

WAGNER ALEXANDRE COSTA

MORFOLOGIA DE IMATUROS DE *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912) E *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (PINTO, 1926) (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE), VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Entomologia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VICOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

WAGNER ALEXANDRE COSTA

MORFOLOGIA DE IMATUROS DE *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912) E *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (PINTO, 1926) (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE), VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Entomologia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 28 de abril de 2009.

Carolina Nascimento Siegel

Elizabeth Ferreira Rangel

Gustavo Ferreira Martins

Rubens Pinto de Mello

José Eduardo Serrão

Dedico a todos aqueles que eu amo,
em especial Eunice Costa, Nilza Couto, Selma Nair do Couto Corrêa;
À toda a minha família;
Aos meus amigos.

Só de Sacanagem

Meu coração está aos pulos!

Quantas vezes minha esperança será posta à prova?

Por quantas provas terá ela que passar? Tudo isso que está aí no ar, malas, cuecas que voam entupidas de dinheiro, do meu, do nosso dinheiro que reservamos duramente para educar os meninos mais pobres que nós, para cuidar gratuitamente da saúde deles e dos seus pais, esse dinheiro viaja na bagagem da impunidade e eu não posso mais.

Quantas vezes, meu amigo, meu rapaz, minha confiança vai ser posta à prova?

Quantas vezes minha esperança vai esperar no cais?

É certo que tempos difíceis existem para aperfeiçoar o aprendiz, mas não é certo que a mentira dos maus brasileiros venha quebrar no nosso nariz.

Meu coração está no escuro, a luz é simples, regada ao conselho simples de meu pai, minha mãe, minha avó e os justos que os precederam: "Não roubarás", "Devolva o lápis do coleguinha", "Esse apontador não é seu, minha filha". Ao invés disso, tanta coisa nojenta e torpe tenho tido que escutar.

Até habeas corpus preventivo, coisa da qual nunca tinha visto falar e sobre a qual minha pobre lógica ainda insiste: esse é o tipo de benefício que só ao culpado interessará. Pois bem, se mexeram comigo, com a velha e fiel fé do meu povo sofrido, então agora eu vou sacanear: mais honesta ainda vou ficar.

Só de sacanagem! Dirão: "Deixa de ser boba, desde Cabral que aqui todo mundo rouba" e vou dizer: "Não importa, será esse o meu carnaval, vou confiar mais e outra vez. Eu, meu irmão, meu filho e meus amigos, vamos pagar limpo a quem a gente deve e limpo do nosso freguês. Com o tempo a gente consegue ser livre, ético e o escambau."

Dirão: "É inútil, todo o mundo aqui é corrupto, desde o primeiro homem que veio de Portugal". Eu direi: Não admito, minha esperança é imortal. Eu repito, ouviram? Imortal! Sei que não dá para mudar o começo mas, se a gente quiser, vai dar para mudar o final!

Elisa Lucinda

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela graça da tarefa cumprida, enfim por tudo quanto vi, senti e aprendi;

À Eunice Costa que me deu a luz e me ensinou o amor incondicional. De sua existência resta comigo o exemplo, a saudade imensa, o eterno agradecimento, além do pesar por não poder abraçá-la e partilharmos juntos da alegria da tarefa cumprida. Porém tendo a certeza que se foi porque Deus quer daqui o melhor para sua companhia;

À Nilza Couto e Selma Nair do Couto Corrêa que me ensinaram a viver a vida com dignidade, que se doaram inteiras e renunciaram aos seus sonhos para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus;

À minha família que contribuiu de alguma forma para o meu êxito, compreendendo minha ausência, compartilhando meus ideais incentivando-me a prosseguir, com um sorriso amigo, uma palavra de carinho e o amor dedicado;

À Dr^a Elizabeth Ferreira Rangel, do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, não só pela orientação, ensinamento, amizade, parceria, mas acima de tudo pela confiança sempre.

À Dr^a Jacenir Mallet, do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose/ Núcleo de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, pela orientação, ensinamento, amizade.

À Dr^a Eunice Galati da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela orientação, ensinamento, colaboração e amizade.

Ao Dr. Claudio Casanova da Sucen/São Paulo, pela colaboração e disponibilidade

À Direção da Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Prof. José Eduardo Serrão, do Departamento de Biologia Geral, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, pela orientação, dedicação, confiança e amizade;

Aos professores da Pós- Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, que muito contribuíram para minha formação;

Aos amigos conquistados durante o programa de Pós-Graduação e na estada em Viçosa, em especial Ângela, Bia, Carina, Carla, Carlos, Cassiano, César, Claudiney, Daniel, Denis, Edalto, Eltamara, Fábila, Geane, Harvey, Iracenir, Iva, Jane, Joana, Lino, Luiz, Luisa, Marcelo, Nandão, Neucir, Sabrina, Silma, Tati, Tatiane, Xanda, Vinicius.

Às secretárias do programa da Pós- Graduação em Entomologia, D. Paula e Miriam, pela presteza e atenção demonstrados;

Às secretárias do DBG, Beth, Diana, Rose e Salvadora, pela boa vontade e disponibilidade em ajudar, e ao Monteiro, pelo apoio técnico e amizade.

À Bióloga Simone Patrícia de Freitas e ao técnico Adalberto José da Silva do Setor de Morfologia, Ultraestrutura e Bioquímica de Artrópodes e Parasitos, pelo apoio, colaboração e amizade.

À Bióloga Simone M. da Costa, do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Instituto Oswaldo Cruz, pela colaboração, amizade e apoio.

À todos do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelos ensinamentos, pela confiança, pelo incentivo e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Biofísica, Agna, Carolina, Cirlei, Dihego, Douglas, Luisa, Madu, Maria Ignês, Riviane, Stefane.

Aos amigos de república pela convivência inusitada, Marcinho, Samuel, Theo, Trigão, Vitor.

Aos vizinhos legais pelos momentos de alegria e lazer, Bethânia, Carol, Débora, Fabrício, Gisele Plural, Kênia, Lorena, Mirna, Natália, Samuel, Verônica.

À Angela Lúcia de Carvalho, Ester Lúcia e Simone Tavares Marujo, secretárias do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio e pelo apoio nos momentos solicitados.

Aos meus erês pela luz no caminho, Bentinho, Bianca, Bruno, Camile, Eric, Fernandinha, Igor, Isabela, Kayo, Lucas, Lucão, Nathália, Rodrigo, Tâmires, Tutu, Vinicius, Vitor Hugo.

A minha família do 1059, Ana Cláudia e família, Lenira, Ro, Dedé e filhos, Rosa & Tatá e filhos, Rosângela e filhos, Sandra & Silvestre e filhos, Adilma e família.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

Aos amigos e colegas por me ensinarem a acreditar na humanidade e pela pureza de seus corações.

“Amigo é alguém diante de quem você é você mesmo...”

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	1
I. As Leishmanioses.....	1
II. As Leishmanioses no Novo Mundo.....	2
III. As Leishmanioses no Brasil.....	3
IV. <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> (Lutz & Neivai, 1912) e <i>Lutzomyia</i> (<i>Nyssomyia neivai</i> (Pinto,1926)).....	6
V. <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> (Lutz & Neivai, 1912) e <i>Lutzomyia</i> (<i>Nyssomyia neivai</i> (Pinto,1926) e a transmissão da <i>Leishmania (Viannia)</i> <i>braziliensis</i>	8
VI. A Taxonomia de Phlebotoninae.....	10
2. Relevância.....	12
3. Objetivos.....	14
4. Materiais e Métodos.....	15
5. Resultados.....	17
5.1. Tabelas I.....	21
6. Discussão.....	40
7. Conclusão.....	45
8. Referências Bibliográficas.....	46

RESUMO

COSTA, Wagner Alexandre, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2009.

Morfologia de imaturos de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): vetores de leishmaniose tegumentar no Brasil. Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadoras: Elizabeth Ferreira Rangel, Jacenir Reis dos Santos Malllet e José Cola Zanuncio.

Os flebotomíneos, vetores das leishmanioses, são identificados e classificados pela morfologia dos insetos adultos, existindo poucos conhecimentos de caracteres das formas imaturas. Das 500 espécies Neotropicais descritas, somente 66 espécies tem suas formas imaturas estudadas. Visando avaliar a importância de alguns caracteres taxonômicos dos estádios imaturos de flebotomíneos, estudos morfológicos foram realizados em *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *L. (N.) neivai*, transmissores de *Leishmania (V.) braziliensis*, de populações procedentes dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, que durante alguns anos estiveram em sinonímia e têm apontado certo grau de introgressão. Em *L. (N.) neivai* pode-se observar um maior número de tubérculos formando uma ou mais fileiras, quando comparados aos observados no exocócion de *L. (N.) intermedia*. Em características gerais, as larvas, das duas espécies, apresentaram-se bastante semelhantes. Porém, as larvas do primeiro estágio revelaram diferenças significativas com relação aos outros estádios evolutivos, destacando a presença de *egg buster*, o tamanho das antenas e o número de cerdas caudais. O uso destes caracteres não se traduziu em uma boa ferramenta para separação das espécies objeto do nosso estudo.

ABSTRACT

COSTA, Wagner Alexandre, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2009.

Morphological study of immature forms of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Pinto, 1926) : (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vectors of leishmaniasis in Brazil. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Elizabeth Ferreira Rangel, Jacenir Reis dos Santos Mallet and José Cola Zanuncio.

The sandfly are diseases caused by protozoa, intracellular binding, plagued heteroxenic, pathogenic to humans, belonging to the genus *Leishmania* Ross., These are considered serious human protozoan public health problems worldwide, affecting indiscriminately men, women and children, causing different clinical manifestations. Its distribution reaches the tropical and subtropical regions of America, Africa, Asia, Europe. According to the World Health Organization (WHO), we observed the occurrence of this disease in 88 countries, of which 16 are developed. Currently it is estimated there, worldwide, around 350 million people in areas at risk of both leishmaniasis (WHO, 2006). In the Americas, the visceral and cutaneous leishmaniasis, have wide distribution, with records of cases from the extreme south of the United States to northern Argentina, with the exception of Chile and Uruguay. The visceral leishmaniasis occurs from Mexico to Argentina, however, was not registered yet, Uruguay, in the Andean countries, Chile, Peru, Ecuador, and northern South America, French Guiana, Guyana and Suriname (LAISON & Shaw, 1998). In the Brazilian territory, the leishmaniasis are included in the list of diseases that make up the Schengen Information System Diseases of Compulsory Notification (SNDC), and Brazil considered the country with the highest prevalence of these

INTRODUÇÃO

I. As Leishmanioses

São enfermidades causadas por leishmânias, que são protozoários flagelados heteroxenos, intracelulares obrigatórios, patogênicos ao homem, pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Peters & Killick-Kendrick 1987).

As leishmânias apresentam duas formas básicas em seu ciclo de vida: as promastigotas, que se desenvolvem a partir de amastigotas e se multiplicam no trato digestivo do inseto vetor, o hospedeiro invertebrado; as amastigotas, que são formas localizadas no interior de células do sistema fagocitário mononuclear de várias espécies de mamíferos, os hospedeiros vertebrados (Rey, 2001).

As leishmanioses como protozooses humanas são consideradas graves problemas de saúde pública mundial, pois acometem indistintamente homens, mulheres e crianças, determinando diferentes manifestações clínicas. Sua distribuição envolve as regiões tropical e subtropical da América, África, Ásia, Europa e Oceania. Segundo a Organização Mundial de Saúde, sendo consideradas como umas das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção, registro de óbitos e capacidade de produzir deformidades, sendo constatada a ocorrência destes agravos em 88 países, dos quais 16 são desenvolvidos. Atualmente estima-se existir, em nível mundial, cerca de 350 milhões de pessoas em áreas de risco (OMS, 2006).

São registradas 22 espécies de *Leishmania* que infectam o homem, sendo 15 de ocorrência nas Américas (Grimaldi Jr et al.; 1991; Shaw 1994; Ashford 2000; Silveira et al. 2002).

Os reservatórios de leishmânias são, principalmente, mamíferos silvestres pertencentes à diversas ordens tais como: Carnívora, Rodentia, Marsupialia, Edentata, Primata e Artiodactyla, que representam um dos elos da cadeia primária de transmissão,

servindo como fonte de infecção para flebotomíneos, e assim mantendo o ciclo silvestre (Lainson & Shaw, 1998).

As leishmânias são veiculadas através das picadas dos insetos vetores, os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (Rey, 2001).

Os flebotomíneos representam um grupo com cerca de 900 espécies conhecidas no mundo, das quais cerca de 500 foram descritas da América (Young & Duncan, 1994).

Para a Entomologia Médica, são de particular interesse as espécies antropofílicas, pois além de causarem incômodo à população humana, podem lhes transmitir agentes infecciosos, tais como as leishmânias, agentes das leishmanioses. Dentre as espécies conhecidas, apenas 30 estão relacionadas com a transmissão das leishmanioses (Rangel & Lainson 2003; OMS 2006).

Os flebotomíneos são responsáveis, também, pela transmissão de uma moléstia que acomete as populações dos Andes Peruanos, a bartonelose ou “verruca peruana”, e estão igualmente implicados na transmissão de algumas arboviroses humanas e de outros vertebrados (Rey, 2001)

Segundo Young & Duncan (1994), dos gêneros encontrados no Velho Mundo, *Phlebotomus* Rondoni & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius*, Leng, 1987, apenas as espécies do gênero *Phlebotomus* estão envolvidas na transmissão das leishmanioses humanas. No Novo Mundo, também, são reconhecidos três gêneros *Lutzomyia* França, 1924, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948, dos quais somente as espécies do gênero *Lutzomyia* transmitem as leishmanioses ao homem.

II. As Leishmanioses no Novo Mundo

No Continente Americano, as leishmanioses tegumentar e visceral estão amplamente distribuídas, com registros de casos humanos e/ou caninos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Lainson & Shaw, 1998).

Nas Américas, as leishmanioses apresentam basicamente duas formas clínicas: tegumentar e visceral.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) associa-se a uma diversidade de leishmânias dermatrópicas (dos sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*) e manifesta-se clinicamente através de diferentes aspectos: lesão cutânea localizada, lesões múltiplas, lesões cutâneo-mucosa e a cutâneo-difusa, esta última principalmente em pacientes imunodeprimidos, que desenvolvem processos anérgicos (Brasil, 2007). Dentre os países do continente americano, o Brasil, juntamente com Afeganistão, Arábia Saudita, Irã, Peru e Síria concentram mais de 90 % dos casos desta forma clínica (OMS, 2006). No Brasil, sua transmissão é descrita em todas as unidades federadas sendo notificada em diversos municípios (cerca de 50%) (Brasil, 2007).

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) está concentrada na Venezuela, Bolívia e Brasil, e tem tido, mais recentemente, sua clínica agravada por conta de indivíduos portadores de HIV (Brasil, 2003; 2006). O Brasil, junto com Bangladesh, Índia e Sudão, provavelmente são responsáveis por cerca de 90% dos casos de LVA registrados mundialmente (OMS, 2006).

III. As Leishmanioses no Brasil.

No território brasileiro, as leishmanioses estão incluídas na lista de doenças que compõem o Sistema de Informação de Doenças de Notificação Compulsória (SINDC), sendo o Brasil considerado o país de maior prevalência destes agravos nas Américas. São consideradas doenças endêmicas emergentes em franca expansão territorial, com magnitude ascendente (Brasil 2003;2006;2007).

A incidência das leishmanioses no Brasil tem aumentado, nos últimos vinte anos, em praticamente todos os estados. Alterações ambientais em várias regiões brasileiras vêm modificando o perfil epidemiológico das leishmanioses, que originalmente eram consideradas como zoonoses de animais silvestres, que acometiam pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, passaram a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas, estando hoje em capitais, inclusive urbanizadas em algumas situações (Lainson 1983; 1988; Rangel 1995; Brasil, 2007). O crescimento migratório, aliado ao processo de assentamentos sem planejamentos nas últimas décadas,

tem propiciado a proliferação de áreas de alto risco de infecção para a população humana, em consequência do desequilíbrio ecológico.

Esta situação tem sido evidenciada em algumas áreas periurbanas de grandes cidades, inclusive com transmissão intradomiciliar na periferia de algumas capitais de estados brasileiros, provavelmente por conta da adaptação de flebotomíneos vetores e reservatórios à áreas impactadas. Surto epidêmicos têm ocorrido em todas as regiões geográficas, relacionados ao processo predatório de colonização. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou uma média de 40 mil novos casos de ambas as leishmanioses no país (Brasil, 2007).

A LVA é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha e Chagas 1937 (Rangel & Lainson, 2003) e nesta manifestação clínica o parasito apresenta tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides, onde são observados processos de hiperplasia e hipertrofia desses órgãos, respectivamente (Rey, 2001). A LVA, é uma doença grave, que sem tratamento adequado ou com diagnóstico tardio pode levar a morte (Brasil, 2003).

No território brasileiro a LVA ocorre em 20 estados e no Distrito Federal, excetuando Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Paraná e Santa Catarina, acometendo cerca de 4.000 pessoas/ano (Brasil, 2007). A doença apresenta dois diferentes padrões epidemiológicos: clássico (zonas rurais) e recente/urbano (capitais e cidades de grande porte) (Brasil 2003; 2007).

A LVA tem como importantes reservatórios as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdoncyon thous*), no ambiente silvestre, e os cães (*Canis familiaris*), no ambiente domiciliar. Algumas evidências têm sugerido os gambás (*Didelphis albiventris* e *D. marsupialis*) como reservatórios de *L. (L.) infantum chagasi* no ambiente rural (Brasil 2007; Afonso 2008). Recentemente também foi identificada a infecção em gato (*Felis catus*) (Savani et al. 2004).

Com relação ao ciclo no hospedeiro invertebrado, a LVA tem como principal vetor *Lutzomyia (L.) longipalpis*. Estudos pioneiros de Deane (1956), no Ceará, já apontavam fortes evidências da competência vetorial deste flebotomíneo, confirmada posteriormente por outros trabalhos (Lainson & Rangel 2005). A espécie *Lutzomyia (L.) cruzi* também tem

sido sugerida como vetor, apenas em alguns municípios dos Estados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Lainson & Rangel 2005, Brasil 2007).

A LTA é registrada em todas as unidades federadas do país, com média anual de 30.000 casos (Brasil, 2007), manifestando-se através de uma diversidade de formas clínicas e patológicas, resultantes, possivelmente, da diversidade parasitária bem como da imunidade dos indivíduos (Lainson & Shaw, 1988, Brasil 2006; 2007).

O quadro clínico do agravo exibe um polimorfismo e um espectro de gravidade, sinais e sintomas variáveis baseado em critérios como fisiopatogenia, aspecto e localização da lesão, que vai desde uma infecção inaparente até a ocorrência de lesão cutânea (Rey, 2001, Brasil, 2005). Tal como na LVA, em portadores de HIV podem surgir aspectos complicadores que resultam numa maior gravidade do quadro clínico (OMS, 1994, Brasil, 2006; 2007).

No Brasil, as espécies de leishmânias dermatrópicas são: *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna 1911, *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch 1954, *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa 1987, *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw 1989, *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira 1989; *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira, Ishikawa, Souza & Lainson 2002 e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 (Rangel & Lainson 2003; Silveira et al. 2002).

A LTA tem nos mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos seus reservatórios, tendo sido até o momento registradas infecções naturais em: roedores silvestres e sinantrópicos (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*, *Proechymis*, *Oryzomys*), felinos (*Felis catus*), canídeos (*Canis familiaris*), marsupiais (*Didelphis albiventris*), edentatas (*Tamandua tetradactyla*, *Choloepus didactylus*, *Dasypodidae*), primatas (*Homo sapiens*, *Chiropotes satanas* e *Cebus apella*), procyonídeos (*Nasua nasua*), cuniculídeo (*Agouti paca*) e eqüídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*). Esses animais participam do ciclo silvestre, e, em algumas situações, são sugeridos como responsáveis pela manutenção do ciclo peridoméstico e urbano, servindo de fonte de infecção para os flebotomíneos vetores (Brasil, 2007).

Dados de observações epidemiológicas e/ou experimentais têm sugerido ou incriminado algumas espécies de flebotomíneos como transmissoras da LTA, em associação com leishmânias dos sub-gêneros *Viannia* e *Leishmania*. Entretanto, apenas algumas espécies têm sido consideradas como importantes vetores, com base em evidências tais como grau de antropofilia, infecção natural por *Leishmania* e distribuição espacial coincidente com a doença (Rangel & Lainson, 2003).

Os flebotomíneos associadas com a transmissão das leishmânias dermatrópicas são *Lutzomyia* (*Nyssomya*) *intermedia* Lutz & Neiva, 1912, *Lutzomyia* (*Nyssomya*) *neivai* Pinto, 1926, *Lutzomyia migonei* França, 1920, *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* Pinto, 1926, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward & Fraiha, 1977, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson, 1971, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *complexa* Mangabeira, 1941, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *ayrozai* Barretto & Coutinho, 1940, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *paraensis* Costa Lima, 1941, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *squamiventris squamiventris* Lutz & Neiva, 1912, *Lutzomyia* (*Trichophoromyia*) *ubiquitalis* Mangabeira, 1942, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *antunesi* Coutinho, 1939, *Lutzomyia* (*Viannamyia*) *tuberculata* Mangabeira, 1941 e *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson, 2003; Pita-Pereira et al. 2008, 2009). Tais flebotomíneos compõem cadeias epidemiológicas distintas, em nichos ecológicos restritos. A *L. (V.) braziliensis*, de mais ampla dispersão no Brasil, tem a sua transmissão associada à *L. (N.) intermedia*, *L. (N.) neivai*, *L. (N.) whitmani*, *L. migonei*, *L. (P.) fischeri*, *L. (Ps.) wellcomei* e *L. (Ps.) complexa*.

Atualmente, são registrados no Brasil três padrões epidemiológicos de transmissão de LTA, que agregam diferentes componentes da cadeia epidemiológica (parasitos, vetores e reservatórios): silvestre (zoonose de animais silvestres e que pode acometer o homem quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo a epizootia), o ocupacional e de lazer (associado à exploração desordenada da vegetação primária e áreas impactadas, ocorrendo sob a forma de surtos epidêmicos) e rural e periurbano (em áreas de colonização antiga, em encostas e na periferia das cidades) (Brasil 2007).

IV. *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neivai, 1912) e *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926)

Lutzomyia (N.) intermedia foi descrita por Lutz & Neiva (1912) a partir de exemplares adultos coletados na Fazenda Ouro Fino, município de Além Paraíba, Minas Gerais. É considerada a primeira espécie descrita na região Neotropical. A espécie foi redescrita em 1996 por Marcondes.

Lutzomyia (N.) neivai foi descrita por Pinto (1926), a partir de um macho capturado dentro de uma residência no Instituto Butantan, Município de São Paulo. Posteriormente, foi considerada como sinônimo de *L.(N.) intermedia* por Pinto (1930), sendo revalidada por Marcondes (1996), com base no holótipo macho e em uma fêmea de Fortim Campero, Departamento de Tarija, Bolívia . Algumas estruturas permitiram distinguir as duas espécies: espermatecas, dutos comuns e dentes horizontais do cibário.

Não havendo registro de nenhuma estrutura morfológica de fácil visualização na cabeça e no tórax que permita separar estas duas espécies, foi sugerida, então, a combinação de caracteres (ausência de cerdas simples em segmentos basais da antena, número de dentes do cibário) e, com um pouco de visibilidade, a distinção entre essas duas espécies poderia ser feita pelos filamentos genitais para os machos e as espermatecas para as fêmeas; utilizam-se, também, dados morfométricos e a coloração do tórax (Marcondes & Borges 2000).

Estes flebotomíneos apresentam grande polimorfismo e variações interpopulacionais e interespecíficas como variações fenotípicas foram observadas na fórmula palpal, dentes do cibário, cabeça da espermateca e número de anéis das espermatecas (Marcondes, 1996; 1997; Marcondes et al. 1998). Segundo Marcondes et al. (1999) as variações nas dimensões de *L.(N.) intermedia* são influenciadas pela altitude, latitude e época de coleta dos insetos.

Um estudo genético, realizado com diferentes populações de *L.(N.) intermedia* no Brasil, sugeriu que esta espécie poderia ser um complexo de espécies *L. (N.) intermedia sensu stricto (s.s.)* e *L. (N.) neivai*, sendo a primeira encontrada em regiões e altitudes menores, ao leste da Serra do Mar, e a segunda espécie de planalto, adaptada as regiões de clima mais frio e seco. Desta forma, no Brasil, o complexo *L. intermedia sensu lato (s.l.)* ocorreria do Estado do Piauí até o Rio Grande do Sul, em áreas de clima e altitude variadas.

Lutzomyia (N.) intermedia (s.s.) estaria presente em alguns Estados da região do Nordeste, no Rio de Janeiro, no Espírito Santo, no norte de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás, enquanto *L.(N.) neivai* em Mato Grosso do Sul, no sul de São Paulo, em Minas Gerais, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, destacando que ambas poderiam ser registradas em simpatria em Minas Gerais e São Paulo (Marcondes et al. 1998; Andrade-Filho et al. 2007).

Segundo alguns registros da literatura, nas áreas anteriormente ocupadas pela Mata Atlântica, *L.(N.) intermedia (s.l.)* é o flebotomíneo predominante, chegando a constituir 95% da fauna flebotomínea, em ambientes impactados e/ou domiciliar. Esta espécie é frequentemente encontrada no intradomicílio e nos abrigos de animais domésticos, possui grande capacidade adaptativa a ecótopos artificiais, principalmente, quando estes estão próximos a matas residuais (Gomes et al. 1986; 1989; 1992; Lima et al. 1981; Rangel & Lainson, 2003). Aguiar & Medeiros (2003) apresentaram uma revisão sobre a distribuição geográfica desta espécie, relatando sua ocorrência em 14 Estados, distribuídos pelas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

Em 2003, *L.(N.) intermedia* e *L. (N.) neivai* foram redescritas (*Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai*), por meio de caracteres que puderam separá-las de forma inequívoca e que as consideram como espécies válidas: largura máxima dos anéis, simetria da anelação, forma da cabeça e comprimento do duto comum das espermatecas (nas fêmeas) e forma da extremidade dos filamentos genitais (nos machos) (Andrade Filho et al.).

Ambas, *L.(N.) intermedia* e *L.(N.) neivai* têm sido registradas em áreas de transmissão de LTA, especialmente no Sudeste e Sul do Brasil (Lainson & Shaw 1998; Rangel & Lainson 2003; Pita-Pereira et al. 2008,2009; Marcondes et al. 2009).

V. *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neivai, 1912) e *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) e a transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

A LTA foi registrada no Brasil, pela primeira vez por Moreira (1895) identificando a existência do botão endêmico dos países quentes, chamando “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. A confirmação de formas de leishmânias em úlceras cutâneas ou

nasobucofaríngeas ocorreu no ano de 1909, quando Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo. Splendore (1911) diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania braziliensis* (Brasil, 2007).

A incriminação de *L. (N.) intermedia* como vetor do parasito ocorreu em 1922 por Aragão quando, pela primeira vez, demonstrou-se a importância dos flebotomíneos em transmitir leishmanioses no continente americano, através da produção de uma úlcera em um cão, pela injeção de triturado de insetos (naturalmente infectados), capturados nas matas de Laranjeiras, no Rio de Janeiro durante um surto epidêmico. Além desta evidência, Aragão (1927) observara a concomitância entre a presença da doença e a elevada quantidade de flebotomíneos nos locais onde ocorriam casos humanos. Posteriormente, Forattini et al. (1972), reproduzindo o experimento de Aragão, obtiveram a infecção de animais de laboratório com flagelados isolados desses insetos. A infecção experimental de exemplares de *L.(N.) intermedia* por *L. (V.) braziliensis* foi obtida em algumas oportunidades (Rangel et al. 1992; Silva, 1998).

Em 1947, foi reforçado o papel de *L.(N.) intermedia* como vetor com a caracterização do quadro eco-epidemiológico da transmissão de LTA no Rio de Janeiro, em um surto epidêmico em Magé, com a presença de animais silvestres associada a derrubadas periódicas da mata (Guimarães, 1955; Guimarães & Bustamante, 1954).

Outros surtos se sucederam em várias localidades e municípios do Rio de Janeiro, focos em diferentes áreas de colonização antiga ou de desmatamentos recentes, cujos estudos epidemiológicos sempre relatavam a predominância de *L.(N.) intermedia*, no intra e/ou peri-domicílio, demonstrando sua capacidade de adaptação ao ambiente freqüentado pelo homem e por animais domésticos, além do encontro deste vetor naturalmente infectado por *L. (V.) braziliensis* : Jacarepaguá em 1974, Ilha Grande em 1979, Vargem Grande, 1984; Mesquita a partir da década de 80, dentre outros (FIOCRUZ, 1974; Araujo Filho, 1979; Rangel et al. 1984; Aguilar et al, 1987; Rangel et al, 1986; Rangel et al. 1990; Meneses et al. 2000; 2005; Pita- Pereira et al. 2005) .

De fato, os estudos apontam *L. (N.) intermedia* como o principal transmissor do agente da LTA no Rio de Janeiro. Entretanto, a espécie sempre teve também um papel de

destaque na epidemiologia da LTA em São Paulo. Os trabalhos pioneiros sobre os vetores de LTA (Pessoa & Pestana, 1940; Barretto, 1943; Forattini, 1954) destacaram a importância epidemiológica de espécies de caráter mais silvestres, na época, como *L. (N.) whitmani*, *L. pessoai*, *L. fischeri*, *L. (N.) intermedia* e *L. migonei*. A partir da década de 50, com o processo de intenso desmatamento causado pela expansão agropecuária que atingiu a área florestal em todo território (Forattini, 1980), o que acarretou a devastação da cobertura florestal primitiva, verificou-se a redução na notificação de casos de LTA. Em 1952, (Foratini & Santos) *L. (N.) intermedia* foi encontrada naturalmente infectada por flagelados, supostamente promastigotas. Na década de 70, recrudescer a LTA com a concentração de casos no Vale da Ribeira, onde apenas *L. (N.) intermedia* aparecia como vetor, provavelmente pela capacidade de se adaptar ao ambiente antrópico (Rangel & Lainson 2003). Prosseguindo nos anos 80, novos casos foram notificados devido a fatores antrópicos, sem vínculo com grandes ecossistemas florestados, claramente confirmava-se a predominância de *L. (N.) intermedia* no ambiente domiciliar (Camargo-Neves, Gomes & Antunes, 2002).

Estudos conduzidos nos Estados do Espírito Santo e Minas Gerais reúnem fortes evidências da participação deste flebotômico na cadeia de transmissão de *L. (V.) braziliensis* (Falqueto, 1995; Mayrink et al. 1979; Rangel & Lainson 2003).

Lutzomyia (N.) neivai vem sendo registrada em áreas endêmicas de LTA, por *L. (V.) braziliensis*, no Sudeste e Sul do Brasil (Andrade-Filho et al. 2007). Anteriormente, Marcondes et al., (1997) já sugeria a possibilidade desta espécie atuar como vetor nestas regiões, especialmente nas áreas mais frias e secas. Evidências mais consistentes surgiram recentemente em estudos desenvolvidos no Sul do Brasil. No Paraná, investigações sobre a fauna flebotômica em 37 municípios apontavam a predominância de *L. (N.) neivai*, registrando a concordância da distribuição espacial da espécie com as áreas de transmissão de LTA (Silva et al. 2008).

Com o registro recente dos primeiros casos autóctones de LTA em Porto Alegre, RS, estudos foram conduzidos com o intuito de elucidar a epidemiologia local. Capturas de flebotômicos, no peri-domicílio da residência de um dos pacientes revelaram que 94.9% dos espécimes coletados eram *L. (N.) neivai*, não sendo registrada a presença de qualquer

outra espécie de flebotomíneo associada à transmissão de *L. (V.) braziliensis* (Alfredo C.R. Azevedo, dados não publicados), o que permitiu sugerir *L. (N.) neivai* como vetor. Posteriormente, exemplares desse flebotomíneo, coletados na mesma área, foram caracterizados com infecção natural por *Leishmania (Viannia)* sp. (Pita-Pereira et al. 2009). Também, em publicação recente, tem-se o registro de infecção natural de *L. (N.) neivai* por *Leishmania (Viannia)* sp, num foco de LTA no Estado de Santa Catarina (Marcondes et al. 2009). Considerando que a única leishmânia do sub-gênero *Viannia* circulante em humanos ao Sul do Brasil é *L. (V.) braziliensis* e que este parasito foi isolado de pacientes (destas duas áreas) e caracterizado, as infecções naturais encontradas nestes flebotomíneos tratam-se desta leishmânia.

Dados interessantes sobre a capacidade de *L. (N.) neivai* se adaptar ao ambiente modificado pelo homem foram revelados em estudos sobre os hábitos alimentares da espécie no peri-domicílio (Dias et al. 2007), sendo este um aspecto importante da competência vetorial a ser considerado.

VI. A Taxonomia de Phlebotominae

A classificação dos flebotomíneos neotropicais, apesar de bem consolidada por Young & Duncan (1994), ainda levanta alguns questionamentos, sendo a procura por mais caracteres taxonômicos e novas propostas para identificação e classificação dos flebotomíneos alvos de muitos estudiosos.

Desde a descrição de *Phlebotomus papatasi* por Scopoli (1786), na Itália, os caracteres utilizados para descrição e subsequente identificação dos flebotomíneos têm sido morfológicos. Tais caracteres referem-se, sobretudo à morfologia externa e eventualmente à morfologia interna. São estruturas distribuídas pela cabeça, tórax e abdome de ambos os sexos.

Algumas revisões acerca dos Phlebotominae americanos foram apresentadas por Barreto (1961), Duckhouse (1973), Lewis et al. (1977), Martins et al. (1978) e Grupo CIPA (1991).

A referência taxonômica mais utilizada é a de Young & Duncan (1994), onde é apresentada uma revisão do gênero *Lutzomyia*, que considerava válidos três gêneros, 15

subgêneros e 15 grupos de espécies. Porém, a existência de espécies não agrupadas ou escritas inadequadamente tem estimulado o desenvolvimento de investigações em taxonomia de flebotomíneos.

Galati (2003) propôs uma nova classificação de Phlebotominae, com ênfase para os insetos da América, dentro da abordagem filogenética. Este autor ao assumir um enfoque evolutivo criou alguns gêneros e subgêneros e elevou, ainda, vários subgêneros à categoria de gênero; a classificação ficou composta por 22 gêneros, 20 subgêneros e três grupos de espécies, para o Novo Mundo.

Como demonstrado na literatura, espécies de flebotomíneos têm sido descritas e identificadas freqüentemente pela morfologia dos insetos adultos; em algumas situações, especialmente, diante de espécies muito próximas e da hipótese de existência de um complexo de espécies crípticas, ferramentas moleculares, isoenzimas e marcadores moleculares, têm sido empregados com sucesso (Ready & Rangel 2003).

Entretanto, pouco se conhece sobre os caracteres morfológicos das formas imaturas e que, talvez, poderiam ser úteis tanto em estudos taxonômicos quanto filogenéticos.

Ainda assim, alguns trabalhos sobre a identificação das espécies de larvas de flebotomíneos foram realizados através da quetotaxia, o estudo das cerdas (Ward, 1976), embora este método consuma muito tempo, o que fez com que esquemas alternativos tenham sido propostos.

Portanto, deve-se considerar que das 500 espécies de Phlebotominae Neotropicais descritas, somente 66 têm as formas imaturas estudadas.

O aparecimento de ferramentas taxonômicas baseadas em avanços tecnológicos, tais como a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), permitiu que a partir de 1965 este método pudesse ser utilizado 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 (Ward & Ready, 1975; Feliciangeli et al. 1993; Perez & Oguzuku, 1997; Fausto et al. 2001, Almeida et al. 2004).

A utilização do microscópio eletrônico de varredura possibilitou uma nova abordagem nos estudos dos flebotomíneos. Alguns trabalhos foram desenvolvidos analisando estruturas esculturais da casca de ovos de flebotomíneos de espécies

Neotropicais do gênero *Lutzomyia* (Ward & Ready, 1975; Feliciangeli et al. 1993; Perez & Oguzuku, 1997; Fausto et al. 2001, Almeida et al. 2004), bem como daquelas do gênero *Phlebotomus* (Fausto et al. 1992; Rogo et al. 1992). A morfologia das larvas de algumas espécies do Novo Mundo (*Lutzomyia*) também pode ser analisada (Leite & Williams 1997; Pessoa et al. 2000; 2001; Secundino et al. 2007).

RELEVÂNCIA

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a taxonomia é a base indispensável para todos os trabalhos sobre ecologia de flebotomíneos e seu papel como vetores das leishmanioses. As ações preconizadas nos Manuais de Vigilância e Controle das Leishmanioses tratam dentre outros da correta identificação da espécie do flebotomíneo vetor. Assumindo que, para uma melhor definição sobre o quadro real da eco-epidemiologia da LTA que possibilite fundamentar ações precisas de vigilância e controle, deve-se levar em conta o conhecimento mais apurado da definição da posição taxonômica associada à competência vetorial dos flebotomíneos.

As espécies de flebotomíneos vetores das leishmanioses, ainda que na sua maioria bem separadas pela morfologia dos adultos de ambos os sexos, revelam poucos conhecimentos sobre a morfologia das formas imaturas e que poderiam ser bastante úteis, tanto em estudos taxonômicos quanto filogenéticos.

O estudo das formas imaturas a luz da MVE fundamenta um maior aprofundamento do conhecimento das espécies de flebotomíneos, na perspectiva de subsidiar uma identificação precisa, com base nos estágios imaturos que podem permitir, inclusive, evidenciar novas ferramentas morfológicas.

O presente estudo, com base nas formas imaturas de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) neivai*, analisadas pela MEV, não apenas resultarão em informações sobre a morfologia das espécies, mas poderão identificar novos caracteres a serem empregados em taxonomia de flebotomíneos.

Considerando que ambas, *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) neivai*, têm um papel relevante na transmissão da *L. (V.) braziliensis* no Sudeste e Sul do Brasil, estes estudos poderão

trazer informações importantes, especialmente para áreas endêmicas onde possam ocorrer em simpatria.

2. OBJETIVOS

Ampliar os conhecimentos sobre a morfologia de imaturos de Phlebotominae, estudando *Lutzomyia (N.) intermedia* e *Lutzomyia (N.) neivai*, importantes transmissores de leishmaniose tegumentar no Brasil.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Investigar se é possível a distinção entre as duas espécies *Lutzomyia (N.) intermedia* e *Lutzomyia (N.) neivai*;

II. Avaliar a importância de alguns caracteres morfológicos de ovos, larvas de I a IV estádios e pupas, como ferramentas para estudos taxonômicos de flebotomíneos: *Lutzomyia (N.) intermedia* e *Lutzomyia (N.) neivai* .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Insetos: Os espécimes adultos são oriundos de áreas com transmissão de LTA do Sudeste Brasileiro: *Lutzomyia (N) intermedia*, Jacarepaguá, Estado do Rio de Janeiro e Município de Iporanga, Estado de São Paulo. *Lutzomyia (N.) neivai*, Região do Planalto do Estado de São Paulo. As capturas dos flebotomíneos foram realizadas através do uso de armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo et al. 2005).

Colônias destas duas espécies foram estabelecidas e mantidas nos insetários dos Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz e da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo/USP segundo a metodologia de Modi & Tesh (1983) com algumas alterações e Rangel et al. (1985). Estas colônias se destinavam a obtenção de ovos, larvas e pupas utilizados no presente estudo.

As fêmeas provenientes do campo foram colocadas individualmente em potes próprios para criação, onde foi oferecida uma solução açucarada em um chumaço de algodão; após três dias, foi oferecido repasto sanguíneo em hamster (Nº de protocolo CEUA P-0096-00). Diariamente foi verificada a ocorrência de oviposição e àquelas que realizaram a postura e não morreram foi oferecida nova alimentação sanguínea.

Os potes de criação foram mantidos dentro de caixas plásticas com temperatura ambiente variando entre 25° e 26° C, com umidade relativa do ar em torno de 80%.

Após a morte, as fêmeas individualizadas foram numeradas, recebendo o mesmo número do pote contendo sua postura, sendo então processadas e montadas diretamente em líquido de Berlese para identificação da espécie. Os três últimos segmentos abdominais foram retirados com auxílio de estiletos, para facilitar a visualização das espermatecas e seus dutos (Killick- Kendrick cols., 1994; Marcondes cols., 1998), e a cabeça foi destacada do tórax e montada na posição ventral para visualização das estruturas do cibário (Andrade-Filho 2003).

Processamento de Microscopia Eletrônica de Varredura:

Foram utilizados dos procedimentos para os estudos de varredura.

Para estudo dos ovos realizados na FIOCRUZ: As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.2, por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas duas vezes no tampão e pós fixadas em Tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, por 1 hora, a temperatura ambiente e no escuro. 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 em aparelho Balzers. Posteriormente, foram montadas em suportes metálicos, utilizando fita dupla face. Estas foram recobertas com ouro em metalizador, onde o ouro é removido de um eletrodo maciço por bombardeamento de íons em alto vácuo (Hayat, 1970).

Para as amostras processadas na UFV: Foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.2, por 1 hora a temperatura ambiente e desidratados em séries crescentes de etanol, transferidos para hexamethyldisilazane, seco ao ar livre e coberto com ouro.

As observações foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO VP 1430, do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

As medidas foram realizadas pelo programa SemAfore 3.0.

4. RESULTADOS

Ovos:

Os ovos de ambas as espécies, (*L. (N.) intermedia* e *L. (N.) neivai*) apresentaram forma elipsóide ou ovóide, alongados e levemente achatados. A extremidade é arredondada, usualmente com duas aerópilas, são escuros, possuindo padrão de ornamentação do córion do tipo cristas paralelas não conectadas, com tubérculos entre as cristas (Figs. 1 a 4). A distribuição destes tubérculos variou entre as duas espécies onde *L.(N.) intermedia* apresentando uma fileira esparsa de tubérculos entre as cristas (Figs.1 e 2) enquanto os ovos *L. (N.) neivai* apresentaram maior densidade dos tubérculos resultando em uma ou mais fileiras entre as cristas (Figs. 3 e 4).

Os ovos de *L.(N.) intermedia* mediram 361 µm de comprimento e largura 75,4 µm e apresentaram uma fileira esparsa de tubérculos entre as cristas (Figs. 1 e 2).

Os ovos *L. (N.) neivai* de mediram 343 µm de comprimento e largura 85,5 µm e apresentaram uma fileira ou mais com uma concentração maior de tubérculos entre as cristas (Figs. 3 e 4).

Larvas:

Nos quatro estádios as formas larvais de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) neivai* são pequenas, brancas de aspecto vermiforme, ápodas, alongadas, com doze segmentos, sendo três torácicos e nove abdominais (Figs. 8, 15, 16, 17 e 39).

Na cabeça a cápsula cefálica é evidente, globular, fortemente esclerosada com proeminentes peças bucais para mastigação, que consistem em: clipeo, labro, mandíbula, maxila e mento localizados ventralmente a cabeça (Figs. 18, 20 a 23).

A vista anterior da região da cabeça da larva é circular ou levemente elíptica. A cápsula cefálica é revestida de espinho, distribuídos irregularmente (Figs. 5 a 7, 11, 13, 20, 22).

O clipeo ocupa a posição antero-superior e o mento a posição antero-inferior do aparato bucal. A maxila está localizada na posição antero - lateral enquanto a mandíbula está entre o clipeo e a maxila. O mento forma a base da abertura bucal (Figs. 18 e 21 a 23).

Cada palpo maxilar contém um órgão maxilar com sete sensilas papiliformes uniporos e três papilas knob além de algumas setas tricódeas (Figs. 21 e 23).

Tórax – Composto de três segmentos. O tegumento é enrugado, contendo diminutos tubérculos com ou sem espinhos associados (Figs. 26, 28, 29 e 34).

As superfícies dorsal e lateral do corpo das larvas são cobertas por cerdas (Figs. 17, 33 e 39). A superfície ventral apresenta pseudo-patas para locomoção nos segmentos abdominais (Figs. 33 a 35), excetuando o lobo anal. Além disto, todo o corpo é recoberto de pequenos espinhos diminutos. Em todos os quatro estádios apresentam o corpo coberto de cerdas em escova e longas cerdas caudais, sendo um par no primeiro estágio larval e dois pares nos demais.

Abdômen – Possui nove segmentos, revestidos de pequenos espinhos distribuídos irregularmente. A superfície ventral apresenta pseudo-pés, que são estruturas em forma de bulbos que se projetam no tegumento para locomoção nos segmentos abdominais excetuando o lobo anal. Além disto, todo o corpo é recoberto de pequenos espinhos diminutos.

Algumas diferenças são observadas nas larvas de primeiro estágio com relação aos demais estádios.

Larvas I :

A presença de uma estrutura córnea, localizada na parte posterior a cabeça, responsável pela abertura do ovo, caracteriza o 1º estágio larval. O *egg buster* está localizado na superfície dorsal da cabeça, e tem sido usado como uma ferramenta taxonômica em dípteros para diferenciar o 1º instar dos demais instares. É uma estrutura cuticular em forma de cone vulcânico, responsável pela rachadura do ovo. O *egg buster* das espécies estudadas apresentou as seguintes medidas:

L.(N.) intermedia do Rio de Janeiro: comprimento 32,0 µm, largura 27,2, µm e circunferência 525,0 µm ;

L.(N.) intermedia de São Paulo: comprimento 32,5 µm, largura 17,3 µm e circunferência 439 µm ;

L. (N.) neivai : comprimento 27,9 µm, largura 13,7 µm e circunferência 300,0 µm.

As antenas de L1 apresentaram dois segmentos um cônico basal fusionado com um curto distal (Figs. 9, 11 e 13). Estas antenas apresentaram como comprimento as seguintes medidas.

L.(N.) intermedia do Rio de Janeiro: comprimento total 26,9 μm , comprimento 18,3 μm e pedicelo 8,67 μm ;

L.(N.) intermedia de São Paulo: comprimento total 32,25 μm , comprimento 23,5 μm e pedicelo 8,75 μm ;

L. (N.) neivai : comprimento total 32,11 μm , comprimento 23,0 μm e pedicelo 9,11 μm .

Outra diferença observada do primeiro instar para os instares seguintes, é presença de um par de cerdas caudais no primeiro instar (Figs. 8, 10, 12 a 14).

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

Larvas II, Larvas III e Larvas IV :

Na cabeça a cápsula cefálica é revestida de espinho, distribuídos irregularmente. Com vários tipos de cerdas.

As antenas apresentam dois segmentos, sendo um pedicelo cônico basal fusionado a um antenômero distal longo (Figs. 18 a 20, 24 e 25).

O tórax é composto de três segmentos

O abdômen o possui nove segmentos evidentes, contendo pequenos espinhos distribuídos irregularmente.

Os segundo, terceiro e quarto estádios larvares apresentam dois pares de cerdas caudais. (Figs.15 a 17, 28 e 36 a 39).

Pupa:

A pupa é do tipo obrecta exarata e apresenta coloração clara, escurecendo com a proximidade da emergência do adulto.

Ela é composta de treze segmentos, sendo os quatro primeiros fundidos no cefalotórax e os demais individualizados constituem o abdômen. Os segmentos abdominais são uniformes excetuando o oitavo e o nono que são modificados e recobertos pela exuvia do quarto estágio larval o qual fixa as pupas no substrato e seu tegumento é revestido de cerdas. Estruturas da forma adulta como asas, antenas e patas podem ser observadas na pupa. O corpo da pupa é recoberto por diminutos espinhos semelhantes aos da larva (Fig. 32 a 36).

A pupa mede 1975 μm de comprimento e 696 μm aproximadamente no comprimento total (Fig. 40).

O cefalotórax é composto de quatro segmentos. O corpo é coberto por diminutos espículos semelhante aos da larva (Figs. 40 a 42).

O abdômen possui nove segmentos, revestidos de pequenos espinhos distribuídos irregularmente (Figs. 42 a 44).

As medidas utilizadas são para melhor caracterização das estruturas, sem objetivar qualquer comparação ou análise. Uma vez que para estudos morfométricos far-se-á um número maior de exemplares bem como a padronização de idade/ tempo dos exemplares utilizados.

Tabela I : Medidas (mm) das formas imaturas de *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia neivai*

Estádio	Estrutura	<i>Lutzomyia intermedia</i>		<i>Lutzomyia neivai</i>	
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
Ovo		0,36	0,07	0,34	0,08
Larva I	Corpo	0,46	0,06	0,55	0,06
	Egg Buster	0,03	0,03	0,03	0,01
	Pedicelo	0,01	–	0,01	–
	Antenômero	0,02	–	0,02	–
	Maxila	0,03	0,01	0,03	0,01
	Mandibula	0,02	0,02	0,02	0,02
	Cerdas tricóideas	0,04	–	0,04	–
Larva II	Corpo	1,16	0,14	1,21	0,11
	Pedicelo	0,02	–	0,01	–
	Antenômero	0,04	–	0,03	–
	Maxila	0,04	0,01	0,04	0,01
	Mandibula	0,04	0,03	0,04	0,02
	Cerdas tricóideas	0,06	–	0,05	–
	Larva III	Corpo	0,9	0,08	1,29
Pedicelo		0,02	–	0,02	–
Antenômero		0,05	–	0,04	–
Maxila		0,07	0,02	0,07	0,02
Mandibula		0,04	0,04	0,04	0,04
Cerdas tricóideas		0,09	–	0,09	–
Larva IV		Corpo	1,93	0,20	2,23
	Pedicelo	0,03	–	0,03	–
	Antenômero	0,05	–	0,06	–
	Cerdas tricóideas	0,11	–	0,12	–
Pupa	Corpo	1,99	0,60	1,94	0,44

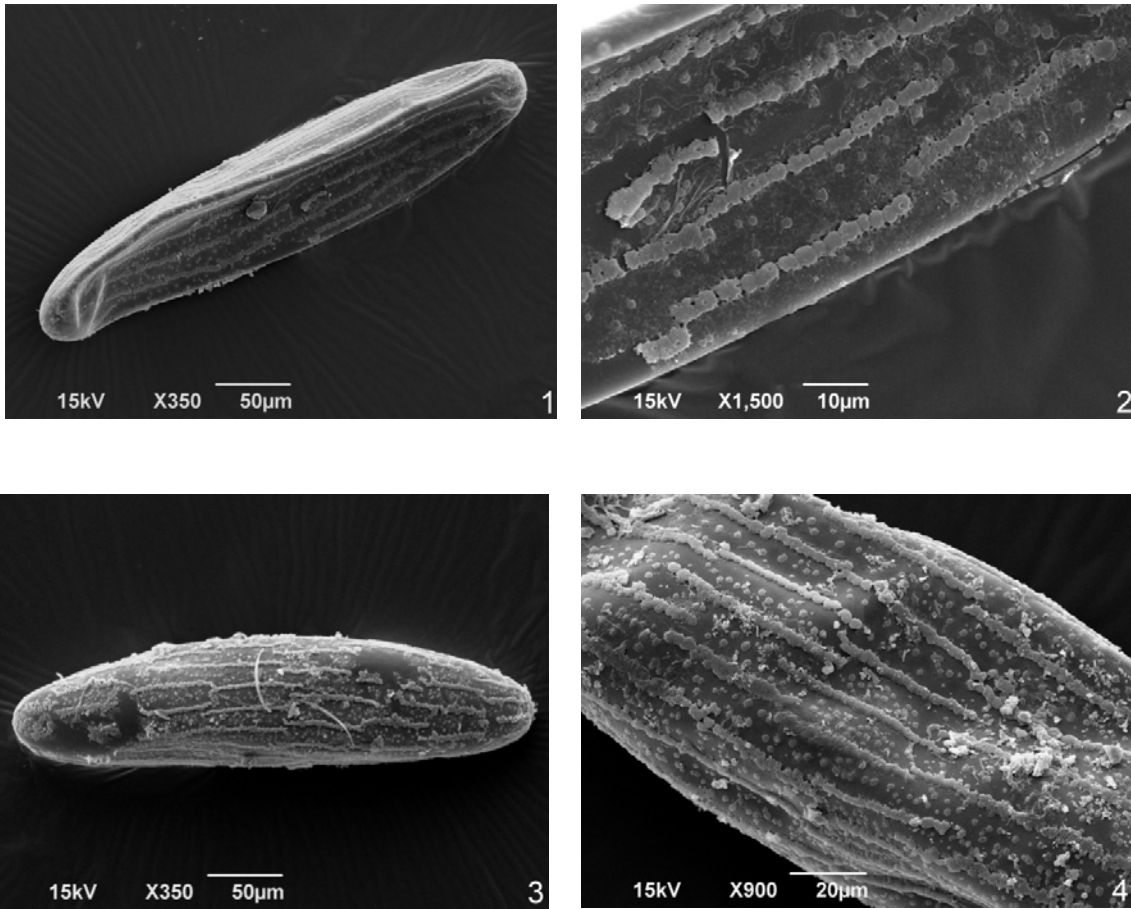


Fig. 1-4: Micrografias do ovo. *Lutzomyia intermedia* (1 e 2), *Lutzomyia neivai* (3 e 4). 1: visão geral do ovo . 2: detalhe da ornamentação do córion tipo cristas paralelas com uma fileira esparsa de tubérculos. 3: visão geral do ovo. 4: detalhe da ornamentação do córion tipo cristas paralelas com uma ou mais fileiras de tubérculos

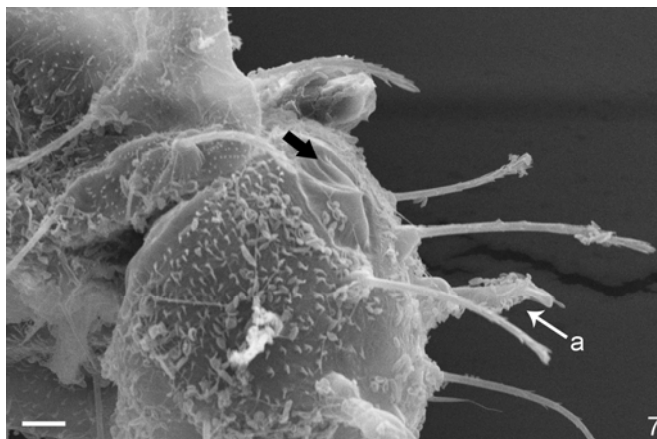
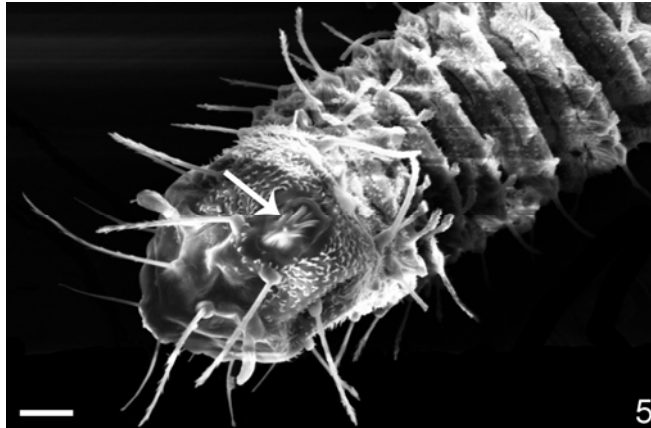


Fig. 5-7: Micrografias da cabeça do primeiro estágio larvar. *Lutzomyia intermedia* (5 e 6) e *Lutzomyia neivai* (7). Fig. 5: Vista dorsal da cabeça mostrando o eggbuster (seta) de *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 20 μ m). Fig. 7: Vista lateral da cabeça mostrando o eggbuster de *Lutzomyia neivai* (seta) (bar 10 μ m). a: antena.

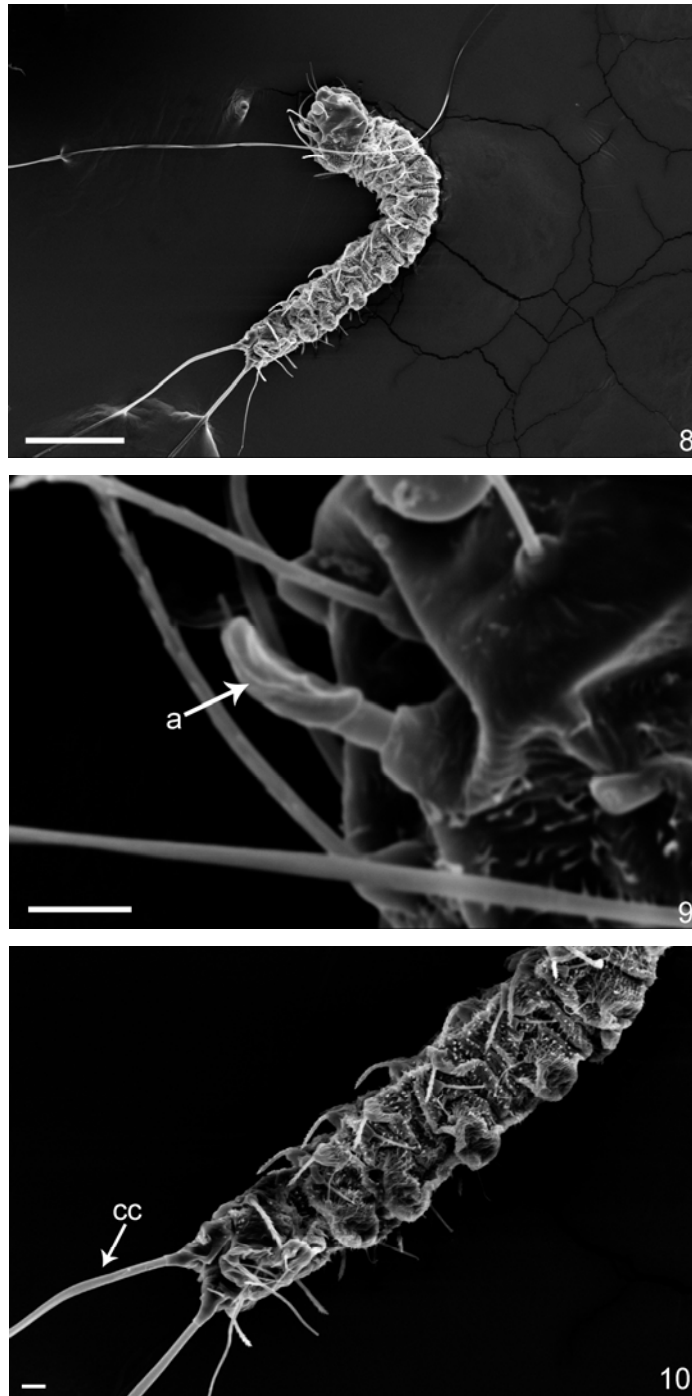


Fig. 8-10: Micrografias do primeiro estágio larvar de *Lutzomyia intermedia* RJ. 8: Vista geral do corpo da larva (bar 100µm). 9: Vista da antena (bar 10µm). 10: Vista da cerda caudal (bar 10µm). a: antena; cc: cerda caudal.

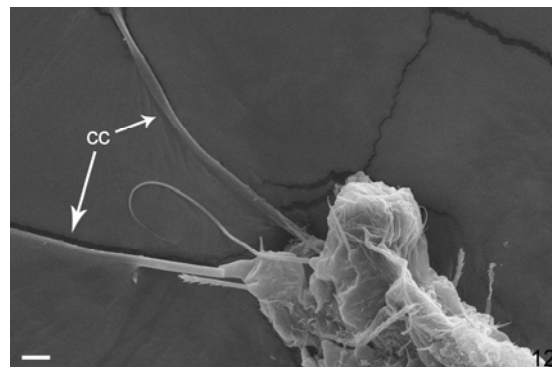
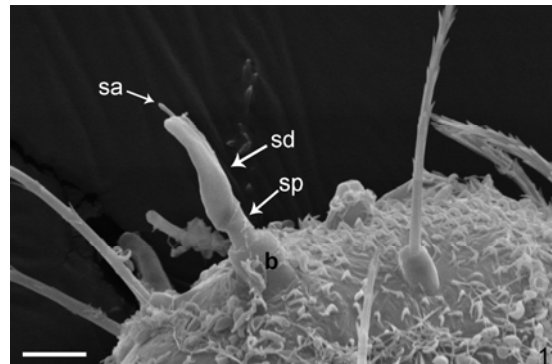


Fig. 11-14: Micrografias do primeiro estágio larvar. *Lutzomyia neivai* (11 e 12) e 11: Vista da antena da larva (bar 10 μ m). 12 : Vista da cerda caudal da larva (bar 10 μ m e 20 μ m, respectivamente). b: base; cc: cerda caudal; sa: sensila antenal; sd: segmento distal; SP: segmento proximal.

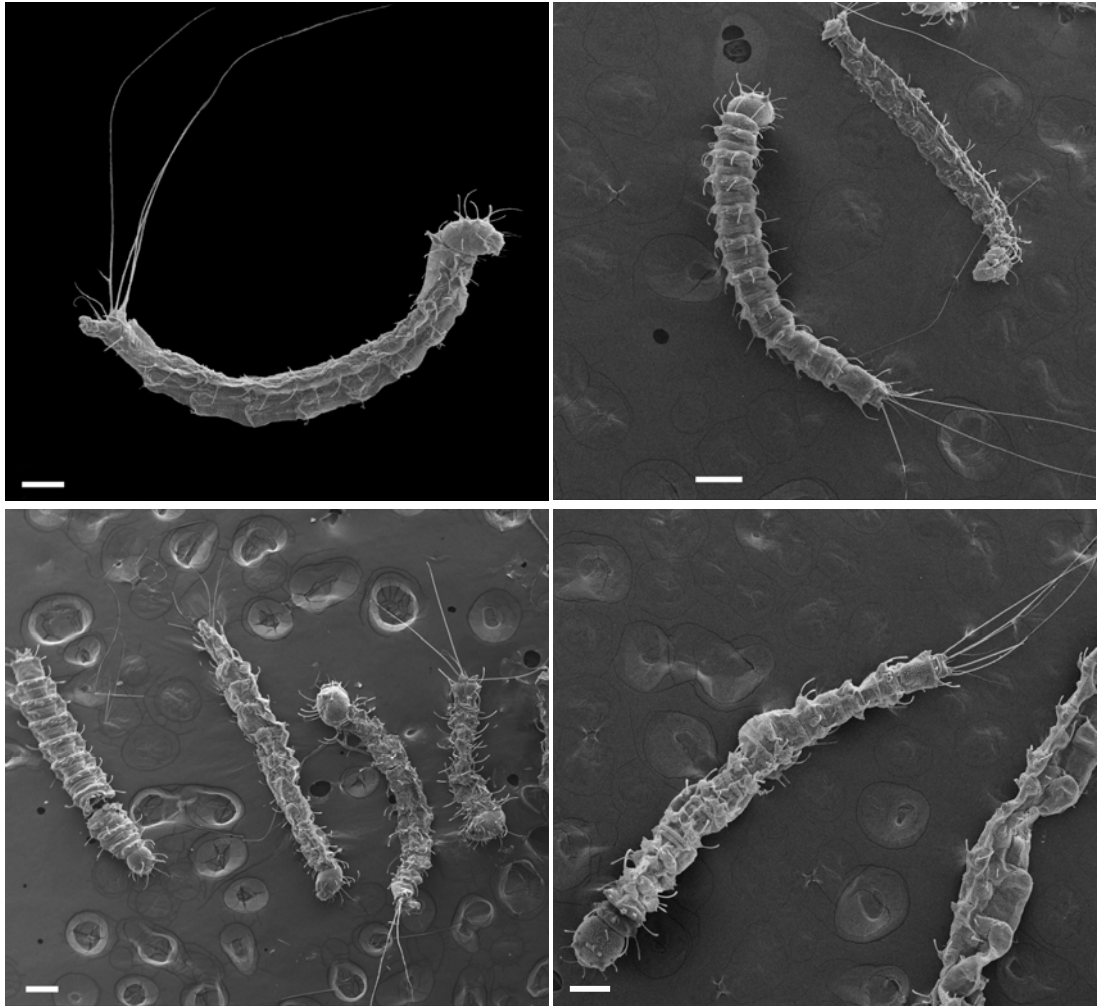


Fig. 13-16: Micrografias dos estádios larvares, vista geral. 13: segundo estágio de *Lutzomyia neivai* (bar. 100 μ m). 14: terceiro estágio de *Lutzomyia neivai* (bar. 200 μ m). 15: quarto estágio de *Lutzomyia intermedia* (bar. 200 μ m). 16: quarto estágio *Lutzomyia neivai* (bar. 200 μ m).

Fig. 17: Micrografias da cabeça da larva de L2 de *Lutzomyia neivai* (bar 20 μ m). a: antena; l: labro; ma: mandíbula; me: mento; mx: maxila; sa: sensila antenal; sd: segmento distal; sp: segmento proximal.

Fig. 18-19: Micrografias do aparato bucal dos estádios larvais. 18: Vista lateral da larva de L2 *Lutzomyia intermedia* (bar 10 μ m). 19: Vista lateral da larva de L1 de *Lutzomyia neivai* (bar 10 μ m). c: clípeo; l: labro; ma: mandíbula; me: mento; mx: maxila.

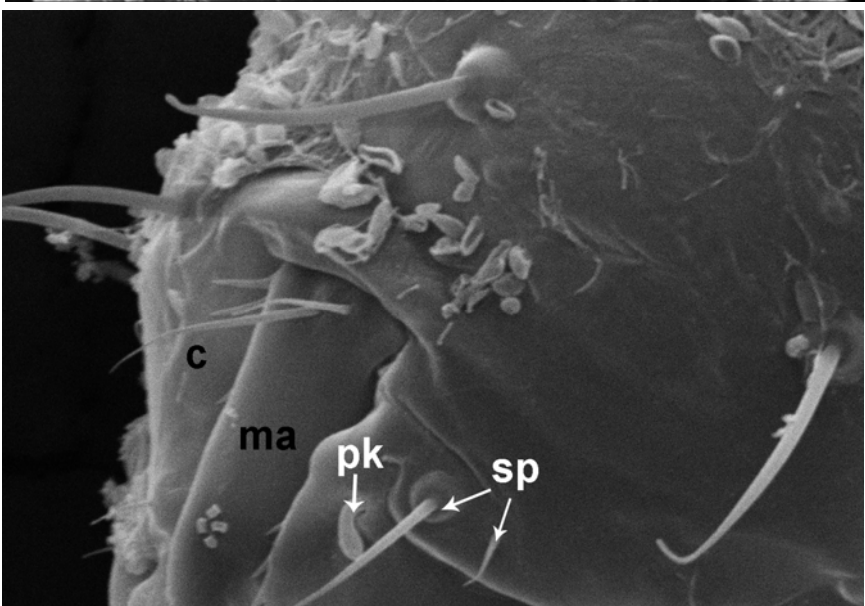
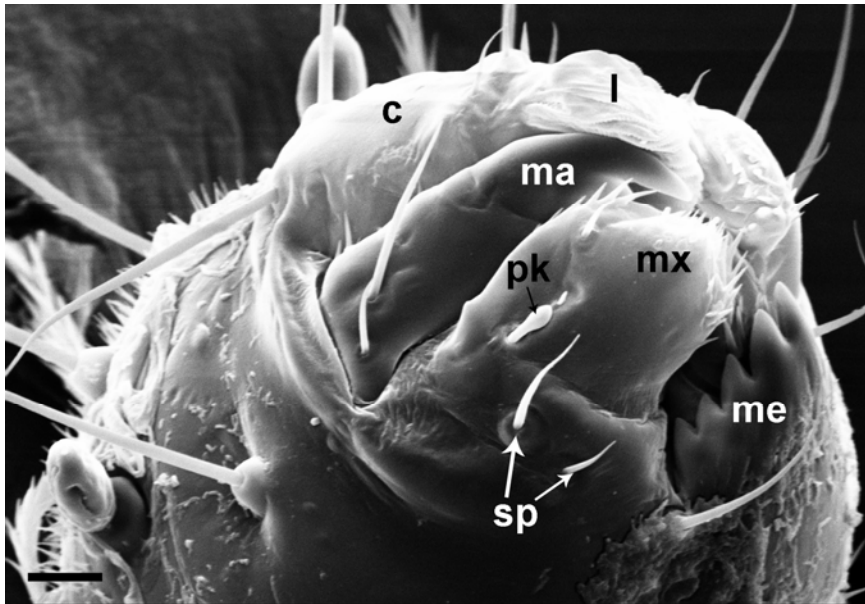
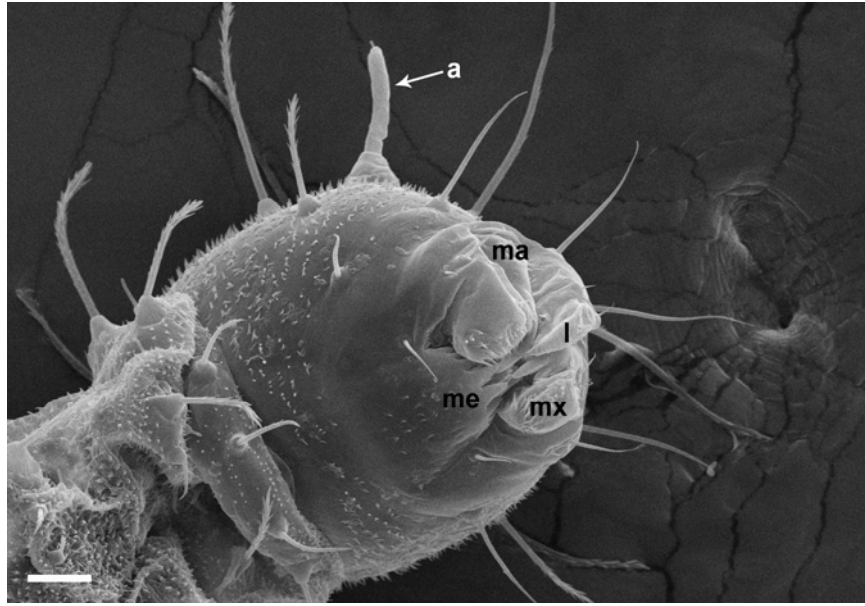


Fig. 20-22: Micrografias dos estádios larvais. 20: Vista dorsal das cerdas da cabeça de L3 de *Lutzomyia neivai* (bar 100µm). 21: Vista lateral da cabeça de L4 *Lutzomyia neivai* (bar 100µm). 22: Detalhe do pseudo-pé, mostrando a cerda em forma de gota (seta) de L2 *Lutzomyia intermedia* (bar 10µm). a: antena; cf: cerda filiforme; ct: cerda tricóide; st: segmento torácico.

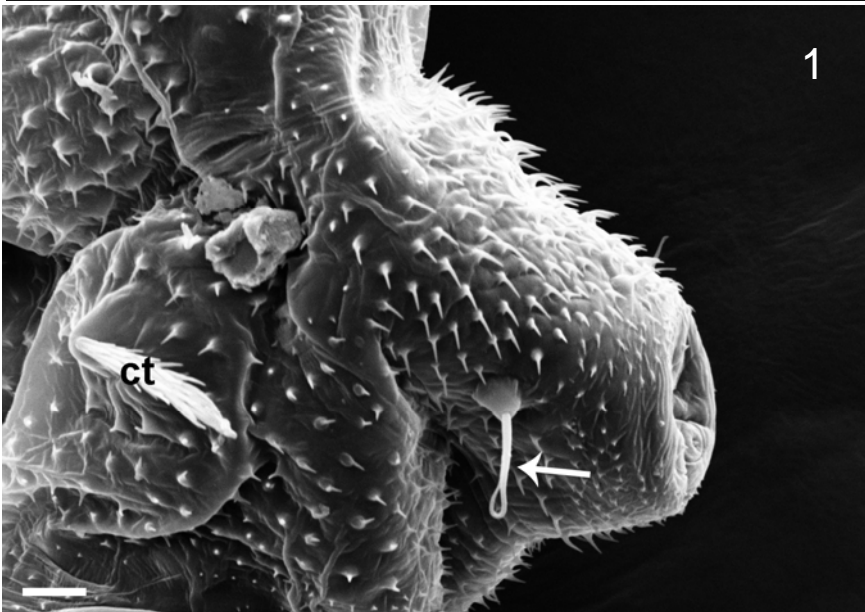
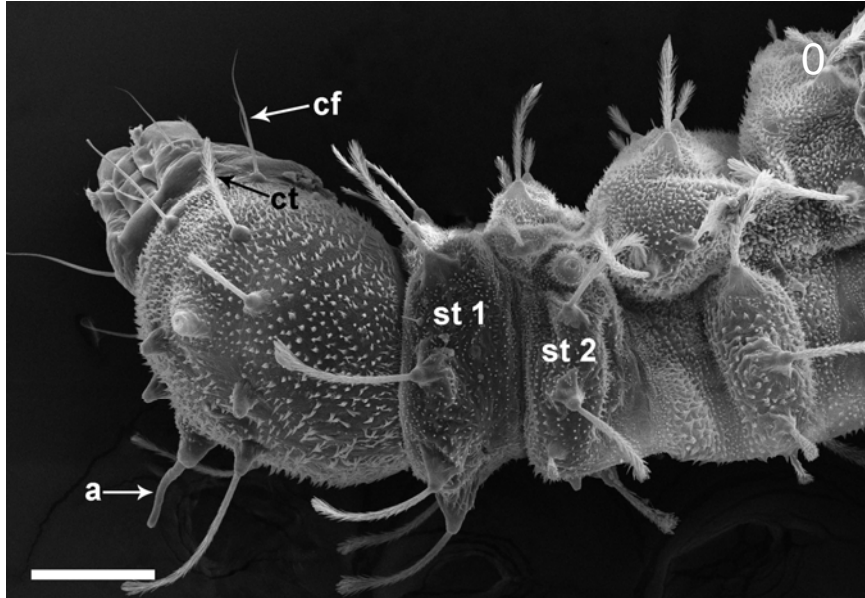
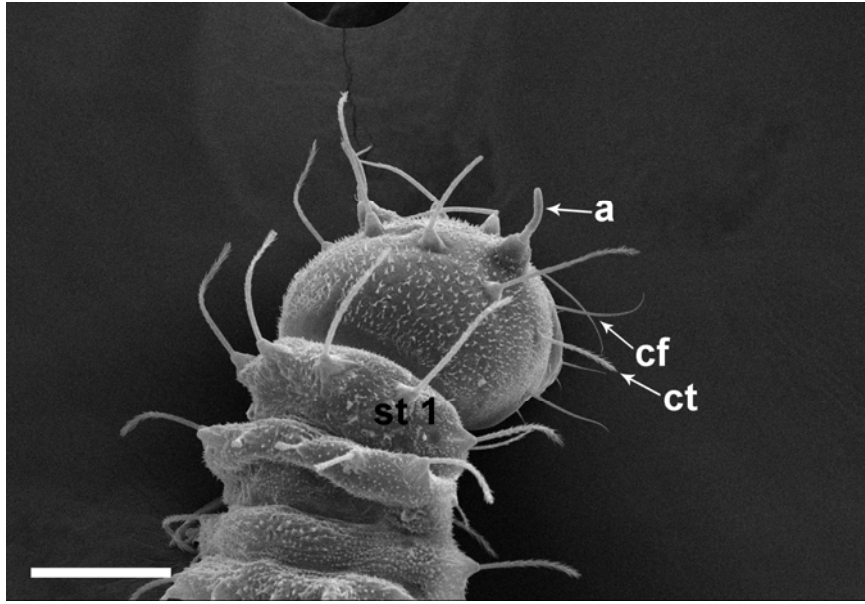


Fig. 23-25: Micrografias dos estádios larvais. 23: Vista do tegumento corporal de L2 de *Lutzomyia intermedia* (bar 20 μ m). 24: Vista das cerdas corporais de L4 de *Lutzomyia intermedia*, cerda em forma de gota (seta) (bar 10 μ m). 25: Vista dorsal das cerdas caudais de L3 *Lutzomyia neivai* (bar 20 μ m). cc: cerdas caudais; ct: cerda tricóide.

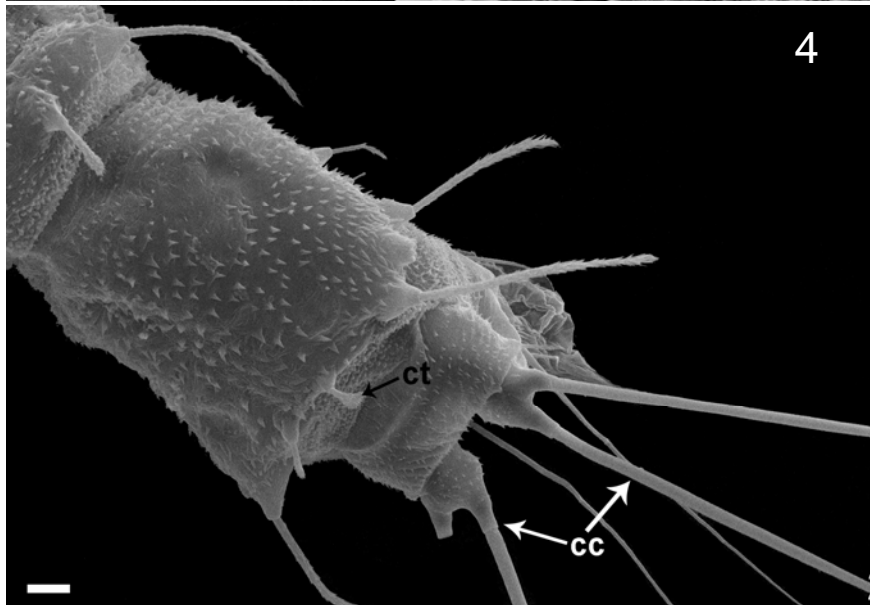
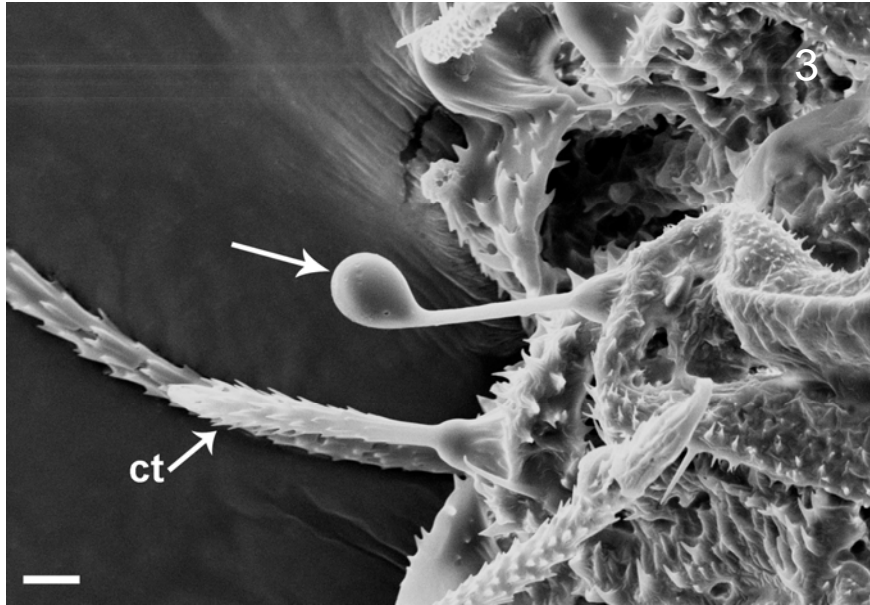
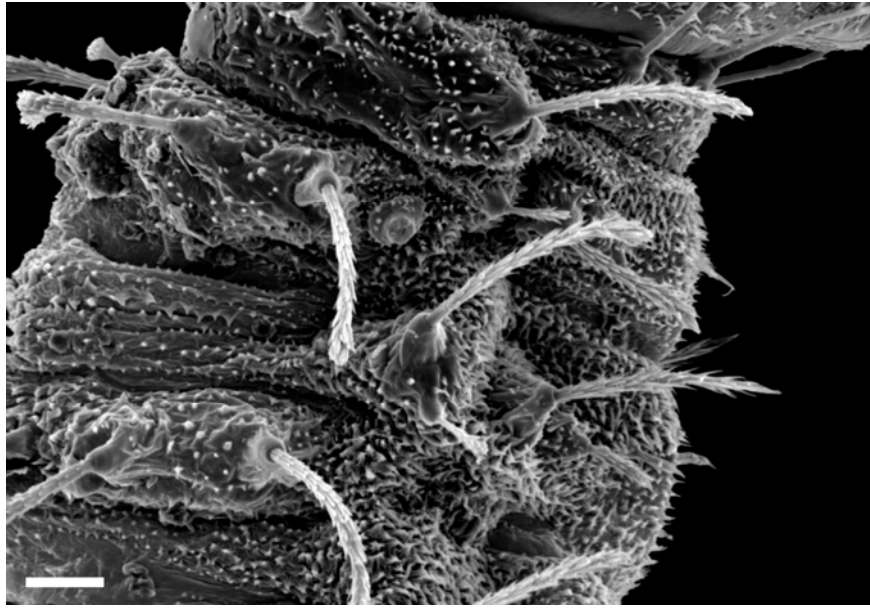


Fig. 26-27: Micrografias do espiráculo respiratório nos estádios larvais. 26: L3 de *Lutzomyia intermedia* (bar 10µm). 27: L4 de *Lutzomyia intermedia* (bar 10µm). ccl: cerda celocônica; ct: cerda tricóide.

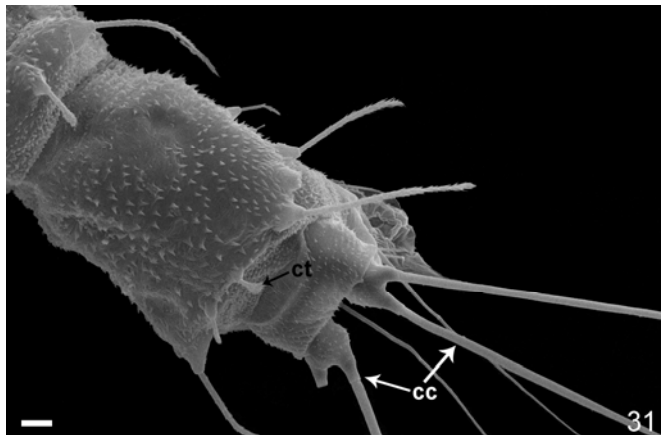
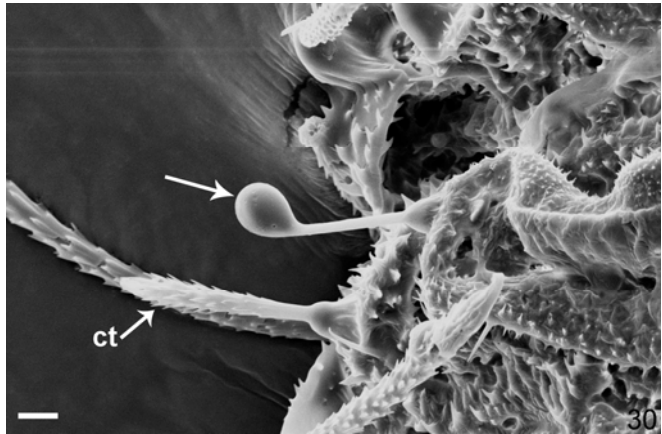
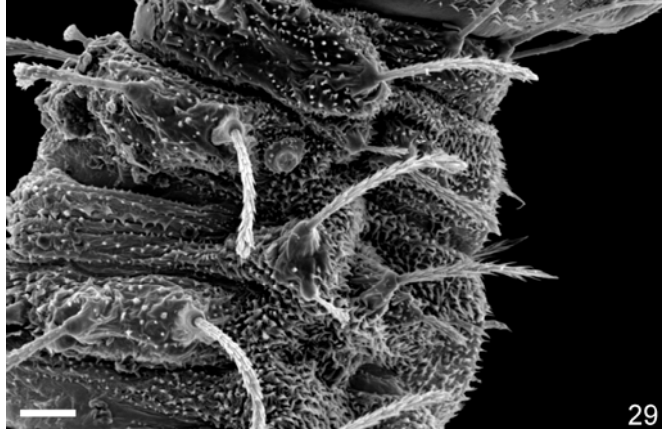


Fig. 29-32: Micrografias dos estádios larvares. 29: Vista do tegumento corporal de L2 de *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 20µm). 30: Vista das cerdas corporais de L4 de *Lutzomyia intermedia* RJ, cerda em forma de gota (seta) (bar 10µm). 31: Vista dorsal das cerdas caudais de L3 *Lutzomyia neivai* (bar 20µm). cc: cerdas caudais; ct: cerda tricóide.

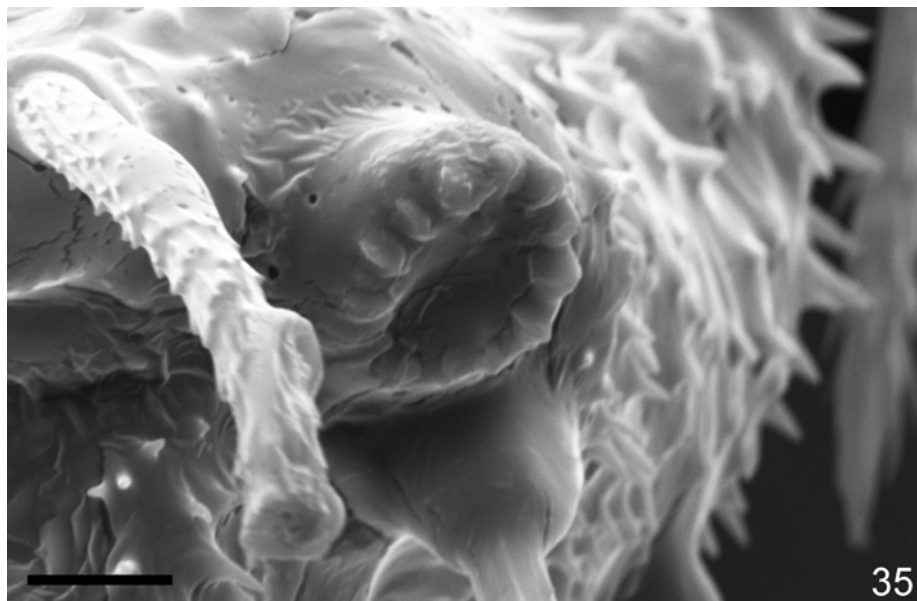
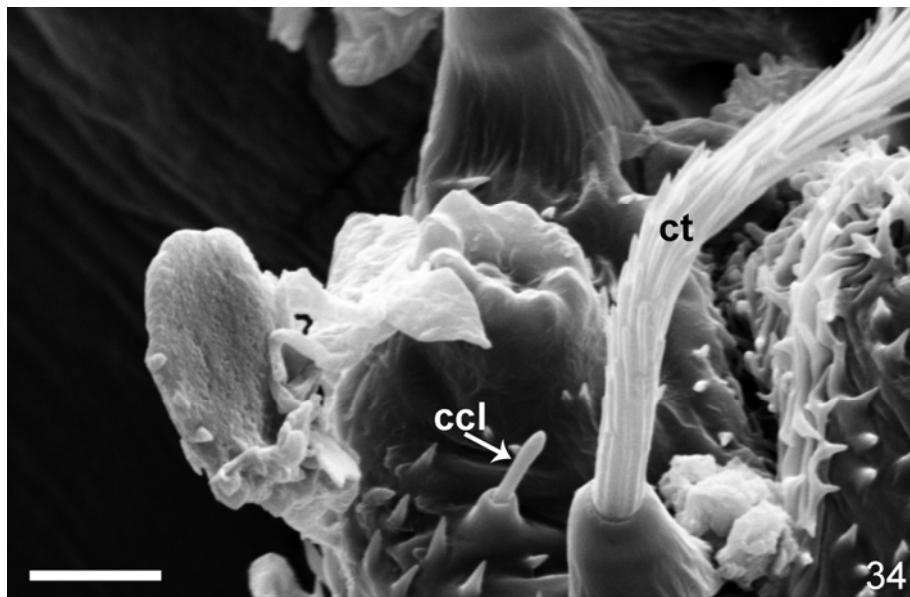


Fig. 34-35: Micrografias do espiráculo respiratório nos estádios larvares. 34: L3 de *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 10 μ m). 35: L4 de *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 10 μ m). ccl: cerda celacônica; ct: cerda tricóide.

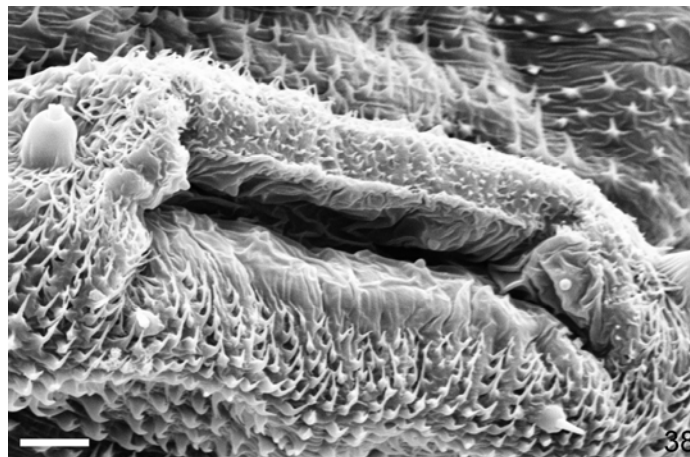
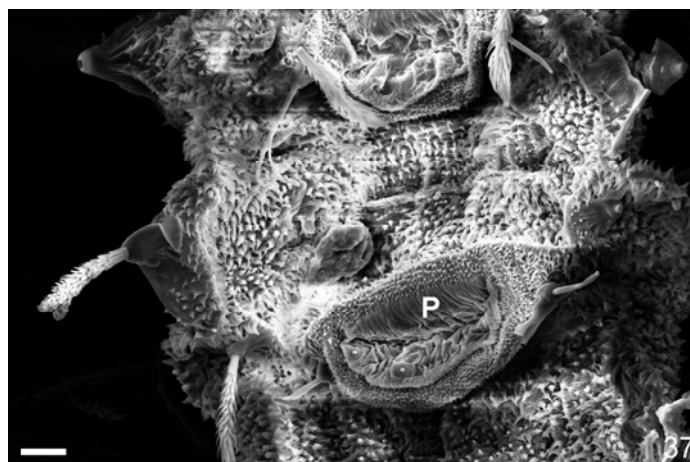
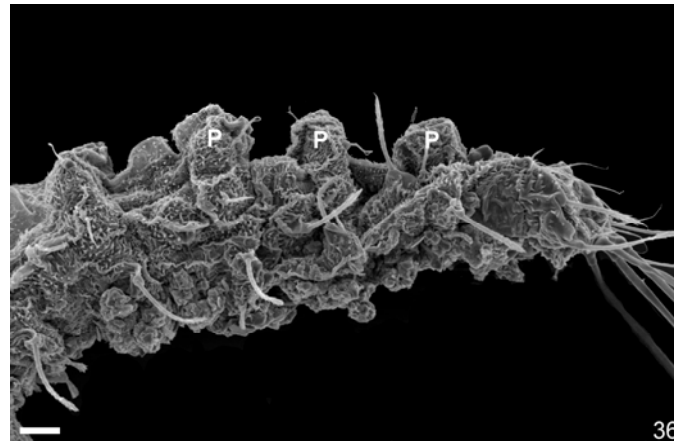


Fig. 36-38: Micrografias dos pseudo-pés (P) dos estádios larvares. 36: Vista geral dos pseudo-pés de L2 em *Lutzomyia neivai* (bar 20µm). 37: Detalhe do

pseudo-pé de L4 em *Lutzomyia intermedia* (bar 20µm). 38: Detalhe do pseudo-pé de L3 em *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 10µm).

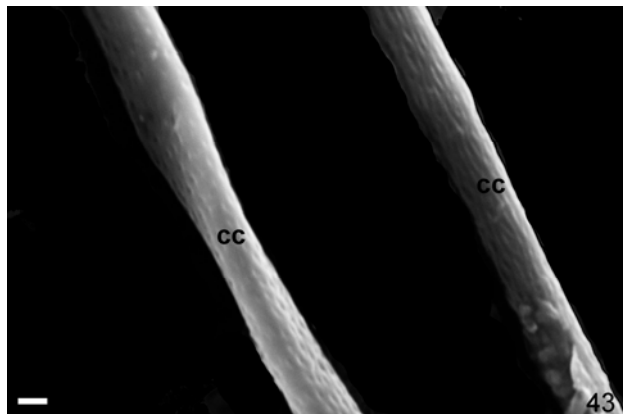
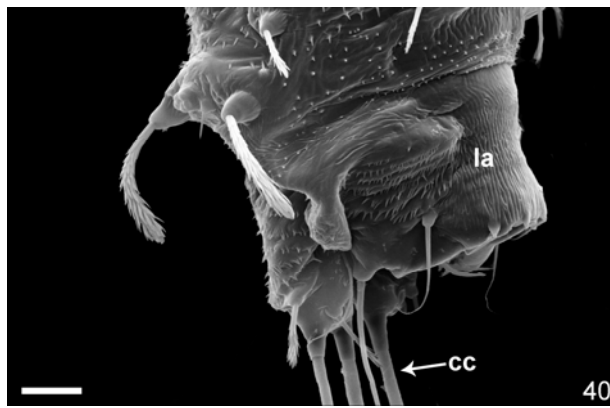
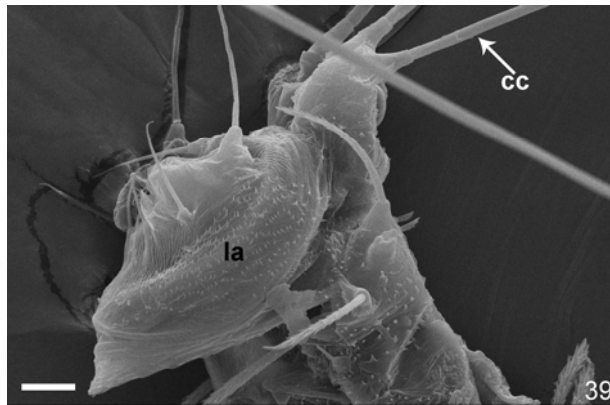


Fig. 39-42: Micrografias do lobo anal nos estádios larvares. 39: Vista geral na L3 de *Lutzomyia neivai* (bar 20 μ m). 40: Vista geral na L3 de *Lutzomyia*

intermedia RJ (bar 20 μ m). 43: Micrografia das cerdas caudais de L2 de *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 2 μ m). cc: cerdas caudais; la: lobo anal.

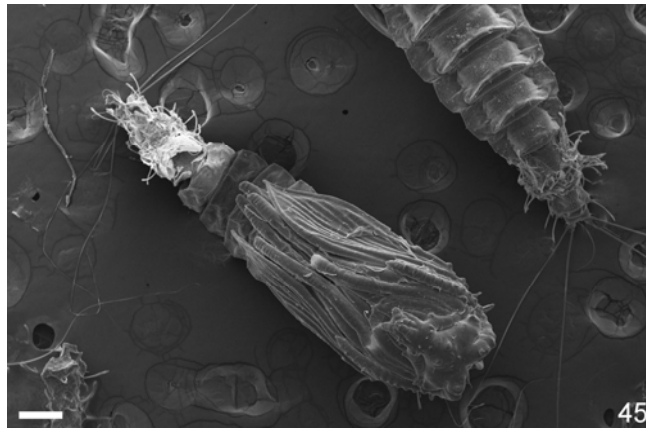


Fig. 45-47: Micrografias de pupas. 45: Vista ventral de *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 200 μ m). 46: Vista ventral de *Lutzomyia neivai* (bar 200 μ m). 47: Vista dorsal da cabeça de pupa *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 200 μ m).

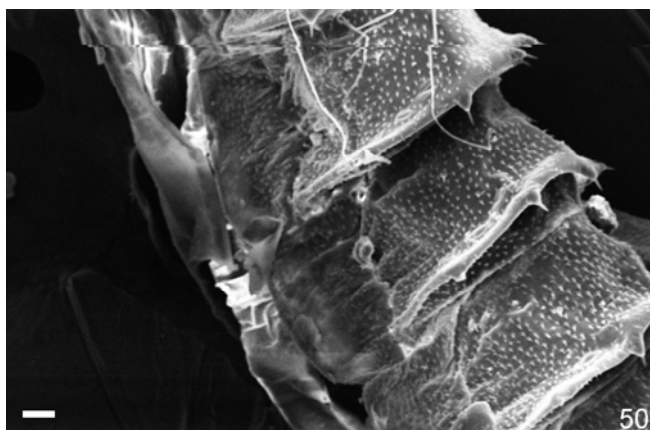
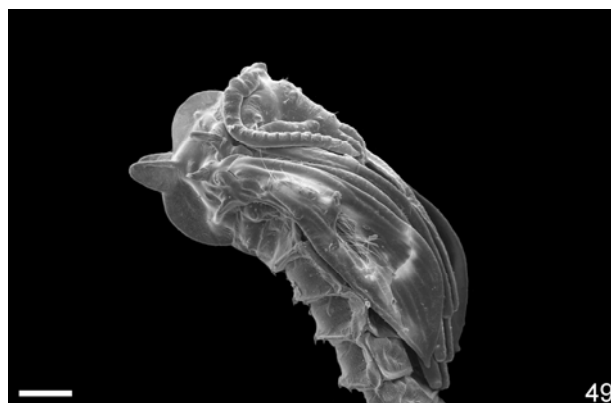
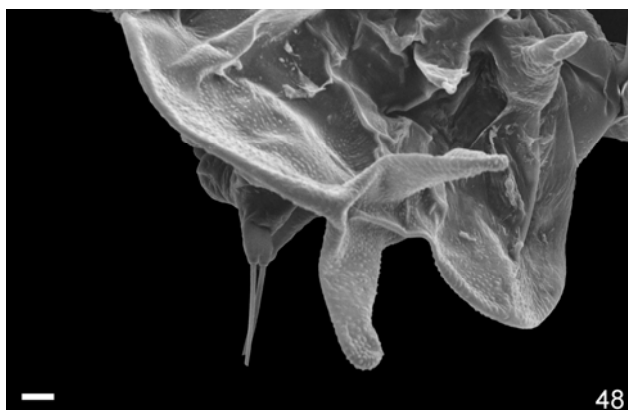


Fig. 48-51: Micrografias de pupas. 48: Detalhe do tegumento da cabeça de *Lutzomyia neivai* (bar 30 μ m); 49: Vista lateral de *Lutzomyia intermedia* RJ (bar 200 μ m). 50: Vista lateral dos segmentos do corpo de *Lutzomyia neivai* (bar 30 μ m). 51: Vista lateral de *Lutzomyia intermedia* (bar 100 μ m).

5. DISCUSSÃO

Comumente a taxonomia de flebotomíneos é baseada na morfologia de adultos. Porém, com relação às formas imaturas, o conhecimento desta morfologia tem sido pouco explorado a fim de revelar caracteres taxonômicos visando a identificação da espécie (Van Emden, 1957). Os estudos realizados com a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitem observar um número de estruturas que não são visíveis ao microscópio ótico, contribuindo para um melhor entendimento da biologia, fisiologia e comportamento destes insetos, além da contribuição taxonômica. Graças a essa ferramenta, abriu-se à possibilidade de realizar estudos morfológicos detalhados com objetivos, entre outros, de contribuir para solucionar a identificação de representantes de complexos, além de contribuir para estudos de importância filogenética (Forattini, 2002).

Estudos taxonômicos baseados na morfologia do exocócion foram realizados em diferentes espécies de dípteros. O cócion é secretado pelas células do epitélio folicular ovariano, durante a coriogênese e por ser viscoso permite ao ovo aderir ao substrato. O cócion é uma estrutura rígida formada por duas camadas: uma camada interna, o endocócion, em contato com o embrião e uma camada externa, o exocócion, em contato com o ambiente, formando a casca do ovo (Clements, 1963). Quando seca o cócion apresenta camadas distintas, geralmente formando elaboradas esculturas na superfície do ovo que assume os padrões característicos de cada espécie. Esta camada tem a função de cobrir e proteger o embrião, prevenindo-o do dessecação e regulando as trocas gasosas (Endris et al., 1987; Fausto et al., 2001; Bahia-Nascimento et al., 2007).

Alguns padrões de ornamentação do cócion observados nas duas espécies aqui estudadas foram descritos anteriormente para ovos de outras espécies de flebotomíneos. São eles: cristas paralelas conectadas, cristas paralelas desconectadas, reticular, forma de

vulcão, poligonal, elíptico, verrucoso e disperso (Perez & Ogusuku, 1997; Almeida et al., 2004.)

Ambas as espécies estudadas apresentaram um padrão de ornamentação bem semelhante, com cristas paralelas e desconectas, com tubérculos entre as cristas. Entretanto, em *L. (N.) neivai* pode-se observar um maior número destes tubérculos formando uma ou mais fileiras quando comparados aos observados no exocócion de *L. (N.) intermedia*. Considerando a origem e a função do exocócion como já acima citados, sugere-se a existência de uma relação entre as espécies estudadas e o microecossistema de seu desenvolvimento larval, onde *L. (N.) neivai* é registrado em ambientes mais frios e secos em relação a *L. (N.) intermedia* espécie comum de ambientes mais quentes e úmidos (Andrade-Filho et al., 2007).

A morfologia de vários flebotomíneos do Velho Mundo (Mukerji 1931, Smith e cols., 1934, Abonnenc and Lariviere, 1957; Perfil'ev, 1966, Trouillet, 1976) e do Novo Mundo (Barretto, 1940; Mangabeira e Sherlock, 1962; Guitton e Sherlock, 1969; Ward, 1972, 1976) foram estudadas através microscopia ótica, sendo descritas as diferentes estruturas corporais de imaturos. Estas análises permitiram a conclusão de que as larvas de todos os flebotomíneos são muito similares morfologicamente (Perfil'ev, 1966).

De maneira geral as larvas das duas espécies apresentaram-se bastante semelhantes. Tendo elas hábitos terrestres e com um ciclo de duração que varia de espécie para espécie, dependendo das condições ambientais, principalmente da temperatura e umidade relativa do ar. A média dos períodos larvais varia de 15 a 55 dias. À medida que se desenvolvem tornam-se mais ativas alimentando-se vorazmente (Young & Ducan, 1994; Rey, 2001; Brasil, 2006).

Estudos com imaturos de *Lutzomyia longipalpis* foram conduzidos por diversos pesquisadores, Leite et al. (1991), Leite e Williams (1996, 1997), Secundino & Pimenta (1999), e mostraram que as larvas do primeiro estágio apresentam diferenças significativas com relação aos outros estádios, destacando a presença da estrutura para rompimento do ovo, o tamanho das antenas e o número de cerdas caudais. Também não se observou nenhuma estrutura variante nos demais estádios larvais considerando-se assim, como senso

comum que os instares segundo e terceiro são idênticos morfologicamente ao quarto, com variação apenas de tamanho.

Pereira et al em 2006 estudou o egg Buster em larvas de primeiro instar de *Aedes aegypti*. Esta estrutura comum a outros dípteros também foi estudada em *L. whitmani* e *L. intermedia*, e pequenas diferenças relacionadas às dimensões (Bahia-Nascimento et al. 2007). Leite e Williams (1997) e Secundino e Pimenta (1999) observaram a mesma estrutura em *L. longipalpis*.

A antena do primeiro instar diferiu dos demais no segmento antenal distal, sendo curto no primeiro e longo nos demais. Nesta foi registrada a presença de vários tipos de sensilas nas antenas destacando os tipos: clavada basicônica, celocônica áspera e celocônica multiporos. Estas sensilas são importantes órgãos sensoriais que funcionam como hidrorreceptores, quimiorreceptores de contato e receptores de temperatura permitindo a percepção de mudanças no ambiente (Mukhopadhyay & Ghosh, 2000, Bahia-Nascimento et al., 2007). A morfologia das antenas nas espécies objeto deste estudo foram similares. Segundo Young e Duncan (1994), há 4 grupos diferentes de antenas baseados na aparência.

O aparato bucal do tipo mastigador foi descrito para flebotomíneo por Leite e Williams (1996, 1997) e Mukhopadhyay e Ghosh (2000), sendo composto de clípio, labrum, mandíbula, maxila e mento. Nas espécies estudadas, *L. intermedia* e *L. neivai*, não se observou nenhuma variação morfológica nestas estruturas, somente alguma variação nas medidas.

Dos diversos tipos de cerdas que revestem as larvas e pupas de flebotomíneos, cinco subtipos de sensilas tricóideas têm sido descritos, em estudos prévios: longa, localizadas na frente e ao redor do lobo anal; curta, observadas nas peças bucais e ao redor do lobo anal; longa e curvada nas laterais das pseudo-pernas; forma de escova, localizadas na superfície dorsal e lateral do corpo das larvas e atrás da antena no topo da cabeça e forma delicada de escova localizada no meio da cabeça em frente as antenas (Leite & Williams, 1996, 1997; Secundino & Pimenta, 1999; Bahia-Nascimento et al., 2007) . As setas tricóideas do protórax apresentaram-se de forma semelhante tanto em *L. intermedia* quanto em *L. neivai*, com pequena variação métrica. Estudos de quetotaxia de flebotomíneos foram realizados por Ward (1976), Ogusuku e Pérez (1995) e Arrivillaga et al. (1999), que detalharam a

distribuição, morfologia e nomenclatura das cerdas de flebotomíneos do Velho e do Novo mundo. Leite e Williams (1996, 1997) descreveram as larvas de primeiro e quarto instar de *L. longipalpis* a luz da microscopia eletrônica, dando também atenção a quetotaxia.

Como em outros dípteros, o sistema espiracular de flebotomíneos é mais desenvolvido no abdômen que no tórax, podendo diferir até em função nestes segmentos (Whitten, 1955). Fausto et al., (1999) observou que as larvas de flebotomíneos são anfipneusticas, com um pequeno par de espiráculos anteriores e outro ligeiramente maior posterior, sendo que o primeiro instar larval é metapneustico. As papilas variam interespecificamente em forma podendo ser cônica, cilíndrica ou em forma de cratera, além de variar tamanho e quantidade. Recentemente, espiráculos larvais tem sido considerados como uma possível ferramenta para identificação de imaturos, podendo ser aplicado em estudos filogenéticos (Fausto et al., 1998, 1999 ; Pessoa et al., 2000).

Fausto et al. (1999), descreveu a morfologia e ultraestrutura do sistema espiracular de três espécies do velho mundo, o que possibilitou distinguir *Phlebotomus papatasi*, *P. perniciosus* e *P. perfiliewi*, observando a presença destas estruturas nos quatro estádios larvais de flebotomíneos.

Pessoa et al. (2000), estudou os espiráculos posteriores do quarto estágio larval de *L. longipalpis*, *L. migonei*, *L. lenti* e *L. whitmani* no estado do Ceará observando variação específica. Entretanto, Fausto et al. (1999) observou um número de papilas diferentes em espécies de *L. longipalpis* e *L. migonei* na Venezuela, observando além disso uma variação na forma das papilas das espécies venezuelanas.

O abdômen das larvas consta de nove segmentos iguais, com exceção dos dois últimos que são modificados e adaptados à função locomotora, e possuem cerdas caudais. Estes filamentos são quimiorreceptores e apresentam uma série de poros. Nas espécies estudadas não se identificou nenhuma padronização destes poros (Pessoa et al., 2001).

Observou-se a morfologia do lobo anal no segmento terminal e este não apresentando diferenças para as duas espécies estudadas. Este resultado difere do observado por Bahia-Nascimento et al. (2007), para as espécies *L. (N.) whitmani* e *L. (N.) intermedia*, que apresentaram variações no tamanho e na presença de ranhuras.

O seguimento terminal apresentou também os filamentos caudais no último segmento abdominal, sendo um par no primeiro instar e dois pares nos instares seguintes

Leite et al. (1991), descreveu a pupa de *L. longipalpis* onde é possível visualizar as estruturas em formação do adulto, como antenas, patas e asas. Secundino & Pimenta (1999) detalharam a visualização do tegumento da pupa coberto de pequenos espinhos. Entretanto, nossos estudos com *L. intermedia* e *L. neivai*, não distinguiram nenhuma estrutura que possibilitasse a separação das espécies neste estágio.

A mensuração dos ovos e larvas foi realizada com o objetivo de obter dados preliminares uma vez que visualmente algumas estruturas apresentavam-se com tamanhos diferenciados. Como exemplo disso temos o “egg buster” na larva I o qual se apresentou maior em comprimento em *L. intermedia* do que em *L. neivai*, ocorrendo o inverso em relação à largura. Da mesma forma, outras estruturas como o pedicelo e antenômero, componentes das antenas, apresentaram tamanhos diferenciados nos estádios estudados. Entretanto, as partes bucais nos estádios visualizados não apresentaram esta diferença.

As medidas obtidas para ovos, larvas e pupas caracterizam melhor as estruturas, sem objetivar, entretanto uma análise morfométrica, uma vez que para estes estudos far-se-iam necessários um número maior de exemplares, bem como a uniformização de idade/ tempo dos exemplares utilizados.

6. CONCLUSÕES

A ornamentação do córion de *L. (N.) intermedia* e de *L. (N.) neivai* apresentaram uma variação no padrão morfológico, que apesar de muito semelhantes entre si podem apresentar adaptações relacionadas ao ambiente de desenvolvimento destes ovos.

As estruturas morfológicas dos diferentes estádios larvais, apesar de todas terem demonstrado importância taxonômica para alguns gêneros e sub-gêneros já estudados no Velho e do Novo Mundo, para *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) neivai* os estudos não foram conclusivos, possivelmente devido a proximidade filogenética das espécies estudadas.

O uso integrado das estruturas já descritas na literatura pode possibilitar a exata identificação das larvas de flebotomíneos, além de ser de grande importância filogenética, podendo ser indicado para grupos de espécies não aparentados, uma vez que nossos estudos não possibilitaram por esta metodologia uma separação das espécies estudadas. Entretanto, uma classificação de formas imaturas deve ir de concordância à classificação utilizada para as formas adultas.

Outras abordagens fazem-se necessárias tais como estudos relacionados a morfologia interna, histologia, estudos moleculares, morfometria e quetotaxia das estruturas visando relacionar a as estruturas externas a alterações ambientais e funcionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, M. M. S. Estudos sobre algumas populações brasileiras de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): morfologia, morfometria e hábitos alimentares. 88P. **Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.** 2008.

Aguiar, G. M. & Medeiros W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel ER, Lainson R, editors. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz;. P. 207-255 2003

Aguilar, C. M., Rangel, E. F., Grimaldi, G. & Momem, H. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in endemic area in the State of Rio de Janeiro. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, **82**: 143, 1987.

Almeida, D. N., Oliveira, R. S.; Brazil, B. G.; Soares, M. J. Patterns of Exochorion Ornaments on Eggs of Seven South American Species of *Lutzomyia* Sand Flies (Diptera: Psychodidae). **Journal Med. Entomol.** 41(5):819-825, September, 2004.

Andrade-Filho, J. D. Morfologia do Complexo *Nyssomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Dissertação de Mestrado Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo**. 138p. 2003.

Andrade-Filho, J. D.; Carneiro, A. P. S.; Lima, M. L. N. ; Santiago, R. M. ; Gama, M. A. ; Santos, C. A. ; Falcão, A. L.; Brazil, R. P. Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera:Psychodidae). **Cadernos de Saúde Pública**. 13:767-770, 1997.

Andrade Filho J. D. A., Galati E. A. B., Falcão A L. *Nyssomyia intermédia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. B; 102:481—7, 2007.

Aragão, H. B. Transmissão de Leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **Brasília Médica**. 36: 129-130, 1922.

Aragão, H. B. Leishmaniose tegumentar e sua transmissão pelos phlebotomos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 20 (2): 177-185, 1927.

Araujo, F. N. A. Epidemia da Leishmaniose Tegumentar na Ilha Grande, 144p. **Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.** 1979.

Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology.** 30: 1269-1281, 2000.

Bahia-Nascimento, A. C. ; Secundino, N. F. C.; Miranda, J. C.; Prates, D. B.; Souza, A. P. A.; Fernandes, F. F.; Barral, A; Pimenta, P. F. P. Ultrastructural Comparison of External Morphology of Immature Stage of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera:Psychodidae), Vectors of Cutaneous Leishmaniasis, by Scanning Electron Microscopy. **Journal Medicine Entomology** 44(6):903-914,2007.

Barreto, M. P. Contribuição para o conhecimento dos flebótomos de São Paulo. IX. Anomalias observadas na terminalia do macho de *P. alphabeticus* Fonseca, 1936 e de algumas outras espécies (Diptera, Psychodidae). **Revista de Medicina e Cirurgia (Brasil).** 51:703-710, 1943.

Barreto, M. P. Observações sobre a biologia em condições naturais dos Phlebotomus do Estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae). 162p. **Tese de Docência Livre. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.** 1943.

Barreto, M. P. Subfamílias e gêneros neotropicais da família Psychodidae Big. 1854 (Diptera, Psychodidae). **Papéis Avulsos de Zoologia.** 14: 211-25, 1961.

Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, (Serie A. Normas e Manuais Técnicos). 182, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora MS, 122P. 2003.

Camargo-Neves, V. L. F., Gomes, A. C., Antunes, J. L. F. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 35:299-306, 2002.

Casanova, C.; Mayo, R. C.; Rangel, O.; Mascarini, L. M.; Pignatti, M. G.; Galati, E. A. B.; Gomes, A. C. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neivai) infection in the valley of the Mogi Guaçu river, State of São Paulo, Brazil. **Bol. Dir. Malariol. Y. San. Amb.** 35 (supl.1):77-84, 1995.

Cipa Group. Proposition of a standard description for Phlebotomine sandflies (Int. Intern. Symp. Phleb. Sandflies). **Parassitologia**. 33 (Suppl. 1): 127-135, 1991.

Cipa Group 1999. Bermudes, H.; Dedet, J. P.; Falcão, A. L.; Feliciangeli, D.; Ferro, C.; Galati, E. A. B.; Gomes, E. L.; Herrero, M. V.; Hervas, D.; Lebbe, J.; Morales, A.,; Oguzuku, E.,; Perez, E.; Rangel, E. F.; Sherlock, I. A.; Torres, M.; Vignes, R.; Wolff, M. **Lista de Agentes Infecciosos**. 1999. Disponível em: <<http://cipa.snv.jussieu.fr/accueil.html>>. Acessado em: 24 maio, 2005.

Córdoba-Lanus, E.; De Grosso, M. L.; Piñero, J. E.; Valladares, B.; Salomón, O. D. 2005. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. **Acta Tropica**. 98(1):1-5.

Deane, L. M.. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**, 126pp. 1956.

Duckhouse, D. A. A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 6A: 1-29, 1973.

Falqueto, A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo. 84p. **Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto, Fundação Oswaldo Cruz**. 1995.

Fausto, A. M.; Maroli, M.; Mazzini, M. Ootaxonomy and egg Shell ultrastructure of *Phlebotomus* sandflies. **Med. Vet. Entom.** 6:201-208, 1992.

Fausto, A. M.; Taddei, A. R.; Mazzini, M, Maroli, M.; Morphology and ultrastructure of spiracles in phlebotomine sandfly larvae. **Med. Vet. EnMedical and Veterinary**. 13:101-109 1999.

Fausto, A. M.; Feliciangeli, M. D.; Maroli, M.; Mazzini, M. Ootaxonomic Investigation of Five *Lutzomyia* Species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. 96(2):197-204, February 2001.

Feliciangeli, M. D; Castejon, O. C.; Limongi, J. Egg Surface Ultrastructure of Eight New World Phlebotomine Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae). **J. Med. Entomol.** 30(4):651-656, July 1993.

Forattini, O. P. Nota sobre a biologia de *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) em região da Bacia do Rio Paraná (Brasil). **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública**. 8: 15-136, 1954.

Forattini, O. P. & Santos, M. R. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neivai 1912, por formas em Leptomonas, em foco de Leishmaniose tegumentar americana. **Arq. Hig.** 17: 171- 174, 1952.

Foratti, O. P.; Rabelo, E. X.; Pattoli, D. B. G.; Ferreira, A. O.. Nota sobre um foco de leishmaniose tegumentar na região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública.** 6:103-105, 1972.

Galati, E. A. B. Morfologia e taxonomia. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E. R.; Lainson, R., editors. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 23 - 51.

Gomes, A. C.; Santos, J. L. F. & Galati, E. A. B. Ecological aspects of american cutaneous leishmaniasis 4. Observations on the endophilic behaviour of the sand fly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of S. Paulo State, Brasil. **Revista de Saúde Pública.** 20: 280-287, 1986.

Gomes, A. C.; Barata, J. M. S.; Rocha e Silva, E. O.; Galati, E. A. B.. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotominica antropofílica de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 31:32-39, 1989.

Grimaldi Júnior, G.; Momen, H.; Naiff, R. D.; McMahon-Pratt, D.; Barret, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 44(6): 645-661, 1991.

Guimarães, F. N. Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea na Baixada Fluminense (estado do Rio de Janeiro). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 53: 1-11, 1955.

Guimarães, F.N. & Bustame, F. M. A aplicação domiciliar de DDT como base de profilaxia das leishmanioses. Estudo de um foco de leishmaniose muco-cutânea cinco anos depois da aspersão periódica com aquele inseticida. **Revista Brasileira de Malariologia.** 6: 127-130, 1954.

Hayat, M. A. Principles and techniques of electron microscopy. **Biological applications. Volume I.** New York: Van Nostrand Reinhold Company. 1970.

Killick-Kendrick, R.; Tang, Y.; Killick-Kendrick, M.. Phlebotomine sandflies of Kenya (Diptera: Psychodidae). IV. The armature in the genital atrium of female *Larrousius* as a means of identification. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 88:433-437, 1994.

Lainson, R.. The American leishmaniasis: some observation on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 77: 569-596, 1983.

Lainson, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society London Serie B.** 321: 389-404, 1988.

Lainson, R. & Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz.** 100(8):811-27, 2005.

Lainson, R.; Shaw, J. J.. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: **Microbiology Infections**. Ed. Topley & Wilson, 9th edition, chapter 13, p. 241-266, 1998.

Leite, A. C.; Williams, P. Description of the Fourth Instar Larva of *Lutzomyia longipalpis*, under Scanning Electron Microscopy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 91 (5):571-578, 1996.

Leite, A. C.; Williams, P. The First Instar Larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 92 (2):197-203, April 1997.

Lewis, D. J. et al. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**. 2: 319-332, 1977.

Lutz, A. & Neiva, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 4: 82-95, 1912.

Marcondes, C. B. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 91 :457-462, 1996.

Marcondes, C. B. Morfometria e DNA mitocondrial de populações sul americanas de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae). Curitiba; 1997. **Tese (Doutoramento, Entomologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná**. 1997.

Marcondes, C. B.; Borges, P. S. S. Distinction of males of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) species complex by ratios between dimensions and by an artificial neural network (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz.** 95:685-688, 2000.

Marcondes, C. B.; Lozovei, A. L.; Vilela, J. H. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae). **Rev Soc Bras Med Trop.** 31: 51-58, 1998.

Marcondes C.B., Bittencourt I. A., Stoco P. H., Eger I., Grisard E. C., Steindel M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2009.

Martins, A.V.; Williams, P. & Falcao, A. L. American Sand Flies. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 195p. 1978.

Mayrink, W., Williams, P., Coelho, M. V., Magalhães P. A., Costa, C. A., Falcão, A. R., Melo, M. N., Falcão, A. L. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brasil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 73: 123-137, 1979.

Meneses, C. R. V.; Cupolillo, E.; Monteiro, F.; Rangel, E. F. Micro-geographical variation male populations of the sandfly, *Lutzomyia (N.) intermedia*, from an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Medical and Veterinary.** 19:8-47, 2005.

Modi, G. B. & Tesh, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal Medical Entomology.** 20:568-569, 1983.

Oliveira-Neto, M. P.; Mattos, M.; Souza, C. S.; Fernandes, O.; Pirmez, C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol.** 37(11):846-9, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (World Health Organization). **Leishmaniasis: Disease Burden.** Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html>. Acessado em: 15 de jul. 2008.

Perez, J. E. & Ogusuku, E. Chorion pattern on eggs of *Lutzomyia* sand flies from the Peruvian Andes. **Med. Vet. Entomol.** 11:127-133, 1997.

Pessoa, F. A. C.; Queiroz, R. G.; Ward, R. D. Posterior Spiracles of Fourth Instar Larvae of Species of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) under Scanning Electron Microscopy. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz.** 95(5):689-691, 2000.

Pessoa, F. A. C.; Queiroz, R. G.; Ward, R. D. External Morphology of Sensory Structures of Fourth Instar Larvae of Neotropical Species of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) under Scanning Microscopy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 96(8):1103-1108, November, 2001.

Peters W, Killick-Kendrick R The Leishmaniasis in Biology and Medicine, London, **Academic Press, v.I,** 941pp. 1987.

Pinto, C. “*Phlebotomus neivai*” e “*Phlebotomus fischeri*” N. SP. Sobre o aparelho espiracular dos flebótomos e seu valor específico. **Sciencia Médica.** 4: 370-375, 1926.

Pinto, C. Arthropodos parasitos e transmissores de doenças. Tomo II (Biblioteca Científica Brasileira); **Phlebotomos.** 491-538, 1930.

Pita-Pereira, D.; Souza, G. D.; Zwetsch, A.; Alves, C. R.; Brito, C; Rangel, E. F. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

naturally infected by *Leishmania (V.) braziliensis* in a periurban area of South Brazil, State of Rio Grande do Sul, using a PCR multiplex assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. , p. , 2009.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Bertho AL, Britto CFB. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 99:905—13, 2005.

Rangel, E. F.; Souza, N. A.; Wermelinger, E. D. & Barbosa, A. F.. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 79:395-396, 1984.

Rangel, E. F., Ryan, L., Shaw., J. J. Observations on the sandfly (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) fauna of Além Paraíba, State of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsute hirsuta*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 80: 373-374, 1985b.

Rangel, E. F., Souza, N. A., Wermelinger, E. D., Barbosa, A. F. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 80: 219-226, 1985a.

Rangel, E. F., Azevedo, A. C. R., Andrade, C. A., Souza, N. A., Wermelinger, E. D. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 85: 39-45, 1990.

Rangel, E. F. Tropical Diseases, Society and the Environment. **SAREC Documentation/TDR**, p.103-110, 1995.

Rangel, E. F. & Lainson. Transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, E. R.; Lainson, R. editors. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003.p. 291-309, 2003.

Rangel, E. F. et al. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 88: 513-515, 1992.

Ready, P. & Rangel, E. F. In: Rangel ER, Lainson R. Caracteres isoenzimáticos e moleculares: espécies crípticas. In: Rangel ER, Lainson R, editors. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 185-206, 2003

Rey, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro Guanabara Koogan,731pp, 2001.

Rogo, L. R., Kokwaro, E. D., Mutinga, M. J., Khamala, C. P. M. Differentiation of vector species of phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Kenya by chorionic sculpturing of their eggs. **J. Med. Entomol.** **29**: 1042-4, 1992.

Savani, E. S.; de Oliveira Camargo, M. C.; de Carvalho, M. R.; Zampierre, R. A.; dos Santos, M. G.; D'auria, S. R.; Shaw, J. J.; Floeter-Winter. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, **Brazil.Vet Parasitol.** 120(3):229-33, 2004.

Scopoli, J. **Deliciae florae et faunae insubricaе**. Pavia, 1786. 85p.

Secundino, N. F. C. & Pimenta, P. F. P. Scanning Eletron Microscopic Study of the Egg and Immature Stages of the Sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Acta Microscopica** 8: (2) 33- 38, 1999.

Shaw, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 89: 471-478, 1994.

Silva, A. C. Avaliação da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia*, S. Lat. (Lutz & Neiva, 1912) para *L. (V.) braziliensis* Viana, 1911 e suas implicações epidemiológicas. **Tese de Doutorado Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo**. 153p, 1998.

Silva, A. M., Camargo N. J., Santos, D. R., Massafra R, Ferreira A. C., Postai C., Cristóvão E. C., Konolsaisen J. F., Bisetto A. Jr., Perinazo R., Teodoro U, Galati E. A. Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Paraná State, Southern Brazil. **Neotrop Entomol.** 37 (2) : 209-25, 2008.

Silveira, F. T.; Ishikawa, E. A. Y.; Souza, A. A. A.; Lainson, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergin*. sp. a new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**. 9: 43-50, 2002.

Silveira, F. T.; Shaw, J. J.; Braga, R. R.; Ishikawa, E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Para. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Apr-Jun;82(2):289-91, 1987.

Young, D. C. & Duncan, N. A. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Ann. Entlms.** 54:1-881, 1994.

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

Ward, R. D. & Ready, P. Chorionic sculpturing of some sandfly eggs (Diptera: Psychodidae). **Journal of Entomology**. (A) 50: 127-134,1975.