilhante-MS.....7
- Figura 2.** (A) Armadilha de Shannon Branca. (B) Aspirador de castro para coleta de espécimes de flebotomíneos.....8
- Figura 3.** Gaiolas de criação acondicionadas em caixa de isopor revestida internamente com gesso umedecido.....9
- Figura 4.** (A) e (B) Fêmeas selvagens de flebotomíneos individualizadas para postura dos ovos. (C) Fêmea de *Nyssomyia neivai* ovipondo no gesso (substrato). (D) Ovos de *Nyssomyia neivai*.....10
- Figura 5.** Espermatecas de fêmea de *Nyssomyia neivai*.....11
- Figura 6.** (A) Hamster experimentalmente infectado por *L. (L.) amazonensis* exposto às picadas de F1 de *Ny. neivai*. (B) G1-A Fêmeas ingurgitadas do repasto infectivo. (C) Hamster exposto às picadas de fêmeas ingurgitadas do repasto infectivo da G1-B.....15
- Figura 7.** Larvas do 4^o estágio (L4) de *Ny. neivai* das diferentes dietas. (A) Dieta 1 (solo). (B) Dieta 3 (peixe). (C) Dieta 4 (solo + peixe) e (D) Dieta 2 (levedura).....20
- Figura 8.** Comparativo entre os totais de espécimes de *Nyssomyia neivai* que emergiram em 25 dias para cada uma das repetições (10 repetições por dieta).....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número absoluto de ovos por fêmea e a média de ovos por dieta e a média geral e a duração em dias do ciclo gonotrófico de *Nyssomyia neivai*.....18

Tabela 2. Número absoluto de espécimes emergidos por sexo e a média de emergência por dieta e período.....19

Tabela 3. Número total de espécimes que emergiram por dieta e por período.....20

RESUMO

Os flebotomíneos são dípteros psicodídeos que consistem um grande grupo de importância em saúde, pois são responsáveis pela transmissão das leishmanioses. Existem várias espécies de flebotomíneos relevantes na epidemiologia das leishmanioses, que foram notificadas em diversos estados brasileiros e foram assinaladas com infecção natural por *Leishmania* spp. E o presente teve por objetivo o estabelecimento de colônia de *Nyssomyia neivai* em laboratório, utilizando diferentes dietas alimentares para o desenvolvimento das formas imaturas com vistas a avaliar qual dieta confere uma homogeneização na emergência dos espécimes para investigação de competência vetorial. As coletas dos espécimes selvagens de flebotomíneos foram realizadas em um fragmento de mata, nos municípios de Rio Brilhante, no período de setembro de 2014. Para a alimentação das formas imaturas foi utilizada diferentes dietas alimentares, sendo que a dieta 1 é a ração solo (terra vegetal + fezes de codorna); a dieta 2 é a de levedura; a dieta 3 é a de ração de peixe; a dieta 4, é a combinação da dieta 1 com a dieta 3 (solo + peixe); e a dieta 5, é a combinação da dieta 1 com a 2 (solo + levedura). Emergiram 173 espécimes de *Ny. neivai*, no período de 51 dias. 59 fêmeas de primeira geração de *Ny. neivai* fizeram o repasto sanguíneo em hamster experimentalmente infectado por *L. (L.) amazonensis* e, destas quatro fêmeas realizaram o 2º repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis (não infectados) para investigação da competência vetorial de *Ny. neivai* para *L. (L.) amazonensis*.

Palavras-chave: Flebotomíneos, Leishmaniose Tegumentar, Leishmânias, Incriminação Vetorial.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Flebotomíneos, inseto vetor

Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (FORATTINI, 1973); cujas fêmeas praticam hematofagia, constituindo um grupo de grande interesse em saúde pública e estão distribuídos por todo o mundo, sendo mais abundantes na Região Neotropical. São conhecidas pouco mais de 500 espécies (GALATI, 2014) e cerca de 60 delas estão implicadas, suspeitas ou comprovadas, na veiculação de *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1990; DEDET, 1993; CIPA GROUP, 1993; GALATI, 2003; SHERLOCK, 2003).

Entre os flebotomíneos, apenas as fêmeas praticam hematofagia em vertebrados, incluindo seres humanos, animais sinantrópicos e domésticos (FORATTINI, 1973). Ambos os sexos de flebotomíneos podem ser atraídos por seres humanos e animais e pouco se conhece sobre essa atratividade. Aparentemente, os machos são atraídos aos hospedeiros para a cópula (LANE *et al.*, 1990; WARD *et al.*, 1990), que pode ocorrer antes, durante ou após o repasto sanguíneo. É comum a agregação de machos sobre o hospedeiro que pode ser mediada por feromônios (DYE *et al.*, 1991). Presume-se que a atratividade inicial dos machos ocorre em resposta a substâncias eliminadas pelo suor do hospedeiro (PINTO *et al.* 2001).

Esses dípteros são encontrados com frequência em ecótopos naturais, como troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, frestas em rochas e em cavernas (AZEVEDO *et al.*, 1993; GALATI, 2003; GALATI *et al.*, 2006), assim como, em ambientes rurais e urbanos, próximos a animais domésticos e habitações humanas, demonstrando que se encontram em processo de adaptação ao ambiente antrópico (TOLEZANO *et al.*, 2001; BARATA *et al.*, 2004). Isso vem ocorrendo devido à diminuição das matas nativas, com alteração dos habitats e restrição dos ambientes utilizados por esses vetores. Essas alterações ambientais ocasionadas pelo homem também levaram à dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação aos flebotomíneos e conseqüentemente contribuindo para a ocupação de diferentes ambientes, inclusive o antrópico (GOMES *et al.*, 1989; MARZOCHI, 1989; TOLEZANO *et al.*, 2001).

Desse modo, aquelas espécies que de alguma forma resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (FORATTINI *et al.*, 1976; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Uma vez atraídos, eles se estabelecem nessas áreas e representam um risco constante como vetores de *Leishmania*, podendo manter o ciclo de transmissão entre animais domésticos e humanos (BARBOSA *et al.*, 1999; BRASIL, 2007).

1.2 Biologia dos flebotomíneos

As fêmeas, além de ingerir substâncias açucaradas de excreções de afídeos (pulgões), contendo melezitose, e de seiva de vegetais, sugam sangue de vários animais, para a produção de ovos. Os machos somente sugam substâncias açucaradas. A ingestão de carboidratos é muito importante para o desenvolvimento de *Leishmania* no tubo digestório, e o protozoário também participa da lise de sacarose (MARCONDES, 2011).

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm, possuem o corpo recoberto por inúmeras cerdas, asas lanceoladas semi-eretas e cabeça formando um ângulo de 90° com o tórax. Como todo díptero, são holometábolos, com desenvolvimento em quatro estágios: ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto. Os ovos não apresentam mobilidade e são colocados diretamente no substrato que servirá para o desenvolvimento larval. A oviposição, postura dos ovos, é feita isoladamente ou em pequenos conjuntos de ovos que, graças à presença de substância viscosa que lhes reveste a superfície, permanecem aderidos ao substrato onde foram depositados (FORATTINI, 1973).

Os ovos são inicialmente claros e escurecem após algumas horas. A eclosão das larvas ocorre, em geral, após quatro a 10 dias, podendo haver grande variação de acordo com a espécie e as condições ambientais, como temperatura e umidade. As larvas comem vorazmente vários detritos animais e vegetais, sofrem três mudas e se locomovem muito nos abrigos. Após um período, em geral, de 30 a 60 dias, fixam-se ao substrato, perdem a cutícula, que fica amassada na sua base, e se transformam em pupas. Estas fixam-se ao substrato e permanecem imóveis, a não ser se forem perturbadas, quando, então, fazem movimentos de flexão e extensão.

O período total de desenvolvimento de ovo a adulto costuma ser de um a dois meses, ocorrendo às vezes diapausa, como em *Ny. whitmani* (MARCONDES, 2011).

As larvas de flebotomíneos apresentam coloração esbranquiçada, possuem aspecto vermiforme e são constituídas por 12 segmentos, além da cabeça, que é bem desenvolvida, de coloração escura, com presença de um par de antenas e peças bucais fortes do tipo mastigadoras para auxiliar na alimentação constituída de matéria orgânica em decomposição (FORATTINI, 1973; LEITE e WILLIAMS, 1996).

Em condições experimentais, várias dietas já foram oferecidas às larvas. Rações à base de pó de fígado e alface cozida (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1977), ração para peixes (RANGEL *et al.*, 1986) e fezes de coelho (PETERKOVA-KOCI *et al.*, 2012), mostrando-se favoráveis ao desenvolvimento larval e obtenção de formas adultas.

1.3 Importância médica e veterinária

Os flebotomíneos incomodam com suas picadas, principalmente quando muito numerosas, pois causam eritema, que clareia quando comprimido com o dedo. As picadas podem ser muito dolorosas, já tendo sido comparadas ao toque de uma agulha em brasa. Os nomes *queimador* e *pringador*, utilizados na Colômbia, têm relação com a dor. Em regiões próximas ao Mediterrâneo, a irritação cutânea é chamada de *harara*. Em Santa Rita, Pernambuco, Brasil, observam-se numerosas crianças com a pele semelhante à de sarampo, pelas numerosas picadas de *Lutzomyia longipalpis* (MARCONDES, 2011).

Ainda segundo MARCONDES (2011), flebotomíneos de várias espécies transmitem parasitas do gênero *Leishmania*. Quando a fêmea pica, podem ser injetados promastigotas que, após serem fagocitados pelos macrófagos, transformam-se em amastigotas e se multiplicam no seu interior. Com a ruptura dos macrófagos, os amastigotas são liberados, sendo fagocitados por outros macrófagos, repetindo o ciclo. Se um flebotomíneo ingerir amastigotas, estes se transformarão em promastigotas no seu estômago, ocorrendo multiplicação em várias partes do seu tubo digestório e possível invasão das peças bucais por formas infectantes (metacíclicas), permitindo, assim, a transmissão pela picada.

A incriminação de um flebotomíneo como vetor de *Leishmania* segundo KILLICK-KENDRICK (1999) é baseada nos seguintes critérios: 1) observação de um flebotomíneo realizando hematofagia em seres humanos ou hospedeiros reservatórios; 2) desenvolvimento do parasita no intestino médio de flebotomíneos; 3) a confirmação da mesma espécie de *Leishmania* de flebotomíneos naturalmente infectados a partir de pacientes e 4) demonstração de que flebotomíneos podem transmitir *Leishmania* durante o repasto sanguíneo.

Lu. longipalpis tem sido utilizada como hospedeiro experimental de *Leishmania* de várias espécies, mas isso não significa que essa espécie as transmita na natureza (MARCONDES, 2011).

A transmissão de *Leishmania* num local depende muito das condições ambientais; pode ocorrer tanto a substituição do parasita que atinge os humanos quanto dos flebotomíneos envolvidos, em decorrência de modificações nessas condições. No oeste de São Paulo, por exemplo, *Ny. whitmaniera* o mais provável vetor de parasitas de leishmaniose tegumentar há algumas décadas. Com o desmatamento, essa espécie foi substituída por *Ny. neiva* como a mais comum e o mais provável vetor de parasitas. Recentemente tem-se encontrado humanos e centenas de cães com leishmaniose visceral na periferia de Araçatuba, nessa região, com predominância de vegetação rasteira, e pela primeira vez se notou a ocorrência de *Lu. longipalpis* em abundância, numa área de fauna de flebotomíneos bem estudada anteriormente. O relato de quase 300 casos de leishmaniose tegumentar numa clínica em Araçatuba (na época, uma cidade pequena), entre 1936 e 1939, reforça a provável influência da modificação ambiental na ocorrência dos tipos de leishmaniose. A leishmaniose visceral vem sendo encontrada em localidades cada vez mais próximas da capital (São Paulo), num aparente deslocamento oeste-leste. O recente encontro de cães infectados em São Borja (RS) e de humanos e cães infectados em municípios argentinos próximos comprova o potencial de expansão da parasitose (MARCONDES, 2011).

2 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos, dípteros psicodídeos, com ampla distribuição nas Américas, constituem um grupo de insetos de grande importância na saúde pública, em virtude de suas fêmeas estarem envolvidas na transmissão de agentes das leishmanioses, protozoários parasitas do gênero *Leishmania*.

Como os dípteros em geral, os flebotomíneos são insetos holometábolos, em que suas formas imaturas, de habitat terrestre, desenvolvem-se em solos úmidos, ricos em matéria orgânica em decomposição, ao abrigo da luz solar direta. Diferenciam-se dos demais, por apresentarem corpo mais delgado e piloso, pernas mais longas e finas e de pequeno porte. Seu vôo é curto e baixo e de movimentos saltitantes sobre a superfície de pouso.

Embora se conheça os hábitos alimentares de algumas espécies adultas de flebotomíneos, pouco se sabe sobre a alimentação das formas imaturas em seu habitat natural. O conhecimento que se tem do ciclo biológico e comportamento são da criação de flebotomíneos em laboratório para fins de pesquisas.

Manter colônias vivas de flebotomíneos em laboratório por um grande período de tempo fora do seu habitat e a obtenção de fêmeas de flebotomíneos de primeira geração (F1) são um dos grandes desafios para o estabelecimento de colônia para estudos de competência vetorial. Para incriminar uma espécie de flebotomíneo em relação à transmissão de *Leishmania* spp. é necessário um número suficiente de fêmeas para desenvolver os experimentos. É primordial ter sucesso no desenvolvimento das formas imaturas, principalmente na alimentação das larvas até atingir o estágio pupal, fase que antecede a emergência do inseto adulto.

O presente trabalho tem como objetivo o estabelecimento de colônia de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a partir de diferentes dietas alimentares para a obtenção de sua progênie em laboratório para estudos de competência vetorial.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar as diferentes dietas oferecidas a *Nyssomyia neivai* com vistas a uma homogeneização na emergência de adultos para obtenção de sua progênie em laboratório.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em relação às duas espécies de flebotomíneos e à *Leishmania*:

Avaliar a duração do ciclo gonotrófico; a proporção de fêmeas com posturas; o número de ovos por fêmeas e a média de oviposição; o número de adultos emergidos; a homogeneidade no período de emergência; a média em dias da emergência de espécimes adultos; o número de espécimes machos e fêmeas que emergiram em cada dieta alimentar; o número de fêmeas que fizeram o repasto infectivo; e a avaliação da competência vetorial de *Ny. neivai* para *L. (L.) amazonensis*.

4 METODOLOGIA

4.1 Local e período de coleta

A coleta de espécimes selvagens de *Nyssomyia neivai* foi no dia 11 de setembro de 2014, no horário das 18h às 22h, em um fragmento de mata (Coordenadas S21°53'40.20" e W54°01'36.89"), situado às margens do Rio Brilhante, localizado no município de Rio Brilhante, próximo ao município de Deodápolis, cerca de 40 Km na BR 145 ea 65 Km do município de Dourados (Figura 1).



Figura 1. Fragmento de mata às margens do Rio Brilhante, município de Rio Brilhante-MS.

Para a coleta de espécimes selvagens de *Ny. Neivai* foi utilizada armadilha de Shannon Branca, tradicional (SHANNON, 1939), com auxílio de capturador de castro (Figura 2).



Figura 2. (A) Armadilha de Shannon Branca. (B) Aspirador de castro para coleta de espécimes de flebotomíneos.

4.2 Obtenção da progênie

Para a obtenção da primeira geração (F1) de *Ny. neivai*, os espécimes selvagens de flebotomíneos, trazidos do campo, foram encaminhados ao Laboratório de Pesquisas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Laboratório de Insetos Vetores (LIVE), da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), UFGD.

Os adultos machos e fêmeas na mesma noite de coleta foram mantidos juntos para o acasalamento. Os espécimes foram colocados em gaiolas de criação (armação de metal e de tecido voil), acondicionadas em caixa de isopor, revestida internamente por gesso pedra creme e toalhas umedecidas para manutenção da umidade do microambiente. Foi oferecido sobre o tecido da gaiola maçã cortada em fatias, como fonte de carboidrato (fonte energética) para sobrevivência dos espécimes (Figura 3).



Figura 3. Gaiolas de criação acondicionadas em caixa de isopor revestida internamente com gesso umedecido.

Para o repasto sanguíneo foi utilizado hamsters, linhagem *Mesocricetus auratus*, para as fêmeas realizarem a postura dos ovos (oviposição). Os hamsters foram anestesiados antes da exposição às picadas, com Ketamina e Xilazina (proporção de 2:1). Foi administrado 0,25mL ou 0,30mL do produto final, conforme o peso do animal. Os hamsters ficaram expostos às picadas das fêmeas de flebotomíneos por duas horas.

Após uma hora do final do repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas (as que se alimentaram) foram individualizadas em tubo de polietileno, contendo uma camada de gesso pedra creme no fundo, umedecido, utilizado como substrato para a manutenção da umidade do micro-habitat e para a postura dos ovos. Os tubos com as fêmeas individualizadas para a oviposição foram acondicionados em caixas de isopor menores, também revestidas internamente com uma camada fina de gesso e com tecidos umedecidos para manutenção interna da caixa em torno de 25-27°C de temperatura e umidade relativa em torno de 60 a 70%.

O repasto sanguíneo para *Ny. Neivai* foi realizado uma noite após o dia da coleta, dia 12 de setembro e as fêmeas ingurgitadas foram individualizadas na mesma madrugada para posterior postura dos ovos (Figura 4).

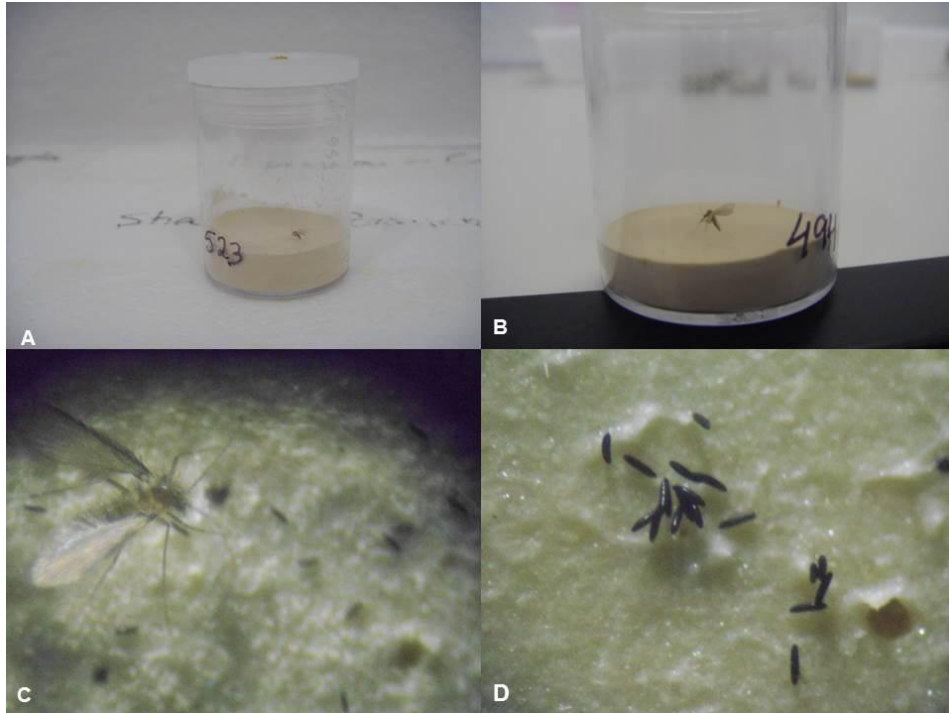


Figura 4. (A) e (B) Fêmeas selvagens de flebotomíneos individualizadas para postura dos ovos. (C) Fêmea de *Nyssomyia neivai* ovipondo no gesso (substrato). (D) Ovos de *Nyssomyia neivai*.

Após o período de oviposição, as fêmeas selvagens individualizadas foram dissecadas para identificação das espécies e os ovos de *Ny. neivai* foram transferidos para as placas de petri de acrílico, revestidas no fundo com gesso pedra creme umedecido, para o desenvolvimento das formas imaturas.

A dissecção das fêmeas selvagens de flebotomíneos foi feita sob estereomicroscópio (lupa), com auxílio de estiletos, em lâminas esterilizadas. Cada fêmea foi colocada em uma gota de solução salina sobre a lâmina, separando a cabeça do restante do corpo. Para a dissecção fixou-se o tórax com um dos estiletos e com outro, fez-se um movimento de tração entre o 7^o e 8^o tergitos abdominais de modo a expor o tubo digestório, que vem preso ao 8^o tergito e às demais partes da terminália. Sob um microscópio óptico e aumento de 400 vezes, fez-se a identificação das espécies através das espermatecas (Figuras 5) e de outras estruturas morfológicas.

A nomenclatura adotada para identificação das espécies de flebotomíneos segue a padronização de GALATI (2003, 2014) e a abreviação dos gêneros, a de MARCONDES (2007).



Figura 5. Espermatecas de fêmea de *Nyssomyia neivai*.

4.3 Duração do ciclo gonotrófico

Para estimar a duração do ciclo gonotrófico das fêmeas selvagens de *Ny. neivai* foi calculado o período (dias) compreendido entre o repasto sanguíneo e a postura dos ovos.

4.4 Dietas alimentares oferecidas para acompanhamento e desenvolvimento das formas imaturas

À medida que as larvas eclodiam era acrescido ração para alimentá-las até o último estágio pupal e com acompanhamento até a emergência dos insetos adultos. Esse acompanhamento foi realizado diariamente sob estereomicroscópio, com luz fria para evitar a dessecação e morte das larvas; para retirar os fungos que cresciam sobre o alimento, onde as larvas ficam presas, impedindo-as de locomoverem-se e se alimentarem, levando-as à morte.

Foi feito o acompanhamento das formas imaturas (quatro estádios larvais: L1, L2, L3, L4 e um pupal) de *Ny. neivai*.

Para a alimentação das formas imaturas foi utilizada diferentes dietas alimentares, sendo que a dieta 1 é a ração solo, feita da mistura de fezes secas de codorna mais terra vegetal; a dieta 2 é a de levedura, com a utilização de *Saccharomyces cerevisiae*, vitaminas do complexo B. Composto de 2,7 gramas de carboidratos; proteínas: 2,2g; sódio: 2,0mg; cálcio: 44mg; ferro: 0,56mg; vitamina B1: 0,14mg; Niacina: 2,4mg; fósforo: 77mg e potássio: 120mg; a dieta 3 é a de peixe, composta de farelo de soja, farinha de peixe, creme de milho, farinha de lula, adsorvente de micotoxinas, leveduras, óleo de soja refinado, espirulina desidratada, corantes naturais (cochonilha, urucum e cúrcuma) (1,54%), proteínas de soja, premix vitamínico mineral (0,5%), óleo de peixe, fécula de mandioca, cloreto de sódio, beterraba desidratada, farinha de minhoca, premix mineral (0,1%), aditivo probiótico (0,09%), antioxidante (etoxquin, propilgalato ácido cítrico BHABHT), aditivo enzimático (0,05%); a dieta 4 é uma combinação da dieta 1 (solo) mais a de peixe (dieta 3) e a dieta 5, combinação da dieta 1 (solo) mais a dieta 2 (levedura).

As dietas foram preparadas em proporções iguais, triturada, peneirada e autoclavadas.

Foram realizadas 10 repetições para cada dieta alimentar, totalizando 50 amostras para a espécie de flebotomíneo: *Ny. neivai*.

4.4.1 Para *Ny. neivai*

- dieta 1: solo
- dieta 2: de levedura
- dieta 3: de peixe
- dieta 4: da combinação da ração solo mais a de peixe
- dieta 5: da combinação da ração solo mais levedura.

Foram separadas 50 fêmeas que ovipuseram entre 60 a 75 ovos, totalizando 3.517 ovos.

4.5 Emergência dos espécimes adultos

Conforme os adultos iam emergindo, os espécimes de primeira geração (F1) iam sendo transferidos para as gaiolas de criação e, oferecido maçã como fonte de carboidrato (fonte energética) para sobrevivência dos espécimes e para a realização das experimentações de competência vetorial para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com a espécie *Ny. neivai*.

4.6 Testes de incriminação vetorial de *Ny. neivai* para *L. (L.) amazonensis*

Para as experimentações: os testes de suscetibilidade foram utilizados hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis*. e para os testes de transmissão via picada foram utilizados hamsters suscetíveis (não infectados).

Os espécimes machos e fêmeas de *Ny. neivai* (F1) foram separados em gaiolas de criação, conforme iam emergindo. Receberam como fonte de carboidrato apenas maçã e com três dias de idade, fizeram o 1º repasto sanguíneo em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* (= repasto infectivo).

Após quatro dias do repasto infectivo, período para o parasita completar o ciclo de vida dentro do inseto vetor. No 5º dia, os hamsters suscetíveis foram expostos às picadas de fêmeas sobreviventes, supostamente infectadas (teste de transmissão via picada) para a investigação de competência vetorial.

Para a realização dos testes de transmissão via picada de *Ny. neivai* foi realizado da seguinte forma:

- a cada repasto infectivo por gaiola, eram esperados aproximadamente uma hora após o repasto sanguíneo e as fêmeas ingurgitadas (com sangue) eram retiradas com capturador de castro, transferidas e liberadas em novas gaiolas para posteriormente realizarem após quatro dias o repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis.

- foi utilizado um hamster para cada gaiola no teste de transmissão via picada para cada dia: 5º, 6º, 7º, 8º dia e assim por diante, enquanto existissem fêmeas vivas, ingurgitadas do repasto infectivo.

- os hamsters suscetíveis foram expostos às picadas de fêmeas de *Ny. neivai* para a investigação de competência vetorial da espécie.

À medida que as fêmeas F1 provenientes das experimentações foram morrendo, as mesmas foram dissecadas para observação de protozoários flagelados e acondicionadas em tubos de polietileno (Eppendorf de 1,5 mL) com álcool isopropílico para análise molecular.

4.6.1 Procedimento a cada etapa do teste de suscetibilidade e de transmissão via picada

Devido os flebotomíneos estarem aptos a realizarem o repasto sanguíneo entre dois a três dias, após a emergência, diariamente os espécimes de *Ny. neivai* (F1) que iam emergindo, independentemente, de qual dieta, os espécimes machos e fêmeas foram transferidos para as gaiolas de criação e aguardado período de três dias após a emergência, hamster experimentalmente infectado foi colocado dentro da gaiola para que as fêmeas realizassem o primeiro repasto infectivo.

4.6.1.1 Primeiro repasto infectivo

Conforme os espécimes foram emergindo, foram transferidos para a gaiola receptora - gaiola 1 (G1). No dia 30 foi colocado um hamster experimentalmente infectado por *L. (L.) amazonensis* (Figura 6A) para as fêmeas F1 de *Ny. neivai* realizarem o repasto infectivo. As ingurgitadas foram transferidas para nova gaiola (G1-A) para o 2º repasto sanguíneo em hamster suscetível (não infectado).

No 5º dia, quatro dias após o repasto infectivo; as fêmeas ingurgitadas sobreviventes foram submetidas a novo repasto - o 2º repasto (repasto suscetível) e foram retiradas da gaiola G1-A (Figura 6B) e dissecadas para observação de protozoários flagelados.

Os espécimes que iam emergindo foram transferidos para a gaiola receptora G1. Os espécimes mortos (machos e fêmeas) também foram retirados diariamente e assim sucessivamente eram submetido novamente hamster infectado para que novas fêmeas fizessem o repasto infectivo.

4.6.1.2 Segundo repasto infectivo

No dia 03 (três) de Novembro, um novo repasto infectivo, com fêmeas que se ingurgitaram e foram transferidas para G1-B (Figura 6C). Para o 2º repasto em hamster suscetível, dia (08/11) restou apenas uma (1) fêmea das ingurgitadas e não realizou o repasto.



Figura 6. (A) Hamster experimentalmente infectado por *L. (L.) amazonensis* exposto às picadas de F1 de *Ny. neivai*. (B) G1-A Fêmeas ingurgitadas do repasto infectivo. (C) Hamster exposto às picadas de fêmeas ingurgitadas do repasto infectivo da G1-B.

4.6.1.3 Terceiro repasto infectivo

Dia 08 (oito) de Novembro, novo repasto infectivo com fêmeas que realizaram o repasto. Das fêmeas ingurgitadas, nenhuma fêmea fez o repasto. E nos dias seguintes também nenhuma fêmea ingurgitada do repasto infectivo fez o 2º repasto sanguíneo.

4.7 Aspectos éticos e de biossegurança

O presente trabalho é subordinado ao projeto e Tese de doutorado de Magda Freitas Fernandes, submetido e aprovado em 2012, pelo Comitê de Conduta Ética

em Pesquisa Animal da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), conforme normas da Resolução Nº 196, de 10 de outubro de 1996.

Conforme mencionado na metodologia, os flebotomíneos foram mantidos em local adequado e protegido contra a fuga. Após a alimentação em hamsters infectados por *L. (L.) amazonensis*, os insetos permaneceram em gaiolas de criação acondicionadas em caixa de isopor na sala de criação de insetos vetores (insetário), do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPG-ECB), FCBA/UFGD.

Os hamsters expostos às picadas de fêmeas de flebotomíneos, infectados ou não, foram mantidos em segurança, isolados em caixas próprias com alimento e água *ad libidum*, no biotério do PPG-ECB, FCBA/UFGD.

Após o término dos experimentos, o descarte dos animais eutanasiados foi segundo as normas de biossegurança preconizadas pela UFGD.

4.9 Análise estatística

Para avaliar a homogeneidade no período de emergência dos espécimes de flebotomíneos foi feito a análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as dietas pelo teste de Tukey, utilizando o software de acesso livre R (R Development Core Team 2009), pacote Vegan (OKSANEN *et al.*, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Nyssomyia neivai*

Foram individualizadas 426 fêmeas selvagens. Foram identificadas e 100% foi *Ny. neivai*. 389 fêmeas ovipuseram e apenas 37 fêmeas não ovipuseram.

A média de ovos foi de 70,3 ovos para a dieta 1 (solo); 70,5 para dieta 2 (levedura); 70,6 para dieta 3 (peixe); 70,2 para dieta 4 (solo + peixe) e 70,1 ovos para dieta 5 (solo + levedura). A média geral total foi de 70 ovos.

O ciclo gonotrófico de *Ny. neivai*, período compreendido entre o repasto sanguíneo e a postura dos ovos, foi de quatro (4) dias (Tabela 1).

Tabela 1. Número absoluto de ovos por fêmea e a média de ovos por dieta e a média geral e a duração em dias do ciclo gonotrófico de *Nyssomyia neivai*.

Nº da Placa	Dieta	Nº de ovos	média		Dta Postura	nº de dias	CG	CG
			por dieta	média total				
1	solo	68			17/09/2014	5		
2		72			15/09/2014	3		
3		62			15/09/2014	3		
4		68			15/09/2014	3		
5		64			15/09/2014	3		
6		76			15/09/2014	3		
7		77			16/09/2014	4		
8		68			15/09/2014	3		
9		71			16/09/2014	4		
10		77			17/09/2014	5		
Subtotal		703	70,3				3,600000	4
11	levedura	72			16/09/2014	4		
12		76			16/09/2014	4		
13		76			15/09/2014	3		
14		76			15/09/2014	3		
15		69			17/09/2014	5		
16		67			15/09/2014	3		
17		63			17/09/2014	5		
18		69			16/09/2014	4		
19		67			16/09/2014	4		
20		70			16/09/2014	4		
Subtotal		705	70,5				3,900000	4
21	Peixe	70			15/09/2014	3		
22		77			15/09/2014	3		
23		67			17/09/2014	5		
24		72			16/09/2014	4		
25		68			15/09/2014	3		
26		65			15/09/2014	3		
27		68			17/09/2014	5		
28		75			15/09/2014	3		
29		70			15/09/2014	3		
30		74			15/09/2014	3		
Subtotal		706	70,6				3,500000	4
31	Solo + levedura	67			15/09/2014	3		
32		72			15/09/2014	3		
33		70			17/09/2014	5		
34		72			15/09/2014	3		
35		75			16/09/2014	4		
36		68			16/09/2014	4		
37		72			15/09/2014	3		
38		67			15/09/2014	3		
39		65			16/09/2014	4		
40		73			15/09/2014	3		
Subtotal		701	70,1				3,500000	4
41	solo + peixe	68			16/09/2014	4		
42		67			15/09/2014	3		
43		77			15/09/2014	3		
44		72			16/09/2014	4		
45		70			16/09/2014	4		
46		67			15/09/2014	3		
47		75			15/09/2014	3		
48		68			16/09/2014	4		
49		71			15/09/2014	3		
50		67			15/09/2014	3		
Subtotal		702	70,2		70,2		3,400000	3
TOTAL		3517		70				4

CG = duração do ciclo gonotrófico (média).

A média geral para a emergência de espécimes adultos para a espécie *Ny. neivai* foi de 51 dias. E a média por data de emergência para cada dieta variou entre

42 a 66 dias. Emergiram 173 espécimes, dos quais 68 machos e 95 fêmeas e 10 espécimes não foram identificados o sexo (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Número absoluto de espécimes emergidos por sexo e a média de emergência por dieta e período.

Emergência de adultos						
Data RepS	Data Emergência	Dieta	Espécimes adultos		Nº dias	
			♂	♀		
12/09/2014	24/10/2014	levedura	1		42	
		peixe	6		42	
	26/10/2014	peixe	3		44	
	27/10/2014	peixe		1	45	
		solo + peixe		3	45	
		solo + levedura		2	45	
	28/10/2014	peixe	1	2	46	
		solo + peixe	2	1	46	
		solo + levedura		4	46	
	29/10/2014	solo	1		47	
		peixe	7	4	47	
		solo + peixe	1		47	
		solo + levedura		3	47	
	30/10/2014	solo	2	2	48	
		peixe	2	5	48	
		solo + peixe	2	1	48	
		solo + levedura	1		48	
	31/10/2014	solo	4	3	49	
		peixe	4	8	49	
		solo + peixe	3	2	49	
	01/11/2014	solo	5	2	50	
		peixe	1	1	50	
		solo + peixe	3	7	50	
	02/11/2014	solo	8	3	51	
		peixe	1	1	51	
		solo + peixe	1	12	51	
	03/11/2014	solo	8		52	
		peixe		2	52	
		solo + peixe	2	4	52	
	04/11/2014	solo	2	2	53	
		peixe	1		53	
	05/11/2014	solo	1	2	54	
		peixe	1		55	
	06/11/2014	solo + peixe		1	55	
		solo	1	7	57	
	08/11/2014	peixe		1	57	
		solo + peixe		1	57	
		solo		4	58	
	11/11/2014	solo	1	1	60	
	12/11/2014	solo	1	2	61	
	13/11/2014	solo		1	62	
	17/11/2014	solo	1		66	
Subtotal			10	68	95	51
TOTAL GERAL			173			

RepS = Repasto sanguíneo.

Tabela 3. Número total de espécimes que emergiram por dieta e por período.

Data RepS	Data Emergência	DIETAS										
		Solo		Peixe		Solo + P		Solo + L		Lev		Nº dias
		n	Mdias	n	Mdias	n	Mdias	n	Mdias	n	Mdias	
12/09/2014	24/10/2014	-	-	6	42	-	-	-	-	-	-	
	26/10/2014	-	-	3	42	-	-	-	-	1	42	44
	27/10/2014	-	-	1	45	3	45	2	45	-	-	45
	28/10/2014	-	-	3	46	3	46	4	46	-	-	46
	29/10/2014	1	47	11	47	1	47	3	47	-	-	47
	30/10/2014	4	48	7	48	3	48	1	48	-	-	48
	31/10/2014	7	49	12	49	5	49	-	-	-	-	49
	01/11/2014	7	50	2	50	10	50	-	-	-	-	50
	02/11/2014	11	51	2	51	13	51	-	-	-	-	51
	03/11/2014	8	52	2	52	6	52	-	-	-	-	52
	04/11/2014	4	53	1	53	-	-	-	-	-	-	53
	05/11/2014	3	54	-	-	-	-	-	-	-	-	54
	06/11/2014	-	-	1	55	1	55	-	-	-	-	55
	08/11/2014	8	57	1	57	1	57	-	-	-	-	57
	09/11/2014	4	58	-	-	-	-	-	-	-	-	58
	11/11/2014	2	60	-	-	-	-	-	-	-	-	60
	12/11/2014	3	61	-	-	-	-	-	-	-	-	61
	13/11/2014	1	62	-	-	-	-	-	-	-	-	62
	17/11/2014	1	66	-	-	-	-	-	-	-	-	66
TOTAL GERAL		64		52		46		10		1		

As larvas da dieta 2 (levedura) chegaram aparentemente bem (D) ao 4º estágio (L4), em relação às outras larvas das outras dietas, no entanto morreram praticamente todas, antes de empuparem, exceto um único espécime que emergiu (Figura 7).

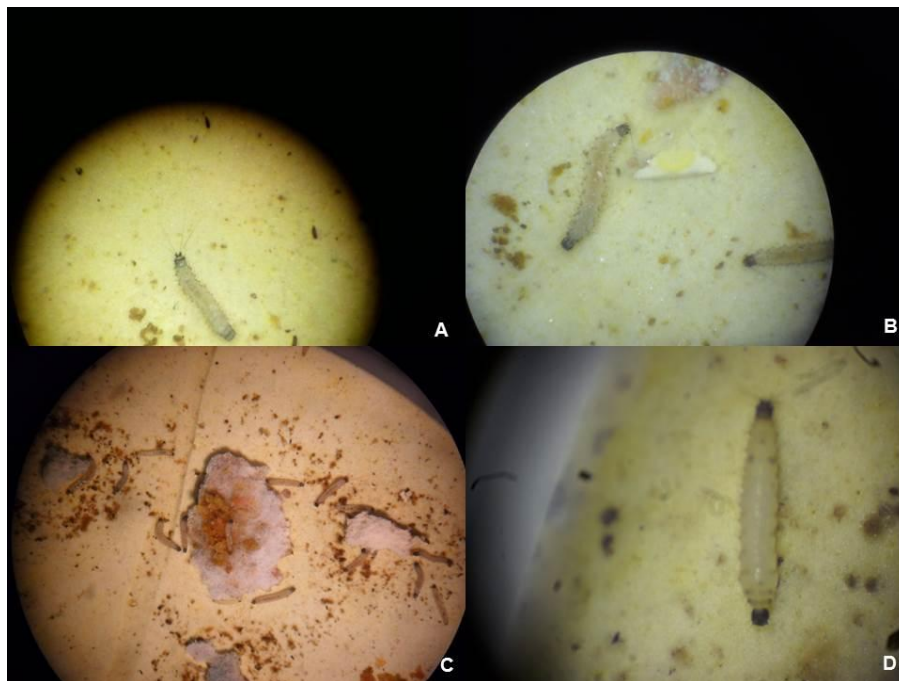


Figura 7. Larvas do 4º estágio (L4) de *Ny. neivaidis* diferentes dietas. (A) Dieta 1 (solo). (B) Dieta 3 (peixe). (C) Dieta 4 (solo + peixe) e (D) Dieta 2 (levedura).

Este fato provavelmente deve-se ao fato da dieta 2 (levedura) proporcionar um rápido desenvolvimento das larvas de L1 a L4, no entanto, não há nutrientes proteicos em sua composição que garantam a muda para a fase pupal devido a insuficiência de proteínas para a quitinização desta fase e conseqüentemente a emergência de espécimes adultos.

Na dieta 2 (levedura), praticamente não houve emergência

As diferentes dietas oferecidas para as formas imaturas (larvas) de *Ny. neivai* com o objetivo de avaliar a melhor dieta que proporcionasse uma homogeneização do período de emergência dos espécimes com a finalidade de estudos de competência vetorial; a dieta 1 (solo) sempre houve emergência no período de 25 dias. E entre a dieta 1 e as outras três dietas: dieta 3 (peixe), a dieta 4 (solo + peixe) e dieta 5 (solo + levedura), houve diferença significativa de $p < 0,05\%$ (Figura 8).

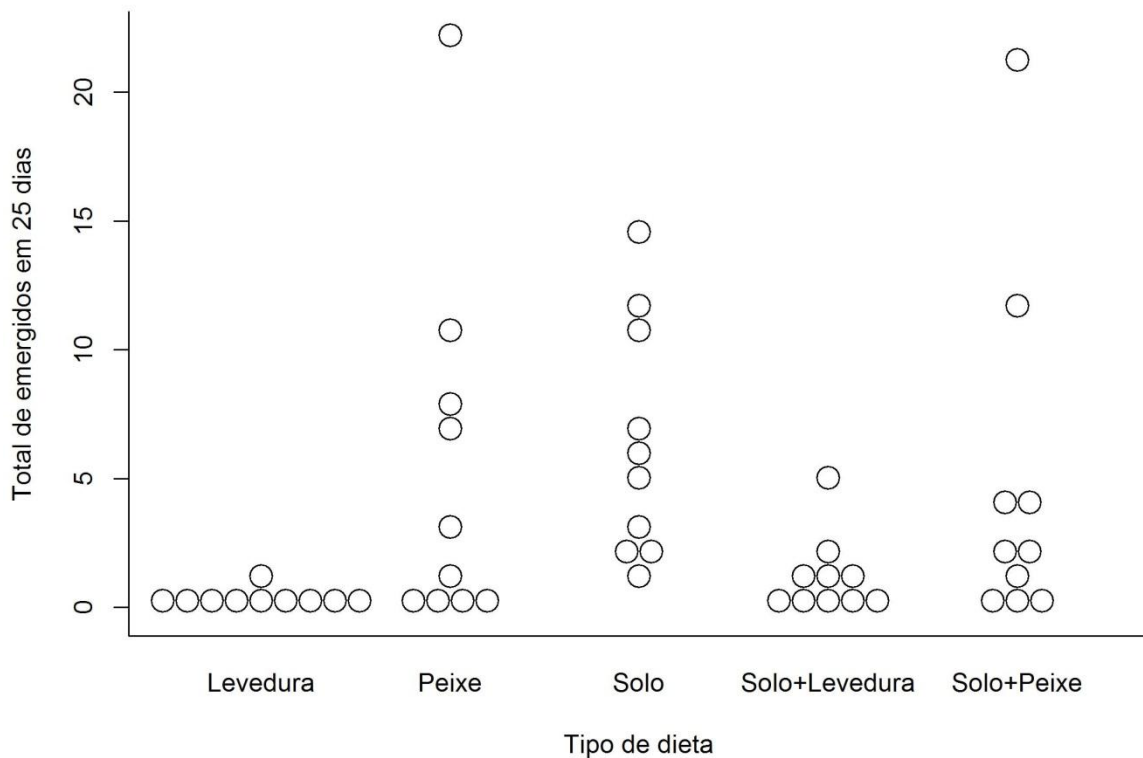


Figura 8. Comparativo entre os totais de espécimes de *Nyssomyia neivai* que emergiram em 25 dias para cada uma das repetições (10 repetições por dieta).

5.2.1 Testes de incriminação vetorial de *Ny. neivai* para *L. (L.) amazonensis*

5.2.1.1 Primeiro repasto infectivo

Os espécimes da gaiola receptora - gaiola1 (G1) que foram submetidos à hamster experimentalmente infectado por *L. (L.) amazonensis*, 31 fêmeas fizeram o repasto infectivo. E no 5º dia, quatro (4) fêmeas fizeram o 2º repasto sanguíneo em hamster suscetível (não infectado) e foram retiradas da gaiola G1-A e dissecadas para observação de protozoários flagelados. Em uma fêmea foi observado parasitas flagelados nas formas metacíclicas infectantes.

O hamster exposto (M3) às picadas de fêmeas infectadas de *Ny. neivai* morreu seis dias após.

O hamster e os flebotomíneos provenientes dos testes de suscetibilidade e de transmissão via picada ainda serão submetidos a análise molecular pela PCR-RFLP, com a enzima de restrição Hae III.

5.2.1.2 Segundo repasto infectivo

Do repasto infectivo, 10 fêmeas se ingurgitaram, transferidas para G1-B. Para o 2º repasto em hamster suscetível, restou apenas uma (1) fêmea das ingurgitadas e não realizou o repasto.

5.2.1.3 Terceiro repasto infectivo

18 fêmeas fizeram o repasto infectivo. Das 18 fêmeas ingurgitadas, restaram seis (6) para o 2º repasto (no 5º dia). No entanto, nenhuma fêmea fez o repasto.

No dia seguinte (6º dia), também não fizeram o 2º repasto sanguíneo, nem no 7º dia. Para o 8º dia, as quatro (4) fêmeas restantes morreram e não possível avaliar se fariam o 2º repasto suscetível.

Ao total foram 59 fêmeas que fizeram o repasto sanguíneo em hamster experimentalmente infectado por *L. (L.) amazonensis* (repasto infectivo). E quatro fêmeas conseguiram fazer o 2º repasto sanguíneo (repasto suscetível).

6 CONCLUSÕES

Baseado nos objetivos propostos e na análise dos resultados obtidos, conclui-se, portanto, que a dieta 1 (solo) foi a amostra que ofereceu maior homogeneidade na emergência dos adultos de *Nyssomyia neivai*, tendo emergidos adultos durante os 25 dias de avaliação. Visto que, obtendo-se um número suficiente de fêmeas é possível realizar experimentos que possam incriminar uma espécie de flebotomíneo em relação à transmissão de *Leishmania* spp.

7 REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, A.C.R.; LUZ S.L.B.; VILELA M.L.; RANGEL E.F. 1993. Studies on the sandfly fauna of Samuel Ecological Station, Porto Velho Municipality, Rondônia State, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 88(4):509-512.
- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; FORTES-DIAS, C.L.; COSTA, R.T.; SILVA, J.C.; VIEIRA, E.P.; PRATA, A.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. 2004. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, na endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 99:481-487.
- BARBOSA GM, MARZOCHI MCA, MASSARD CL, LIMA GPS, CONFORT EM. 1999. Epidemiological aspects of canine American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 15:641-646.
- BRASIL. 2007. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília: Ministério da Saúde, 180p.
- CIPA GROUP. 1993. A programme for computer aided identification of phlebotomine sandflies of the America (Cipa) – presentation and check-list of American species. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 88(2):221-230.
- DEDET, J.P. 1993. *Leishmania* et leishmanioses du contiente américan. *Annales de L' Institute Pasteur*, 4 :3-25.
- DYE, C., DAVIES, C.R. & LAINSON, R. 1991. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. *Animal Behaviour*, 42 :183-192.
- FERNANDES, M. F. 2014. Competência vetorial de *Nyssomyia whitmani* (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae) para *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [Tese de Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade], Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados-MS, Brasil.
- FERNANDES, M.F.; SANTOS, K.M.; FERRARI JÚNIOR, A.C.; LEVAY, A.P.S.; NEGRÃO, F.J.; FERNANDES, W.D.; OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.M.C.; ANDRADE FILHO, J.D.; OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.B. 2014. Vector competence of *Nyssomyia whitmani* (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae) to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. ISOPS VIII – International Symposium on Phlebotomine Sandflies. Porto Iguazú, Misiones, Argentina. In: **Abstract Book, ISOPS VIII**, ID 101-P *Vector competence & Infections*, p. 238.
- FORATTINI, O.P. 1973. Entomologia médica. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp, v.4, 658p.

FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; SERRA, O.P.; COTRIM, M.D.; GALATI, E.A.B.; BARATA, J.M.S. 1976. Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 10:31-43.

GALATI, E.A.B. 2003. Morfologia e taxonomia. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. & Lainson, R. (orgs.). Rio de Janeiro: Fiocruz, p.23-51. 367p.

GALATI, E.A.B. 2014. *Classificação de Phlebotominae*. Apostila da disciplina HEP 5752 do Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública. São Paulo, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública/USP. <www.fsp.usp.br/~egalati>.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.M.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; GONÇALVES-ANDRADE, R.M.; NAUFEL, G. 2001. Attractiveness of Black Shannon Trap for Phlebotomines. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5):641-647.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; BOGGIANI, P.C.; DORVAL, M.E.M.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; OSHIRO, E.T.; DAMASCENO-JUNIOR, G.A. 2006. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 101(2):175-193.

GOMES, A.C.; BARATA, J.M.S.; ROCHA E SILVA, E.O.; GALATI, E.A.B. 1989. Aspectos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropofila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 31:32-39.

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

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

KILLICK-KENDRICK, R. 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17:279-289.

LANE, R.P., PILE, M.M. & AMERASINGHE, P. 1990. Anthropophagy and aggregation behaviour of the sandfly *Phlebotomus argentipes* in Sri Lanka. *Medical and Veterinary Entomology*, 4:79-88.

LEITE, ACR. WILLAMS, P. 1996. Description of the fourth instar larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microscopy. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 91:571-578.

MARCONDES, C.B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. *Entomological News*, 118(4):351-356.

- MARCONDES, C.B. 2011. Entomologia médica e veterinária. 2 ed. São Paulo: Atheneu. 526p.
- MARZOCHI, M.C.A. 1989. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: Grandes Endemias Brasileiras. Editora Universidade de Brasília, DF.
- OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; O'HARA, B.; SIMPSON, G.L.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; WAGNER, H. 2009. Vegan: Community Ecology Package, R Package Version 1.15-4. Disponível em: <<http://www.CRAN.R-project.org/package=vegan>>
- OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G.R.; ESPÍNDOLA, I.A.C.; DORVAL, M.E.M.C.; BRAZIL, R.P. 2006. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 101(8):869-874.
- PETERKOVA-KOCI, K.; ROBLES-MURGUIA, M.; RAMALHO-ORTIGAO, M.; ZUREK, L. 2012. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Parasites & Vectors. 5:145-153.
- PINTO, M.C.; CAMPBELL-LENDRUM, D.H.; LOZOVEI, A.L.; TEODORO, U.; DAVIES, C.R. 2001. Phlebotominesandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. Medical and Veterinary Entomology, 15:132-139.
- RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; BARBOSA, A.F.; ANDRADE, C.A. 1986. Biologia de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. I. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 81(4):431-438.
- SHANNON, R. 1939. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. American Journal of Tropical Medicine, 19:131-148.
- SHERLOCK, I.A. 2003. Importância médico-veterinária: a importância dos flebotomíneos. In: Flebotomíneos do Brasil, Rangel, E.F. & Lainson, R. (org.) Rio de Janeiro: Fiocruz. p.15-22.
- TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ELIAS, C.R. & LAROSA, R. 2001. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. Revista Instituto Adolfo Lutz, 60(1):47-51.
- WARD, R.D., MORTON, I.A., BRAZIL, R.P., TRUMPER, S. & FALCÃO, A.L. 1990. Preliminary laboratory and field trials of a heated pheromone trap for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 85:445-452.