

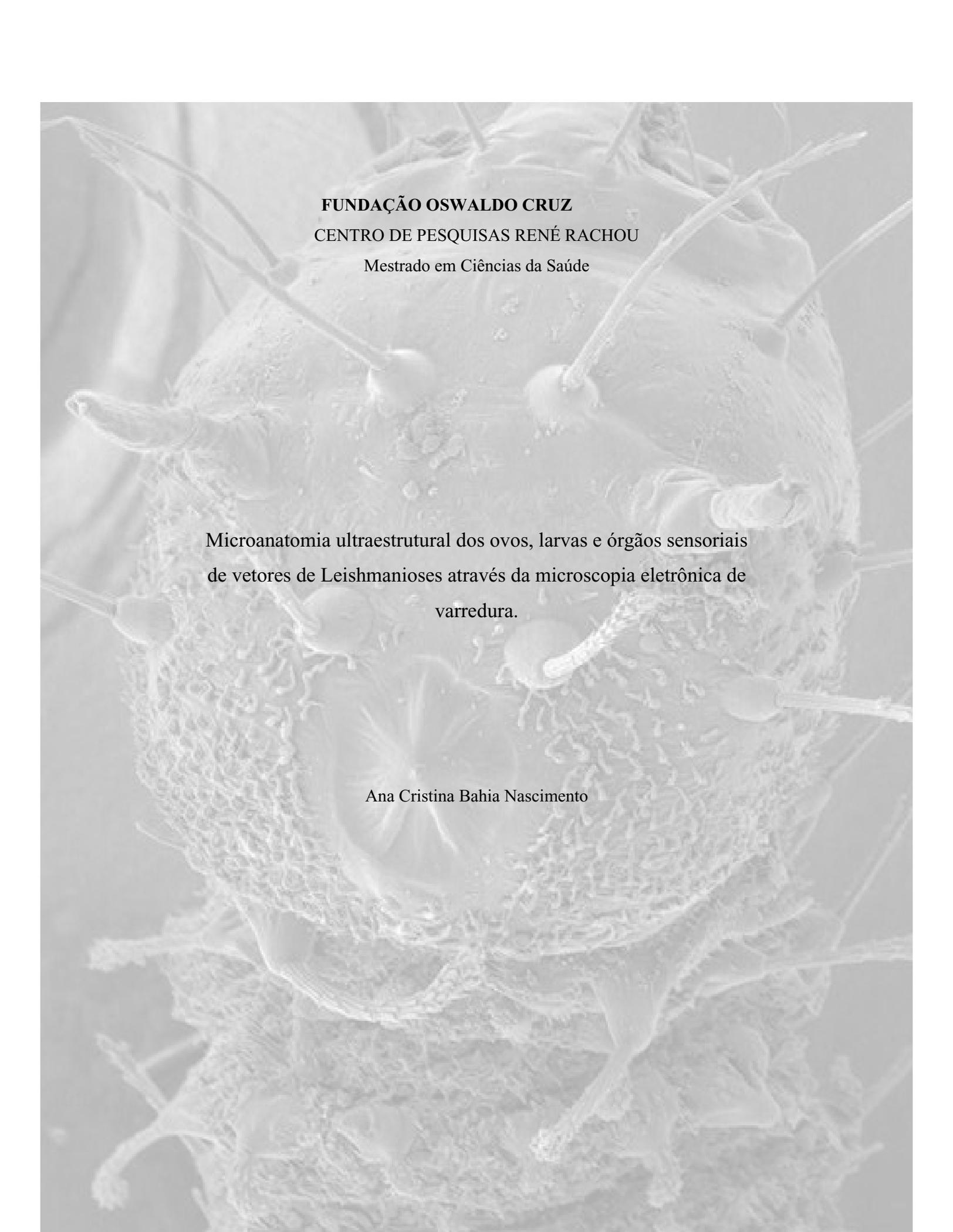
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Mestrado em Ciências da Saúde

MICROANATOMIA ULTRAESTRUTURAL DOS OVOS, LARVAS E
ÓRGÃOS SENSORIAIS
DE VETORES DE LEISHMANIOSES ATRAVÉS DA MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA.

ANA CRISTINA BAHIA NASCIMENTO

Belo Horizonte
Fevereiro de 2006

TESE CS-BCM-CPqRR	A.C. BAHIA	2006
-------------------	------------	------



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Mestrado em Ciências da Saúde

Microanatomia ultraestrutural dos ovos, larvas e órgãos sensoriais
de vetores de Leishmanioses através da microscopia eletrônica de
varredura.

Ana Cristina Bahia Nascimento

Belo Horizonte,
Fevereiro de 2006

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde: sub-área Biologia Celular e Molecular

MICROANATOMIA ULTRAESTRUTURAL DOS OVOS, LARVAS E
ÓRGÃOS SENSORIAIS
DE VETORES DE LEISHMANIOSES ATRAVÉS DA MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA.

Ana Cristina Bahia Nascimento

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, sub-área Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Co-orientador: Dr^a Nágila Francinete Costa Secundino

Fevereiro, 2006

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

N244m
2006

Nascimento, Ana Cristina Bahia

Microanatomia ultraestrutural dos ovos, larvas e órgãos sensoriais de vetores de leishmanioses através da microscopia eletrônica de varredura / Ana Cristina Bahia Nascimento.- Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisa René Rachou, 2006.

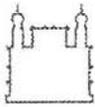
XVII,132f.: il. 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: 12f

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação do Centro de Pesquisa René Rachou em Ciências da Saúde na Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Flebotomíneos 2. Morfologia 3. Sensilas 4. Microscopia eletrônica de varreduras I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientador) III. Secundino, Nágila Francinete Costa (Co-orientador)

CDD – 22. ed. – 616.963



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

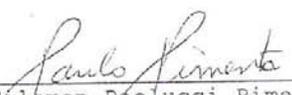
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da décima sexta defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Ana Cristina Bahia Nascimento, sob a orientação da Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta e co-orientada pela Dra. Nágila Francinete Costa Secundino.

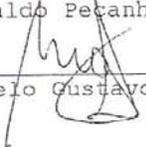
Aos vinte um dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e seis, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da décima sexta dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A dissertação da aluna Ana Cristina Bahia Nascimento intitula-se "Microanatomia ultraestrutural dos ovos, larvas e órgãos sensoriais de vetores de Leishmanioses através da microscopia eletrônica de varredura". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta CPqRR/FIOCRUZ (orientador e presidente da banca), Dr. Reginaldo Peçanha Brazil - IOC/FIOCRUZ (membro titular), Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular) e Dr. Edelberto Santos Dias - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após arguir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Paulo Filemon Paolucci Pimenta, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e um de fevereiro de dois mil e seis.



Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta



Dr. Reginaldo Peçanha Brazil



Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

Dedico a meus pais, Ana e João,

com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador e grande amigo Paulo que sempre acreditou em mim e na minha capacidade profissional de vencer desafios. Depois de conhecê-lo descobri como é ser um verdadeiro cientista. Para ele ser cientista não é uma profissão, mas sim um hobby. Tem o seu laboratório como a sua própria casa, vê seus trabalhos como simples forma de distração. Foi muito bom tê-lo como orientador e amigo. Muito obrigada pelos grandiosos ensinamentos que levarei comigo por toda a minha carreira profissional. Espero que a nossa união e amizade durem por muito tempo.

A minha querida amiga e co-orientadora Nágila, uma excelente professora, muito dedicada aos seus alunos; e uma profissional excepcional com a qual aprendi muito. É acima de tudo uma pessoa fantástica e muito amiga. Você nestes dois anos foi muito mais do que uma orientadora foi também a minha família. Muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Fernando F. Fernandes pelos ensinamentos, auxílio no microscópio eletrônico de varredura com seus aumentos mirabolantes e pelas discussões dos resultados das sensilas dos flebotomíneos.

Aos meus queridos amigos de laboratório Bruno, Carol, Cris, Érika, Gu, Lili, Lu, Lu Maria Rafa, Tati, Tiago, Vanessa e Zile por fazerem do ambiente de trabalho um local agradável e gostoso de se trabalhar. Obrigada pela ajuda, alegria, bate-papos do almoço, amizade e apoio nos momentos difíceis.

Agradeço especialmente aos meus amigos de pós-graduação Lili e Lu pela força e auxílio nos momentos finais dessa dissertação.

A secretária do laboratório de Entomologia Médica Érika Sorrentino pelo ajuda na impressão desta dissertação e pela grande amizade.

Aos meus amigos de pós-graduação pela cumplicidade e amizade durante essa nossa jornada, fazendo deste um momento bastante agradável do qual levarei lembrança.

A Coordenadora de Pós-graduação, Virginia Shall, pela grande atenção e dedicação ao programa e aos seus alunos.

Aos secretários de Pós-graduação Paulo, Cris e Neyde pela amizade e presteza com os afazeres da pós-graduação e dos seus alunos.

Ao Segemar pelo suporte em literatura científica, revisão bibliográfica, atenção e amizade.

A Ana Carolina pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

Ao Edmar, Mateus e Daniel pelo suporte em serviços de informática.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou na pessoa dos diretores Dr. Roberto Senna e Dr. Álvaro Romanha e ao laboratório de Entomologia Médica pela vivência científica.

Ao laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, a chefe do laboratório Dr^a Aldina Barral, ao pesquisador Dr. José Carlos Miranda, a Ms. Deboraci Prates e a bióloga Ana Paula Almeida pelo suporte com os flebotomíneos provindo de Corte de Pedra-BA, além da grande amizade.

A minha professora de inglês Paola e as minhas colegas de turma Ana Carolina e Pollanah pela amizade, conversas, brincadeiras e bons momentos vividos durante as nossas duas horas semanais de aula.

A meus queridos pais que me deram força e me apoiaram muito nesta grande jornada. Como agradecer as duas pessoas que são a razão de eu ter conseguido chegar até aqui. Muito obrigada pelos ensinamentos de vida e de caráter, amor incondicional, grande apoio e imenso incentivo. Foi extremamente difícil seguir nesta etapa longe de vocês. Mas se hoje consegui, devo tudo a vocês que mesmo longe estavam constantemente presentes ao telefone ou mesmo em pensamento. Obrigada por tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Essa dissertação é de vocês!

Aos meus queridos irmãos (Dulceli, João Mário, Aú e Cacá,) e sobrinhos (Mariana, Eduardo e João) pela união, amor e carinho que rege a nossa família; e pela compreensão da ausência.

Ao meu querido amor, Fernando, que me auxiliou muito nesta etapa, principalmente nos momentos finais, suportando os meus choros, reclamações e cansaço com muita paciência e amor. Foi muito bom ter te encontrado. Você me completa!

A todos os amigos que me deram força nesta jornada. Aos amigos que estão longe foi muito difícil a separação, porém perto ou longe vocês sempre estarão em meu coração e pensamento.

Difícil é a tarefa de agradecer, sobretudo quando sabemos que palavras não externam a total gratidão a todos que participaram desses anos de formação profissional. Muito obrigada àqueles que direta ou indiretamente acreditaram e auxiliaram nesta etapa da minha vida.

RESUMO

Lutzomyia intermedia e *Lutzomyia whitmani* são transmissores de leishmanioses no Novo Mundo e *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus duboscqi* no Velho Mundo. Neste estudo observamos e comparamos os aspectos morfológicos gerais e detalhados dos ovos e larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani*. Estudamos também a microanatomia dos seus órgãos sensoriais nas larvas e nos adultos comparando-as com *P. papatasi* e *P. duboscqi*. Observações detalhadas do exocório dos ovos mostraram que ambas as espécies *L. intermedia* e *L. whitmani* possuem ornamentações de cristas não conectadas. Em geral, todas as fases larvais das duas espécies são similares. Contudo, algumas características distintas foram observadas, tais como: morfologia do lóbulo anal e padrão dos poros dos filamentos caudais. As larvas das duas espécies apresentam uma antena lobular em L₁, a qual é trocada para a forma digitiforme em L₂ que persiste até a fase L₄. Foram visualizados três tipos de sensilas nas larvas: basicônica clavada, celocônica (romba pequena e clavada multiporo) e tricóide (longa, pequena, longa curva, tipo escova, fracamente escova, longa multiporo). Nas antenas das fêmeas das quatro espécies estudadas foram encontrados cinco tipos de sensilas: celocônica (sulcada I, II e “mãos em prece”), tricóide (de ponta fina, de ponta romba e pequena), caética, escamiforme e campaniforme. Sensilas basicônicas foram encontradas somente para o gênero *Phlebotomus*. Poucas variações foram observadas nos tipos de sensilas das quatro espécies estudadas. Porém, diferenças foram observadas em quantidade e localização. Diferenças na dimensão dos segmentos antenais e da sensila caética foram também encontradas. Poros ou sulcos porosos foram visualizados na superfície dos filamentos caudais e na sensila celocônica clavada das larvas; e, na sensila caética e celocônica dos adultos, indicando a função de quimiorrecepção. Este estudo poderá estabelecer novas bases para a taxonomia desses importantes vetores e poderá auxiliar no direcionamento adequado dos trabalhos de eletrofisiologia e de controle biológico com semioquímicos.

ABSTRACT

Lutzomyia intermedia and *Lutzomyia whitmani* are able to transmit leishmaniasis in the New World, and *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus duboscqi* in the Old World. In this study, we observed and compared the general morphological aspects and the details of the eggs and larvae of *L. intermedia* and *L. whitmani*. We also studied the microanatomy of their sensory organs in the larvae and adults stages comparing them with those of *P. papatasi* and *P. duboscqi*. Detailed observations of the egg exochorion showed that both species have ornamentations of unconnected ridges. In general, all larval phases of the two species are similar. However, we observed some distinct characteristics, such as: anal lobule morphology and pattern of pores of the caudal filaments. The larvae of these species showed a lobular antenna in L₁, which changed to the digitiform format in L₂ and persisted until the L₄ phase. Three types of sensilla were visualized on the larvae: clavate basiconic, coeloconic (smaller blunt and multiporous clavate) and trichoid (long, small, curved long, brush-like and weakly brush-like). On the antennae of the females of the four studied species we observed five types of sensilla: coeloconic (grooved I, II and hands-prayer), trichoid (fine tip, blunt tip and small), chaetic, squame and campaniform. The basiconic sensilla were only found on the *Phlebotomus* species. On the four species, few variations were observed on the types of the sensilla; but, differences were found in quantity and distribution. Differences in the dimensions of the antennal segments and chaetic sensilla were also found. Pores and porous grooves were visualized on the surface of the caudal filaments and on the clavate coeloconic sensilla of larvae; and, on the chaetic and coeloconic sensilla of adults, suggesting an olfactory function. This study may establish a new basis for the taxonomy of these important vectors and can aid electrophysiology studies and biological control with semiochemicals.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Espermateca das espécies <i>L. intermedia</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>P. papatasi</i> e <i>P. duboscqi</i>	24
Fig. 2. Secção das camadas do ovo.....	26
Fig. 3. Aspecto geral da larva de flebotomíneo.....	28
Fig. 4. Aspecto geral da pupa de flebotomíneo.....	28
Fig 5. Desenho da estrutura de uma sensila.....	30
Fig. 6. Características cuticulares de vários tipos de sensilas.....	34
Fig. 7. Localização da área de estudo, Corte de Pedra - BA, município Presidente Trancredo Neves.....	38
Fig. 8. Região de Corte de Pedra - BA mostrando uma área com alta densidade de flebotomíneos.....	39
Fig.9. Armadilha C.D.C. – “Center for Disease Control Light Trap”.....	39
Fig. 10. Pote de individualização de flebotomíneos.....	40
Figs. 11-14. Superfície externa de ovos de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	55
Figs. 15-20. Eventos seqüenciais da quebra do ovo de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	56
Figs. 21-24. Aspectos gerais da microanatomia das larvas do <i>L. intermedia</i> e <i>L.</i> <i>whitmani</i>	57
Figs. 25 e 26. Lóbulos anais das larvas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	58

Figs. 27-29. Microanatomia da cabeça das larvas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	59
Figs. 30-33. Microanatomia das antenas das larvas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	60
Figs. 34-39. Microanatomia dos tipos de sensilas das larvas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	61
Figs. 40-44. Microanatomia das sensila de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	62
Figs. 45-82. Sensilas das antenas das fêmeas de <i>L. intermedia</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>P. papatasi</i> e <i>P. duboscqi</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos e subtipos de sensilas encontrados em cada segmento antenal de <i>L. intermedia</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>P. duboscqi</i> e <i>P. papatasi</i>	70
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Graf. 1: Dimensões dos segmentos das antenas de fêmeas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.....71
- Graf. 2: Dimensões das sensilas caéticas dos segmentos das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.....72
- Graf. 3: Número total de sensilas por segmento das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.....73
- Graf. 4: Número de sensilas tricóides de ponta romba encontradas nos segmentos das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.....74
- Graf. 5: Número de sensilas tricóides de ponta fina encontradas nos últimos três segmentos das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.....75
- Graf. 6: Número de sensilas celocônicas sulcada I encontradas nos três últimos segmentos das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.....76

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - síndrome de imunodeficiência adquirida

DNA - ácido desoxirribonucléico

cm² - centímetro quadrado

oc – grau Celsius

L₁ - primeira fase larval

L₂ - segunda fase larval

L₃ - terceira fase larval

L₄ - quarta fase larval

m - metro

mL - mililitro

mm - milímetro

M- molar

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

µm- micrometro

PBS - Tampão fosfato salina

pH - potencial de hidrogênio iônico

NOMENCLATURA UTILIZADA

A. aegypti - *Aedes aegypti*

A. albinamus - *Anopheles albinamus*

A. stephensi - *Anopheles stephensi*

L. braziliensis - *Leishmania braziliensis*

L. intermedia - *Lutzomyia intermedia*

L. whitmani - *Lutzomyia whitmani*

L. longipalpis - *Lutzomyia longipalpis*

P. papatasi - *Phlebotomus papatasi*

P. duboscqi - *Phlebotomus duboscqi*

P. bahiensis - *Phlebotomus bahiensis* = *Lutzomyia bahiensis*

P. bergeroti - *Phlebotomus bergeroti*

P. argentipes - *Phlebotomus argentipes*

T. braziliensis - *Triatoma braziliensis*

Sensila ampuliforme (der. latim – sensillum ampullacea)

Sensila auricular (der. latim – sensillum auriculicum)

Sensila basicônica (der. latim - sensillum basiconica)

Sensila caética (der. latim - sensillum chaetica)

Sensila campaniforme (der. latim - sensillum campaniformia)

Sensila celocônica (der. latim - sensillum coeloconica)

Sensila escamiforme (der. latim - sensillum escamiformia)

Sensila escolopofora (der. latim – sensillum scolopophora)

Sensila estilocônica (der. latim – sensillum styloconica)

Sensila placóide (der. latim – sensillum placodea)

Sensila tricóide (der. latim - sensillum trichodea)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
NOMENCLATURA UTILIZADA.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Os flebotomíneos.....	18
1.2 As leishmanioses.....	19
1.3. Vetores de leishmaniose cutânea.....	21
1.3.1 Importantes vetores no Novo Mundo.....	21
1.3.2 Importantes vetores no Velho Mundo.....	23
1.4 Descrição dos estágios imaturos dos flebotomíneos.....	25
1.4.1 Os ovos.....	25
1.4.2 As larvas.....	27
1.4.3 As pupas.....	28
1.5 O avanço dos estudos das formas imaturas.....	29
1.6 Os órgãos sensoriais dos insetos.....	29
1.6.1 A classificação das sensilas.....	32
1.7 Objetivos.....	35
1.7.1 Objetivo geral.....	35

1.7.2 Objetivos específicos.....	35
1.8 A relevância.....	36
2. MATERIAL E MÉTODO.....	38
2.1 Captura dos flebotômíneos.....	38
2.2 Alimentação sanguínea.....	39
2.3 Individualização.....	40
2.4 Manutenção da colônia.....	40
2.5 Coleta das amostras.....	41
2.5.1 Coleta das formas imaturas.....	41
2.5.2 Coleta dos adultos.....	41
2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	42
2.7 Classificação das sensilas.....	42
2.8 Contagem de sensilas das antenas.....	42
2.9 Medição das estruturas das formas larvares, dos segmentos antenais e da sensila caética das formas adultas.....	43
2.10 Análise estatística.....	43
3. RESULTADOS.....	44
3.1 Aspectos microanatômicos das formas imaturas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>.....	44
3.1.1 O ovo.....	44
3.1.2 A eclosão da larva.....	44
3.1.3 A larva.....	45
3.1.3.1 Aspectos gerais.....	45
3.1.3.2 O corpo.....	45
3.1.3.3 A cabeça.....	46
3.2 Órgãos sensoriais das larvas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>.....	47

3.3 Aspectos anatômicos e as sensilas das antenas das fêmeas de <i>L. intermedia</i>, <i>L. whitmani</i>, <i>P. duboscqi</i> e <i>P. papatasi</i>.....	48
3.3.1 Aspectos gerais das antenas.....	48
3.3.2 Dimensão dos segmentos antenais.....	48
3.3.3 Tipos de sensilas.....	49
3.3.4 Distribuição das sensilas nos segmentos antenais.....	50
3.3.4.1 Escapo.....	51
3.3.4.2 Pedicelo.....	51
3.3.4.3 Flagelo.....	51
3.3.5 Dimensão da sensila caética.....	53
3.3.6 Número de sensilas.....	37
4. DISCUSSÃO.....	77
4.1 Aspectos morfológicos das formas imaturas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>.....	77
4.2 Aspectos morfológicos dos órgãos sensoriais.....	79
4.2.1 Órgãos sensoriais das larvas de <i>L. intermedia</i> e <i>L. whitmani</i>	80
4.2.2 Morfologia e órgãos sensoriais das antenas de <i>L. intermedia</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>P. papatasi</i> e <i>P. duboscqi</i>	83
4.2.2.1 Aspectos gerais das antenas.....	83
4.2.2.2 Comprimento das antenas e da sensila caética.....	83
4.2.2.3 Tipos de sensilas.....	84
4.2.2.4 Número de sensilas.....	89
5. CONCLUSÕES.....	91
6. REFERÊNCIAS.....	92
7. APÊNDICE.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à Ordem Diptera, Sub-ordem Nematocera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. São insetos corcundas, pilosos e muito pequenos com aproximadamente dois a três milímetros de comprimento. Possuem vários nomes vulgares, como: “mosquito-palha”, devido à sua coloração amarelada semelhante à palha vegetal; “asa-branca” e “asa-dura”, por possuírem asas grandes de formato lanceolado que se mantêm eretas durante o pouso; “tatuquira”, devido ao hábito de se abrigarem em buracos de tatu; “arrepiado”, por possuírem o corpo piloso; e “pula-pula”, devido ao vôo do tipo saltitante.

A forma adulta desses insetos vive entre quinze e vinte sete dias em laboratório (Pessoa & Martins 1978). Os machos dos flebotomíneos são exclusivamente fitófagos, enquanto as fêmeas, além de ingerirem seiva vegetal, são hematófagas. O sangue ingerido pelas fêmeas é uma importante fonte de proteínas necessária para a maturação dos seus oócitos. Além disso, os carboidratos servem como fonte de energia inclusive podendo atuar no desenvolvimento e na infectividade da *Leishmania* no tubo digestivo dos insetos vetores (Jacobson & Schlein 2001). As fêmeas estão aptas à hematofagia podendo realizar o repasto sangüíneo após o segundo dia de vida, tanto de sangue humano quanto de animais. Algumas espécies de flebotomíneos são oportunistas e invadem o peridomicílio e o intradomicílio, podendo ter uma íntima associação com o homem e com os seus animais. De acordo com Neves et al. (1995), das mais de 350 espécies de *Lutzomyia* conhecidas, pelo menos 12 estão adaptadas a situações domésticas e peridomésticas.

Os flebotomíneos possuem uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados principalmente nas zonas temperadas ao nível do mar; como também em elevadas altitudes tendo como exemplo de ocorrência a 3.300m na cordilheira dos Andes (Forattini 1973). A maioria das espécies de flebotomíneos é encontrada em ambientes silvestres, normalmente em áreas florestais e rochosas. Esses insetos estão adaptados a sobreviverem em abrigos úmidos e escuros normalmente em condições de alta umidade e temperaturas moderadas. Em geral, tornam-se ativos no início do crepúsculo quando saem desses abrigos visando à obtenção de sangue, podendo persistir nessa busca ao longo de toda a noite, porém algumas espécies são diurnas. Suas atividades são fortemente influenciadas por variações climáticas como as chuvas, os ventos, as oscilações de temperatura e o ciclo lunar (Sherlock et al. 1996, Tapia et al. 1996).

Os flebotomíneos possuem uma grande importância médica. São os vetores de arbovírus, bartonelas e exclusivos de várias espécies de *Leishmania* que ocasionam respectivamente, as arboviroses, as bartoneloses e principalmente as leishmanioses. A picada desse inseto é extremamente dolorosa e pode ocasionar dermatose nos indivíduos mais sensíveis. Os flebotomíneos estão distribuídos em dois gêneros de importância médica e veterinária: o gênero *Phlebotomus*, transmissores no Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. Em 1990, Killick-Kendrick revisando trabalhos da literatura incriminou como vetoras onze espécies de flebotomíneos do Velho Mundo e oito espécies do Novo Mundo dentre as 700 espécies descritas em todo o globo. Trabalhos posteriores excluíram e outros incluíram novas espécies de flebotomíneos como vetoras. Recentemente, destas 700 espécies relatadas, cerca de 70 espécies já estão incriminadas ou consideradas suspeitas de transmitir *Leishmania* (Marcondes 2001).

1.2 As leishmanioses

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) (2005), a leishmaniose está entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância. É considerada doença endêmica em 88 países e está dispersa em 5 continentes, África, Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul. Acredita-se que 12 milhões de pessoas encontram-se afetadas por essa doença e que 350 milhões estão sob risco de contraí-la (Dejeux 1992, WHO 2005). Possui uma incidência anual de 1-1.5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (Dejeux 2001). Mais de 90% das leishmanioses cutâneas ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru; e mais que 90% da leishmaniose visceral ocorre em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (WHO 2005). Nas Américas encontra-se amplamente distribuída desde o Texas até o norte da Argentina, não havendo relato apenas no Chile, Uruguai e Canadá. No Velho Mundo, as leishmanioses encontram-se distribuídas no Sul da Europa, na Ásia (exceto no sul), no Oriente Médio e na África (particularmente no leste e norte) (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>).

No Brasil, as leishmanioses vêm se expandindo e crescendo a cada dia, particularmente nos últimos 20 anos, associando-se a altas taxas de mortalidade (Brandão-Filho et al. 1999). As leishmanioses encontram-se distribuídas em 17 dos 27 estados brasileiros, com uma alta incidência na região Nordeste, seguida pelas regiões Sudeste, Norte e o Centro-Oeste.

As leishmanioses são doenças infecciosas e não contagiosas, resultantes de uma infecção por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* engloba parasitos

pertencentes ao Filo Sarcomastigophora, Sub-filo Mastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (Lainson & Shaw 1987, Shaw 1994). O subgênero *Viannia* encontra-se distribuído nas regiões tropicais do Novo Mundo e reúne as espécies de *Leishmania* do complexo *Leishmania braziliensis*, dentre elas, a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) peruviana*. O subgênero *Leishmania* pode ser encontrado em todo o mundo distribuído em distintos complexos: 1 - Complexo *Leishmania mexicana* agrupa as espécies: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) pifanoi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; 2 - Complexo *Leishmania donovani* agrupa as espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*; 3- Complexo *Leishmania tropica* agrupa as espécies: *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica* e *Leishmania (Leishmania) major*.

A *Leishmania* apresenta apenas duas formas durante o seu ciclo vital: a forma amastigota e a promastigota. A forma amastigota é ovóide, sem flagelo aparente e é encontradas dentro de células do sistema monocítico fagocitário (os macrófagos dos hospedeiros vertebrados). A forma promastigota é altamente móvel, alongada e com flagelo aparente podendo ser classificada em sub-tipos: procíclico, nectomona, haptomona, paramastigota e metacíclico segundo a classificação de Lawer (1990). Estes sub-tipos multiplicam e se desenvolvem dentro do tubo digestivo do vetor. Contudo, em meio de cultura, somente é possível diferenciar os promastigotas em duas formas: procíclicos e metacíclicos.

Nas áreas endêmicas, as leishmanioses ocorrem em focos que possuem uma fonte natural de infecção (reservatórios animais) e flebotomíneos vetores vivendo sob as condições de proximidade espacial, o que possibilita que o parasito seja transferido continuamente entre eles (Rojas et al. 2004). O homem não possui um papel significativo como parte do sistema de reservatórios, mas meramente atua como hospedeiro acidental (Ashford 1996). Segundo Ashford (1996), os reservatórios de infecção são definidos como sendo um sistema ecológico no qual o agente infeccioso sobrevive persistentemente. Os reservatórios podem ser do tipo: a) primários - responsáveis pela manutenção da transmissão endêmica do parasito; b) secundários - importantes para a circulação e a reprodução do parasito, porém são incapazes de manter o ciclo enzoótico; e c) acidentais - não possuem um papel no ciclo de transmissão do parasito (Shaw 1988, Reithinger & Davies 1999).

Ocorreram aumentos significativos no número de casos em todo o mundo nas áreas endêmicas de leishmaniose. Este acréscimo está potencialmente relacionado aos fatores que afetam as interações naturais entre parasito-vetor-reservatório e está também associado às mudanças no meio ambiente ocasionadas pelo homem. Alguns fatores que acarretam este aumento são: 1) o desmatamento que resulta na diminuição dos ambientes silvestres, levando a invasão e proliferação de vetores no ambiente doméstico; 2) a adaptação do vetor ao ambiente doméstico e as mudanças climáticas drásticas que podem levar a um aumento e extensão dos focos da doença; 3) as migrações humanas urbano-rurais tais como os projetos agroindustriais que trazem pessoas não imunes para área endêmica; 5) doenças imunossupressoras como a AIDS; e finalmente, 6) redução das estratégias de controle específicas e de campanhas de intervenção para outras doenças infecciosas como a malária (Falqueto et al. 1991, Sherlock et al. 1996, Gratz et al. 1999, Reithinger & Davies 1999, Campbell-Lendrum et al. 2001, Dejeux 2001, Rispaill et al. 2002, Travi et al. 2002, WHO 2002).

1.3. Vetores da leishmaniose cutânea

Através de estudos epidemiológicos e experimentais, algumas espécies de flebotomíneos são incriminadas ou sugeridas como transmissoras da leishmaniose cutânea. Para que uma espécie de flebotomíneo seja incriminada como vetora, é necessário que ela apresente: a) alto grau de sinantropia; b) isolamento repetido da *Leishmania*; c) a mesma espécie de *Leishmania* seja encontrada em pacientes; d) comportamento alimentar nos mamíferos hospedeiros (reservatórios) de áreas endêmicas; e) capacidade de suportar o desenvolvimento da *Leishmania*; f) capacidade de transmiti-la pela picada a um novo hospedeiro vertebrado (Killick-Kendrick 1990).

1.3.1 Importantes vetores no Novo Mundo

No Novo Mundo, *L. intermedia* e *L. whitmani* são consideradas transmissoras da leishmaniose cutânea em várias regiões do Brasil, do Paraguai e da Argentina (Rangel et al. 1984, Hashiguchi et al. 1992, Salomón et al. 2001a, 2001b). São espécies altamente antropofílicas e abundantes, além de já terem sido encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania braziliensis* (Rangel et al. 1984, Killick-Kendrick 1990, Pereira & Hoch 1990, Hashiguchi et al. 1992, Miranda et al. 2002).

As duas espécies são espécies muito próximas e relacionadas (Mazzoni et al. 2002). Pertencem ao subgênero *Nyssomyia*, o qual é caracterizado por apresentar os seguintes caracteres taxonômicos: a soma do quinto e do quarto artigo dos palpos maior do que o terceiro artigo; cibário apresentando cinco a seis pares de dentes horizontais, estiletiformes discretos e bem separados; terminália do macho menor ou igual ao comprimento do tórax, em geral sem tufo de cerdas no gonocoxito; e espermatecas (órgão para estocagem de esperma) aneladas (Young & Duncan 1994, Marcondes 2001).

Barreto (1941), através da microscopia óptica, verificou que os ovos, as larvas e as pupas de *L. intermedia* e *L. whitmani* são morfologicamente similares, sendo impossível distinguir os seus estágios imaturos. Devido a esse fato e por serem encontradas co-existindo em algumas localidades, estas duas espécies podem ser confundidas e identificadas como sendo uma única espécie. Forattini (1973) estudou as formas adultas (machos e fêmeas) e estabeleceu diferenças que são utilizadas na taxonomia para diferenciar essas duas espécies simpátricas.

Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia (Lutz and Neiva 1912)

Possui uma ampla distribuição na América do Sul sendo encontrada desde o norte da Argentina, Paraguai e Brasil (Pará, Piauí, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins) (Rangel & Laisson 2003). Essa espécie habita florestas primitivas e de formação secundária encontrando-se adaptada à borda das matas e aos ambientes modificados (Rey 1991). Sua captura pode ocorrer tanto no peridomicílio quanto no domicílio (Miranda 1998, Souza et al. 2002).

De acordo com Forattini (1973) e Young & Duncan (1994) (Fig. 1A), a fêmea da espécie *L. intermedia* possui espermateca com corpo segmentado dotado de cabeça volumosa, com aproximadamente dez anéis sub-iguais formando um conjunto distinto em relação ao duto individual, com o qual se continua após uma brusca transição. Os dutos individuais são cerca de duas vezes mais longos do que o corpo e o duto comum é praticamente inexistente.

Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani (Antunes and Coutinho 1939)

Apresenta uma distribuição vasta pela América do Sul (Brasil, Peru, Paraguai e Guiana Francesa). No Brasil é encontrado (Acre, Rondônia, Pará, Maranhão, Ceará, Paraíba,

Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul Tocantins, Goiás, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul (Rangel & Laisson 2003), sendo abundante em áreas de transmissão da leishmaniose cutânea. Essa espécie possui hábito silvestre invadindo pouco o ambiente intradomiciliar (Neves et al. 1995, Souza et al. 2002). É comumente encontrada em locais onde as florestas primárias foram destruídas, o que os leva a invadir o peridomicílio (Miranda 1998). Além de ser uma espécie vetora da *L. braziliensis* no Brasil, no estado da Bahia é também considerada responsável pela transmissão da *L. amazonensis* (Barral et al. 1991, Neves et al. 1995), e tem sido finalmente considerada vetora da *L. guyanensis* no Pará e na Guiana Francesa.

Segundo Forattini (1973) e Young & Duncan (1994) (Fig. 1B), a fêmea de *L. whitmani* possui espermateca com corpo segmentado, cabeça volumosa e anéis desigualmente desenvolvidos que decrescem da região distal para o duto sem transição brusca. Os dutos individuais possuem três a quatro vezes o comprimento do corpo e o duto comum é praticamente inexistente.

1.3.2 Importantes vetores no Velho Mundo

No Velho Mundo, *Phlebotomus duboscqi* e *Phlebotomus papatasi* são espécies vetoras da *L. major* causadora da leishmaniose cutânea (Dedet et al. 1978, Beach et al. 1984, Killick-Kendrick 1985, Grebe-Michael et al 1993, Hanafi et al. 1998, Mukhopadhyay & Ghosh 1999) e pertencentes ao subgênero *Phlebotomus*. Este subgênero engloba apenas quatro espécies: *P. duboscqi*, *P. papatasi*, *Phlebotomus salehi* e *Phlebotomus bergeroti*, as quais são relacionadas morfologicamente (Rispaill & Léger 1998). As fêmeas de *P. papatasi* e *P. duboscqi* são semelhantes e morfologicamente indistinguíveis exceto por algumas pequenas diferenças estruturais. Madulo-Leblond et al. (1991) e Pesson et al. (1994) encontraram diferenças na armadura faríngea e na forma da espermateca, as quais foram confirmadas por análise isoenzimática e pela inexistência de entrecruzamentos.

Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi (Scopoli 1786).

Este vetor possui uma distribuição ampla no Velho Mundo estendendo-se desde o leste europeu até a Índia. É uma espécie estabelecida como agente transmissor da leishmaniose cutânea na antiga União soviética, Irã, Arábia Saudita, Egito e Tunísia (Killick-Kendrick 1985,

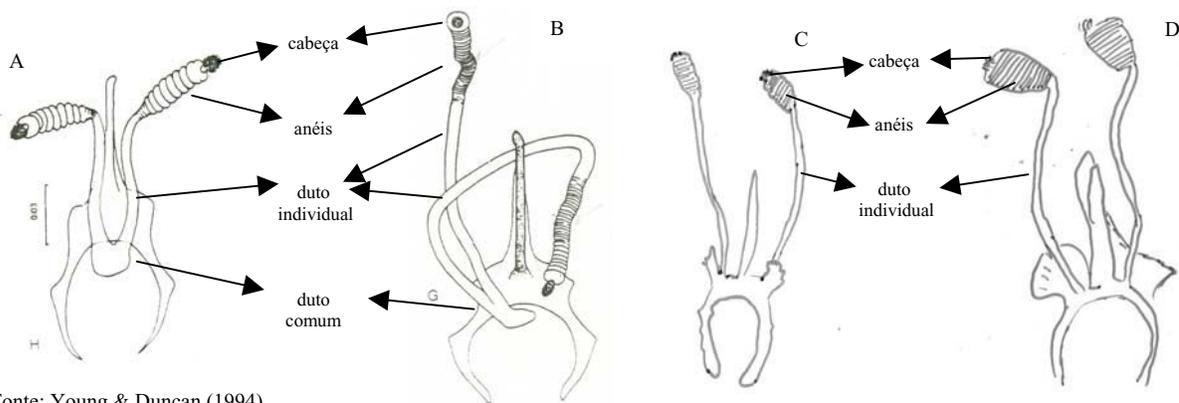
revisão Killick-Kendrick 1990, Hanafi et al. 1998). Essa espécie tem se difundido e se tornado abundante em áreas urbanas na Itália (Maroli & Bettini 1997).

De acordo com Madulo-Leblond (1991) e Pesson et al. (1994), a armadura do átrio genital dessa espécie é formada por uma faixa estreita, com largura constante, de espinhos agrupados principalmente de dois a quatro com, ocasionalmente, um único espinho. Os espinhos são pequenos e fortes e possuem depressões porosas em sua extremidade. A sua espermateca tem um corpo segmentado formado por oito a dez anéis de altura similar e cabeça cilíndrica (Fig. 1C).

Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi (Neveu-Lemaire 1906)

Encontra-se distribuído na África Central e Ocidental e no sul do Saara. É uma espécie estabelecida como sendo agente transmissor da leishmaniose cutânea em vários países, particularmente, na Tunísia e na Etiópia e ainda sendo suspeita de transmissão no Senegal e no Kênia (Dedet et al. 1978, Beach et al. 1984, revisão Killick-Kendrick 1990, Grebe-Michael et al. 1993).

De acordo com Madulo-Leblond (1991) e Pesson et al. (1994), a armadura do átrio genital dessa espécie é formada por uma faixa estreita de espinhos agrupados principalmente de três a cinco não arranjados em um simples padrão. A largura dessa faixa não é constante, sendo as extremidades mais largas do que o centro. Os espinhos são grandes, delgados e flexíveis e não possuem depressões porosas em sua extremidade. A espermateca tem um corpo segmentado formado por oito a dez anéis de altura similar e uma cabeça dilatada em forma de tulipa (Fig. 1D).



Fonte: Young & Duncan (1994)

Fig. 1: Espermatecas dos flebotomíneos *L. intermedia* (A), *L. whitmani* (B), *P. papatasi* (C) e *P. duboscqi* (D). Observe as cabeças das espermatecas, os seus anéis e os dutos individuais que se unem em um único duto, o duto comum.

1.4 Descrição dos estágios imaturos dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, isto é, são insetos que possuem metamorfose completa. O seu ciclo de vida é constituído por quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. A duração de cada estágio varia de acordo com a espécie e com as condições ambientais a que estão submetidos. A diapausa (parada do desenvolvimento), fenómeno que acontece quando as condições ambientais não são apropriadas, pode retardar o ciclo de vida desses insetos (Forattini 1973). As formas imaturas possuem hábito terrestre e encontram-se incluídas no grupo dos midobiontes, pois se desenvolvem em locais ricos em matéria orgânica em decomposição (Forattini 1973).

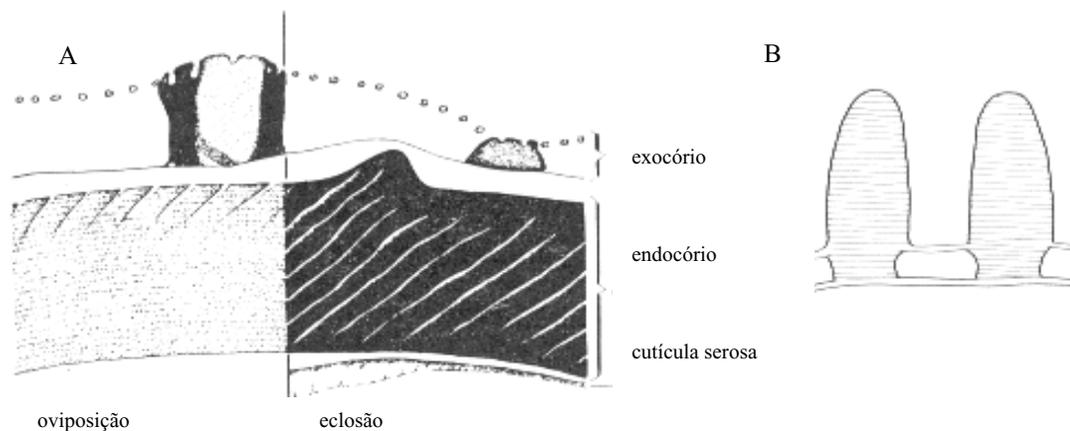
Três a oito dias após a alimentação sangüínea, as fêmeas depositam algumas dezenas de ovos em local terrestre úmido e protegido da luz. Num período de quatro a dez dias, os ovos eclodem e então, emergem as larvas de primeira fase. As larvas alimentam-se de matéria orgânica e tornam-se mais ativas a medida que se desenvolvem. Após as quatro fases que duram entre trinta e sessenta dias, as larvas L₄ eliminam o conteúdo gastrintestinal e se fixam a um substrato transformando-se em pupa. A forma adulta emerge entre sete a vinte dias através de uma fenda longitudinal mediana ao longo do dorso da pupa. Geralmente, o ciclo de vida dos flebotomíneos dura em média um a dois meses (Pessoa & Martins 1978, Miranda 1998, Marcondes 2001).

1.4.1 Os ovos

Durante a oviposição realizada pela fêmea dos flebotomíneos, os ovos depositados fixam-se a um substrato através da aderência de uma substância viscosa que os recobre e que foi secretada pela glândula acessória (Forattini 1973). A coloração dos ovos logo após a postura é esbranquiçada, tornando-se de amarronzada a preta cerca de vinte e quatro horas após a sua postura. Quando se aproxima o momento da eclosão, os ovos tornam-se mais claros e túrgidos e a ornamentação do exocório torna-se mais evidente (Barreto 1941). A saída da larva se dá através de uma fenda longitudinal no ovo que é produzida pelo órgão perfurador localizado na cabeça da larva de primeira fase, onde emerge primeiro a cabeça e depois o corpo (Secundino & Pimenta 1999).

O cório dos ovos dos flebotomíneos é constituído de duas camadas: uma camada interna ou envelope vitelínico que envolve o embrião, chamada de endocório; e uma externa, o exocório,

secretadas pelo epitélio folicular (Clements 1963). O exocório é ainda subdividido em: uma fina camada interna, uma intermediária porosa e uma camada externa, a qual, geralmente, apresenta ornamentações. Nos estágios finais da embriogênese, pode-se observar a presença de uma cutícula serosa abaixo do endocório, a qual é secretada pela serosa do embrião (Fig. 2) (Clements 1963). Essas camadas são consideradas fundamentais para o perfeito desenvolvimento do embrião, sendo fundamentais para a troca de gases envolvidos na respiração e proteção mecânica dos ovos. O padrão de ornamentação da última camada do exocório dos ovos de flebotomíneos vem sendo estudado e utilizado como parâmetro taxonômico para diferenciar gênero e espécie (Zimmerman et al. 1977, Endris et al. 1987, Rogo et al. 1992, Feliciangeli et al. 1993, Ghosh & Bhattacharya 1993, Enrique Perez & Ogusuku 1997, Fausto et al. 2001, Almeida et al. 2004).



Fonte: Clements 1963

Fig. 2: Secção das camadas do ovo. A. Camadas do ovo mostrando o exocório, endocório e a cutícula serosa; B. Ornamentações do exocório.

Em 1975, Ward & Ready agruparam os padrões de ornamentação dos ovos dos flebotomíneos em três grandes grupos: poligonal, estrias paralelas e montanhoso ou tipo vulcão. Endris et al. (1987) sugeriram que a divisão das estrias paralelas fosse subdividida em conectadas e não conectadas. Fausto et al. (1992) acrescentaram o padrão regular e Feliciangeli et al. (1993) o padrão elíptico. Enrique Perez & Ogusuku (1997) sugeriram mais dois padrões, o verruculoso e disperso. Almeida (2004) acrescentou os padrões de estrias paralelas não conectadas com tubérculos entre as estrias, estrias paralelas conectadas com poucas conexões, combinação de estrias paralelas conectadas com a reticular e combinação das estrias paralelas duplas conectadas

com a reticular. Atualmente existem doze categorias para a ornamentação do exocório dos ovos dos flebotomíneos.

1.4.2 As larvas

As larvas dos flebotomíneos são claras, vermiformes, com cápsula cefálica escura e esclerotizada. Desenvolvem-se em ambiente terrestre e necessitam de muita umidade, pouca luz e abundância de matéria orgânica para seu desenvolvimento, pois se alimentam vorazmente. Segundo Leite & William (1996, 1997). As larvas só param de comer antes das ecdises, retornando a se alimentarem mais ou menos duas horas após, tempo no qual ocorre o endurecimento do exoesqueleto e das suas peças bucais. Em cada muda, a larva procura um local sólido e se fixa ao substrato. A emergência da larva ocorre através de uma fenda longitudinal dorsal e mediana entre a cabeça e o tórax com o auxílio de movimentos peristálticos.

As quatro fases larvais são muito semelhantes, porém diferem significativamente em tamanho e pela presença de um par de filamentos caudais nas larvas de primeira fase e dois pares nas demais fases. A larva de primeira fase é a de menor tamanho e a de quarta fase, ou seja, última fase antes da pupação, a de maior tamanho. O corpo das larvas encontra-se coberto por cerdas, totalizando entre 160 a 210 cerdas em toda sua extensão (Barreto 1941). Ele é dividido em doze segmentos, sendo três segmentos torácicos: protórax (com aparência de dois), meso e metatórax; e nove segmentos abdominais (Fig. 3) (Leite & William 1997). Os dois últimos segmentos abdominais são bastante diferenciados dos demais. O oitavo (penúltimo segmento) é mais achatado e como o último não apresenta pseudoperna. O nono (último segmento) é o mais diferenciado de todos. É um órgão de locomoção acessório e é também responsável pela fixação das larvas antes das mudas e na fase prepupal. É formado por dois lobos: o lobo caudal dorsal e o anal ventral. O lobo caudal é subdividido em dois lóbulos caudais que sustentam as cerdas caudais. O lobo anal é protrátil e dependente da fase de movimentação da larva e de seu estado de evacuação (Barreto 1941).

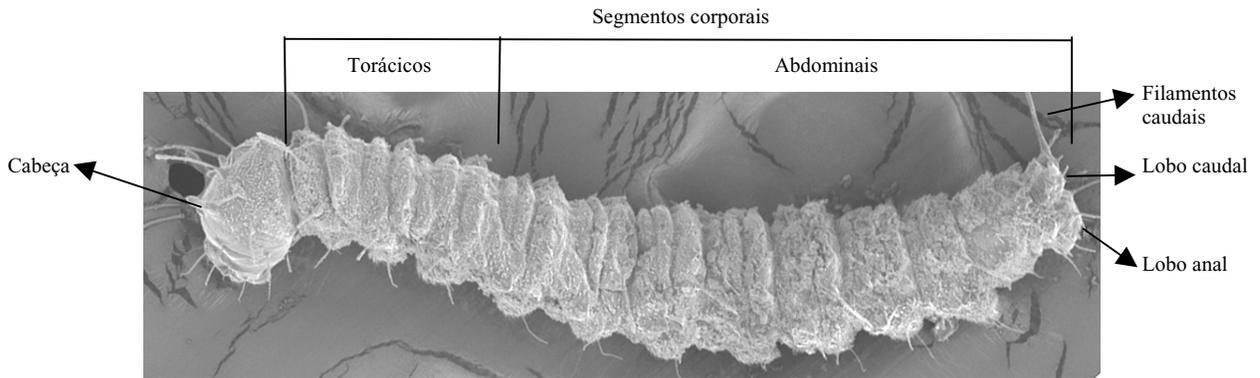


Fig. 3: Aspecto geral representativo para todas as fases larvares de flebotomíneos mostrando a cabeça e os segmentos corporais (torácicos e abdominais). No último segmento abdominal podem ser observados o lobo caudal e o anal.

1.4.3 As pupas

As pupas possuem uma coloração amarelada tornando-se um pouco mais escura à medida que se aproxima a eclosão. Esta é a fase mais resistente às variações de temperatura e é a fase imóvel do ciclo, pois as pupas não se alimentam e nem se locomovem, exceto com movimentos bruscos de flexão e extensão quando são estimuladas (Forattini 1973). Ficam fixas ao substrato em posição ereta pela parte posterior da exúvia da larva. A pupa dos flebotomíneos possui uma fina cobertura de espículas e o seu corpo é dividido em cefalotórax (cabeça, protórax, mesotórax e metatórax) e abdômen com nove segmentos (Fig. 4). Este estágio esboça várias estruturas do novo inseto, tais como as asas, as antenas, as patas e os olhos (Marcondes 2001).

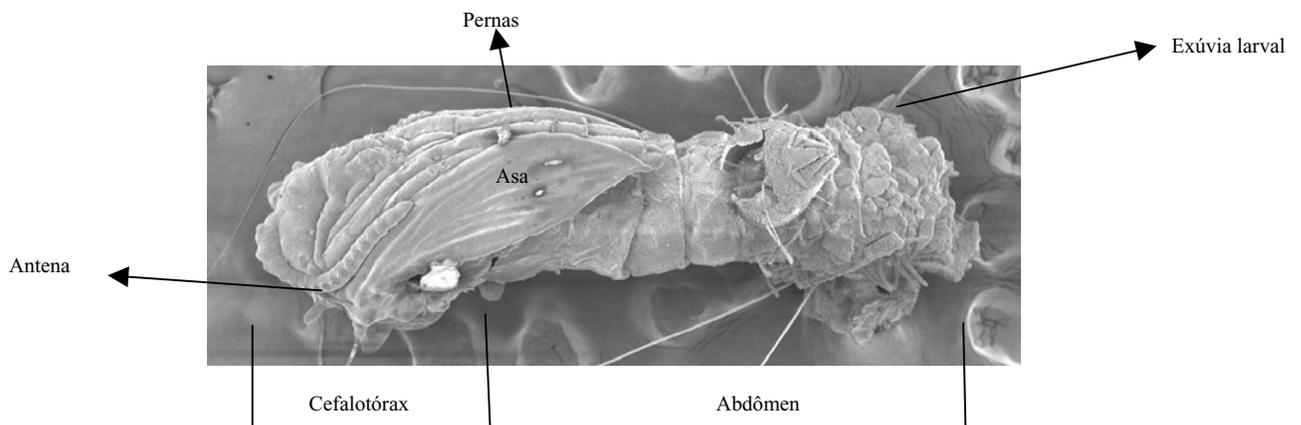


Fig. 4: Aspecto geral da pupa de flebotomíneo mostrando a divisão em cefalotórax e abdômen, a exúvia da larva de quarta fase e estruturas do futuro flebotomíneo como pernas, asas e antenas.

1.5 O avanço dos estudos das formas imaturas

Poucos flebotomíneos tiveram os seus estágios imaturos estudados no passado, devido à dificuldade de obtê-los no meio natural. Porém, a partir da década de 70, com o sucesso na criação e colonização desses insetos em laboratório, houve um aumento significativo nesses estudos.

Os estudos pioneiros das formas imaturas dos flebotomíneos foram realizados através da microscopia óptica que era a ferramenta comumente utilizada, como visto em Barreto (1941) e em Ward (1972). Ward & Ready (1975), utilizaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para descrever os detalhes da ornamentação dos ovos de 13 espécies de flebotomíneos brasileiros. Logo em seguida, trabalhos utilizando a mesma técnica tornaram-se mais freqüentes. Killick-Kendrick et al. (1989) descreveram os estágios imaturos do *Phlebotomus tobbi*. Leite et al. (1991) descreveram a pupa de *L. longipalpis* e Leite & William (1996 e 1997) descreveram a 1ª e a 4ª fase das larvas desta mesma espécie. Secundino & Pimenta (1999) revelaram detalhadamente os caracteres morfológicos de todos os estágios do desenvolvimento de *L. longipalpis*. Recentemente, Almeida et al. (2004) descreveram a ornamentação dos ovos de sete espécies de flebotomíneos encontradas na América do Sul.

1.6 Os órgãos sensoriais dos insetos

Os insetos são altamente móveis, abundantes e estão diversamente distribuídos, estando adaptados às mais variadas e surpreendentes condições de vida, podendo possuir diferentes habitats em seus estágios de desenvolvimento. Há insetos terrestres, subterrâneos, aquáticos; alguns que vivem e se reproduzem em galerias abertas, outros nas areias escaldantes dos desertos, em geleiras e em charcos. Diversas especializações, como por exemplo, os receptores sensoriais foram se desenvolvendo em insetos possibilitando-os explorar esta grande diversidade de habitats e estilos de vida. O sistema nervoso dos insetos é formado por três sistemas interconectados: um cérebro localizado na cabeça, um gânglio subesofágico ligado ao cérebro e um cordão nervoso ventral que se estende na direção posterior. O sistema nervoso atua em quatro eventos seqüenciais: a) recepção do estímulo pelos receptores sensoriais e a passagem para o sistema sensorial periférico; b) decodificação e integração da informação recebida pelo sistema nervoso; c) ativação de um sistema eferente apropriado; e d) resposta do indivíduo (McIver 1982).

Os receptores sensoriais permitem aos insetos monitorar adequadamente e especificamente os estímulos do ambiente externo e monitorar constantemente o seu estado interno coordenando assim as funções como um todo (Zacharuk 1985, Zayed et al. 2002).

A maioria dos órgãos sensitivos (sensilas) dos insetos encontra-se principalmente na parede do corpo sendo a maioria de tamanho microscópico. Possuem diferentes localizações, formas e funções determinadas de acordo com os hábitos de cada inseto e conseqüentemente pela exposição à diversidade de estímulos existentes. As sensilas são responsáveis pela recepção da energia do estímulo e pela transformação dessa informação em forma de impulsos nervosos. As sensilas são órgãos cuticulares pequenos formados por três elementos: uma estrutura cuticular; células sensoriais, isto é, um ou mais neurônios bipolares; e células acessórias (Chapman 1998) (Fig. 5). De acordo com esse mesmo autor, as células acessórias são formadas por três tipos de células: uma célula do tipo glial (célula tecógena) que forma um envelope em torno das células sensoriais e duas outras células, as tricógena e tormógena, que circundam esta última.

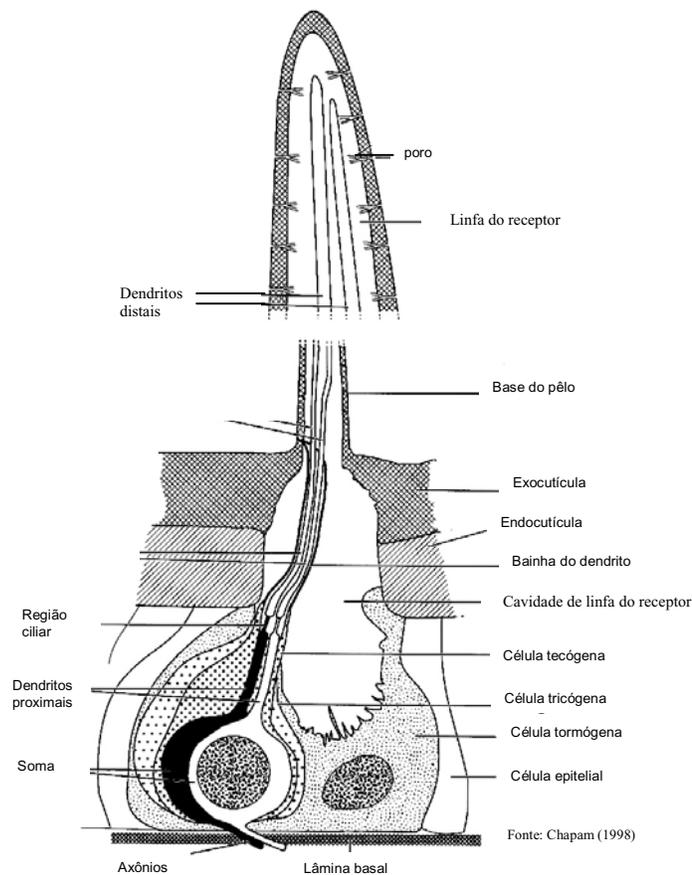


Fig 5: Desenho da estrutura de uma sensila.

A composição celular das sensilas é surpreendentemente uniforme em contraste com a sua funcionalidade fisiológica extremamente variável (Keil 1997a). Nos artrópodes, as sensilas são responsáveis pelo reconhecimento dos estímulos envolvidos na alimentação, agregação, cópula, foresia e parasitismo (Chapman 1998). Podem perceber diversos estímulos como odores, temperatura, umidade, estímulos mecânicos, dióxido de carbono, gravidade, radiação infravermelha e ondas sonoras (Hallberg & Hansson 1999). Diferentes sensilas, geralmente, respondem a diferentes estímulos do meio ambiente. Porém, uma mesma sensila pode ser capaz de responder a mais de um estímulo.

Nos insetos que apresentam morfologia completa (holometábolos), os estágios imaturos e os adultos têm estilos de vida e aspectos morfológicos completamente diferentes. Portanto, os seus órgãos sensoriais podem também ser completamente diferentes ou apresentarem poucas similaridades (Keil 1999). Por exemplo, em contraste com os adultos, nas larvas os olhos são freqüentemente reduzidos ou ausentes, as antenas são pequenas e constituídas por um simples segmento ou são ausentes.

Os estágios imaturos, devido a sua restrição de habitat, mobilidade, necessidade de desenvolvimento e crescimento rápido, utilizam a gustação como principal modalidade sensorial seguida pela olfação a curtas distâncias (Zacharuk & Schields 1991). Além destes sentidos, utilizam as sensilas mecanoreceptoras, as termoreceptoras e as higrorreceptoras para a detecção das condições ambientais, monitoramento visual para a orientação e proteção. Os insetos adultos utilizam as sensilas para o encontro de um parceiro potencial, sítios de oviposição adequados, de comida, para detecção de níveis de temperatura e umidade adequados, para orientação e proteção (Zacharuk & Schields 1991). Os odores emitidos por estas fontes são importantes pistas para a orientação desses insetos. Estes odores podem ser detectados tanto a longas distâncias (olfacção) quanto a curtas distâncias (gustação). De acordo com McIver (1982), 93% dos neurônios das antenas de *Aedes aegypti* e 85% das de *Anopheles stephensi* carregam informações de odores, identificando uma grande variedade de odores no ambiente. Contudo, a orientação desses insetos também pode envolver estímulos visuais e estímulos auditivos. Além desses sentidos, a percepção de mudanças na temperatura e umidade é muito importante para a fêmea no monitoramento do ambiente ao seu redor, para o encontro de sítios de oviposição adequados e para a procura do seu hospedeiro.

Dentre os sentidos dos insetos adultos destaca-se a olfação como o mais importante, sendo em alguns a principal modalidade sensorial. Nos adultos, a olfação ocorre tanto à curta como a longas distâncias, devido à grande capacidade de dispersão dos adultos (Zacharuk & Schields

1991). Alguns insetos podem distinguir entre diferentes odores, misturas complexas destes e odores intermitentes. A antena é o órgão sensorial mais importante do inseto possuindo sensilas olfatórias, gustativas, mecano-, higo- e termoreceptoras, além de algumas sensíveis ao dióxido de carbono (Zacharuk 1985).

1.6.1 A classificação das sensilas

As sensilas podem ser classificadas através dos estímulos detectáveis, sendo divididas em: a) termo-higroreceptoras: capazes de detectar calor e umidade; b) quimiorreceptoras: possuem poros capazes de detectar moléculas na fase líquida e gasosa, sendo subdivididas em gustativas e olfativas; c) mecanoreceptoras: recebem estímulos por contato físico, sons, ar em movimento; sendo subdivididas em: c1) exteroceptores: recebem estímulos do ambiente; c2) proprioceptores: recebem estímulos mecânicos de partes do seu próprio corpo.

Altner (1977) propôs um sistema de classificação através da presença e ausência de poros, sendo então divididas em três grupos: a) sem poros; b) sensilas com poros que podem ainda ser subdivididas em: b1) poro terminal; b2) com poros na parede, sendo com uma única parede ou dupla parede.

As sensilas podem ser classificadas através da sua distribuição, estrutura cuticular, comprimento, presença e número de poros e de sulcos na haste, localização dos poros e a natureza dos seus estímulos. Porém, a classificação das sensilas mais aceita e atual para insetos é fundamentada na morfologia cuticular e sustentada por estudos de ultra-estrutura e eletrofisiologia (Hallberg & Hansson 1999, Mitchell et al. 1999).

Entretanto, a nomenclatura tradicional citada por Zacharuk (1985) e Keil (1999) leva em consideração mais caracteres para definir os tipos mais comuns de sensilas (Fig. 6), tais como:

a) Sensila tricóide – é uma sensila com pêlo longo, setiforme, de largura e diâmetro variados, baixo número de células sensoriais (1 a 3), normalmente com dendritos não ramificados, cutícula comparativamente grossa. Pode apresentar uma grande densidade de poros, encaixe não flexível (quimiorreceptora) ou apresentar encaixe flexível (mecanoreceptora ou sensila gustativa).

b) Sensila basicônica – é basicamente um pêlo tricóide reduzido em comprimento que possui uma forma de estaca, cone ou papila; um número variável de células sensoriais (1 a 50), com dendritos

ramificados e uma cutícula delgada com alta densidade de poros. Possui as mesmas funções da sensila tricóide além de poder ser higrorreceptora.

c) Sensila placóide – é uma sensila com um número variável de células sensoriais (2 a 50), com dendritos ramificados; e está situada sob uma placa cuticular oval e fina com numerosos poros.

d) Sensila ampuliforme – é um gancho com parede fina que possui sulcos inervados por um ou mais neurônios sensíveis ao CO₂, situado na base de um longo canal; muito parecida com a sensila celocônica.

e) Sensila auricular – é uma sensila basicônica com parede fina porosa, a qual é inervada por três neurônios com dendritos ramificados.

f) Sensila celocônica – é uma sensila do tipo cone ou estaca com uma fendas com poros, geralmente situada em uma cova na cutícula. Possui um moderado número de células sensoriais (3 a 5) com dendritos não ramificados. É considerada como quimio-, termo- ou higrósensível.

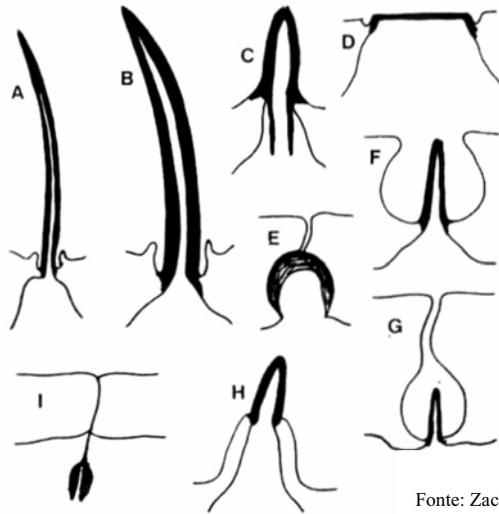
g) Sensila estilocônica – é uma sensila em formato de um gancho curto, inserida na ponta de uma projeção cônica ou cilíndrica de cutícula não sensível. Ela é inervada por três células com dendritos pequenos e não ramificados, dois dos quais respondem à umidade e um à temperatura.

h) Sensila caética – é uma sensila em forma de pêlo ou espinho longo geralmente preso em seu encaixe. Parece com a sensila tricóide, porém é mais forte, possui parede mais grossa e um poro apical, 4 a 5 células sensoriais, geralmente com função mecanosensora e gustativa.

i) Sensila escamiforme – é uma sensila em forma de pêlo tricóide semelhante a uma escama na sua forma externa, possui um ou mais neurônios. Ela é considerada como mecano- e quimiorreceptora.

j) Sensila campaniforme – é uma sensila do tipo papila ou cúpula inervadas. É situada na cutícula ou em profundidade em relação à superfície da cutícula, usualmente associada a lamelas; é mecanosensora;

l) Sensila escolopófora – é uma sensila tipicamente subcuticular que se mantêm ligada à cutícula através de uma cutícula vestigial ou através de uma célula acessória. Ela é inervada por um a três neurônios e é mecanoreceptora.



Fonte: Zacharuk (1985)

Fig. 6: Características cuticulares de vários tipos de sensilas. A. tricóide; B.caética; C. basicônica; D. placóide; E. campaniforme; F. celocônica; G. ampuliforme; H. estilocônica; I. escolopófora.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Analisar comparativamente os aspectos ultraestruturais da superfície externa dos estágios imaturos de *L. intermedia* e *L. whitmani* e estudar a microanatomia dos seus órgãos sensoriais inclusive nas formas adultas comparando-as com *P. papatasi* e *P. duboscqi*.

1.7.2 Objetivos específicos

A) Estudo da superfície das formas imaturas dos flebotomíneos

1) Identificar os aspectos microanatômicos distintos de cada estágio de desenvolvimento dos flebotomíneos *L. intermedia* e *L. whitmani*;

2) Analisar possíveis diferenças morfológicas entre os estágios imaturos das duas espécies simpátricas *L. intermedia* e *L. whitmani*;

B) Estudo das sensilas dos flebotomíneos

1) Identificar e caracterizar os tipos morfológicos e funcionais de sensilas nas larvas dos flebotomíneos *L. intermedia* e *L. whitmani* através de analogia com os tipos descritos anteriormente para insetos e outros artrópodes;

2) Estabelecer possíveis diferenças entre os tipos de sensilas encontrados nas larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani*;

3) Caracterizar a morfologia das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi*;

4) Identificar os tipos morfológicos e funcionais de sensilas presentes nas antenas dos adultos *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi*, através de analogia com os tipos descritos anteriormente para outros insetos e artrópodes;

5) Estabelecer possíveis diferenças nos tipos de sensilas das antenas entre as espécies *L. intermedia* e *L. whitmani*, as espécies *P. papatasi* e *P. duboscqi*, e os diferentes gêneros de flebotomíneos estudados, *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.

1.8 A relevância

A taxonomia de flebotomíneos foi declarada como base indispensável para todo o trabalho de competência vetorial e da biologia dos flebotomíneos pela WHO (1977). Incessante é a procura da comunidade científica por caracteres taxonômicos, por formas de identificação e classificação dos flebotomíneos, principalmente devido às espécies crípticas que são dificilmente distinguidas e separadas. O emprego de metodologias modernas, como por exemplo, a caracterização do DNA, as isoenzimas e os outros métodos bioquímicos e moleculares, adicionarão mais conhecimentos sobre a sistemática de flebotomíneos; porém, não substituirão inteiramente os conhecimentos clássicos de diagnose existentes, os quais estão baseados na morfologia e na biologia de cada táxon. A habilidade para identificar com precisão as espécies vetorais pode ajudar a estabelecer o papel de cada espécie na transmissão das leishmanioses.

Barreto et al. (1941) e Pessoa & Martins (1978) apontaram a escassez de trabalhos com flebotomíneos da região Neotropical e também de estudos de suas formas imaturas. A possibilidade de se criar esses insetos em laboratório incrementou o número de trabalhos desse gênero, proporcionando estudos mais detalhados de todo o ciclo de vida desses insetos. Atualmente, porém, os estudos com as formas imaturas ainda não acompanham os trabalhos com flebotomíneos adultos (Ward 1976a, 1976b, Pessoa et al. 2001). Grande parte dos trabalhos de morfologia e fisiologia são realizados com insetos adultos, pois estes são considerados como fornecedores de mais informações do meio ambiente do que os estágios imaturos, os quais estão restritos em habitat e mobilidade (Zacharuk & Schields 1991).

Os estudos dos estágios imaturos dos flebotomíneos podem ter uma ampla significância científica, pois podem fornecer espaço para a taxonomia das formas imaturas proporcionando uma identificação mais precisa das espécies; auxiliar no entendimento das diversas adaptações e do comportamento das diferentes espécies de flebotomíneos na natureza.

Comparado com o rápido aumento do conhecimento em bioquímica e fisiologia de alguns insetos, os estudos de morfologia têm ficado para trás (Shanbhag et al. 1999). Além disso, poucos estudos morfológicos das sensilas das antenas de Nematocera em geral e particularmente de flebotomíneos estão sendo desenvolvidos. Segundo Ilango (2000), as sensilas podem ser utilizadas como uma característica satisfatória para a identificação de sub-populações, como foi observado em seu trabalho com o *Phlebotomus argentipes*. Zayed et al. (2002) conseguiram separar com sucesso as espécies proximamente relacionadas *P. papatasi* e *P. bergeroti*, sugerindo

que as sensilas das antenas podem ser utilizadas como um método bem sucedido para a identificação de flebotomíneos.

Estudos morfológicos das sensilas dos insetos podem também auxiliar estudos de eletrofisiologia e de comportamento dos insetos na natureza (Sutcliffe 1994). Além disso, esses estudos podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle, especialmente através de armadilhas que utilizem feromônios. Para que estratégias de controle com os semioquímicos (moléculas capazes de modificar o comportamento de insetos) cheguem ao campo são necessários muitos estudos em laboratório, como por exemplo, os estudos de eletrofisiologia, os quais são importantes para definir a funcionalidade sensorial das sensilas. Porém, estudos de eletrofisiologia tornam-se difíceis em trabalhos com insetos diminutos, como é o caso dos flebotomíneos. Portanto, estudos ultra-estruturais e morfo-funcionais das sensilas que serão micromanipuladas tornaram-se indispensáveis. O MEV é um método muito adequado para os estudos ultra-estruturais e morfo-funcionais, pois é capaz de revelar detalhadamente a superfície em estudo com formação de imagens tridimensionais e com aumentos e profundidades de focos muito bem definidos.

Uma das relevâncias desse estudo é a possibilidade de se mapear e inferir uma funcionalidade baseada na estrutura cuticular para as sensilas presentes nas antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Captura dos flebotomíneos

Os flebotomíneos *L. intermedia* e *L. whitmani* foram capturados em Corte de Pedra (13° 32' latitude Sul e 39° 25' longitude Oeste), vilarejo pertencente ao município de Presidente Tancredo Neves, região Sudeste do Estado da Bahia e distante 280 quilômetros de Salvador (Fig. 7). A região é formada por pequenas montanhas com altitude variando entre 600 a 900 metros e clima quente e úmido (Fig. 8). Possui como atividade predominante a cultura de cacau, seguida da de cravo e da criação de bovinos. Nessa região, existe o maior número de casos notificados de leishmaniose tegumentar americana no estado da Bahia e alta incidência das duas espécies de flebotomíneos (Jones et al. 1987, Miranda 1998).

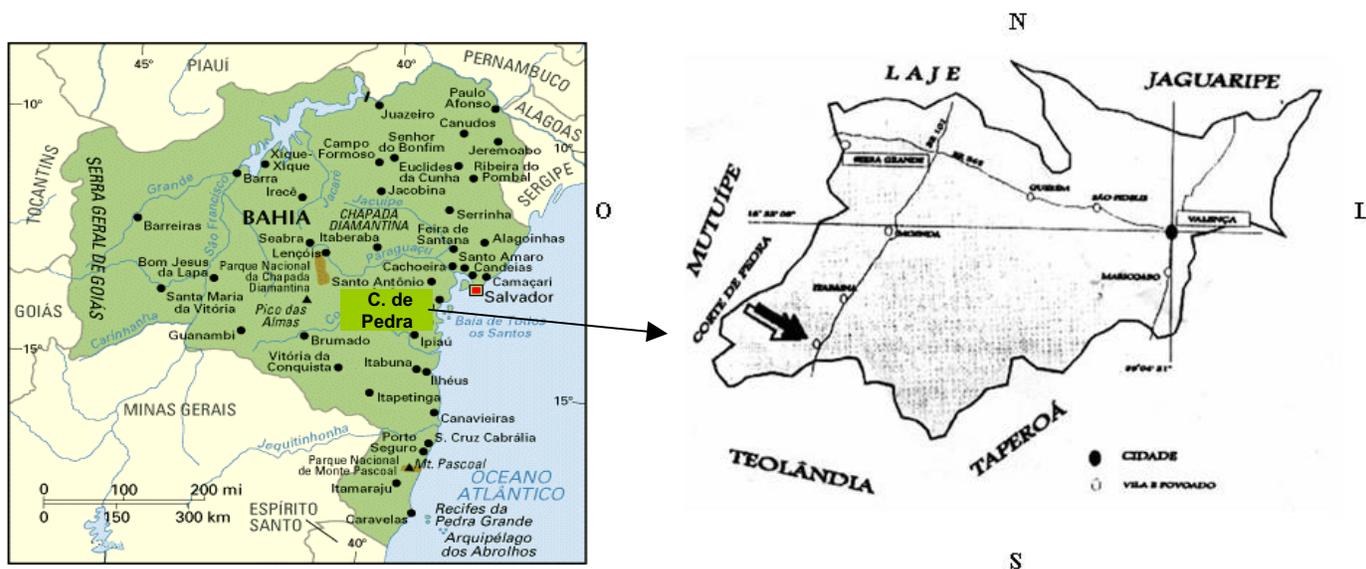


Fig. 7: Localização da área de estudo, Corte de Pedra- BA, município Presidente Tancredo Neves.



Fig. 8: Região de Corte de Pedra - BA mostrando uma área com alta densidade de flebotomíneos onde foram coletados espécimes de *L. intermedia* e *L. whitmani*. Setas mostrando domicílios.

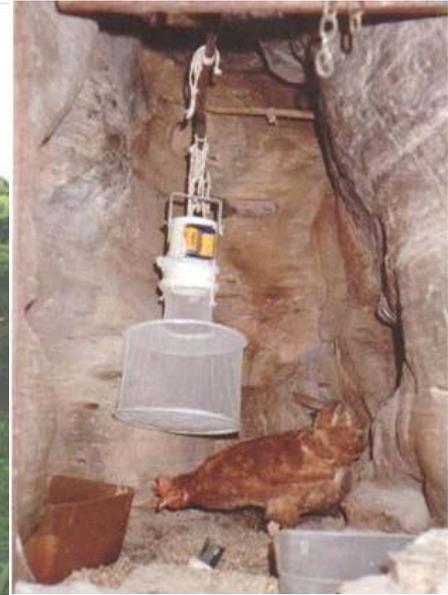


Fig. 9: Armadilha C.D.C. – “Center for Disease Control Light Trap”.

Para a captura foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo C.D.C.- “Centers for Diseases Control Light Trap” (Sudia & Chamberlain 1962) (Fig. 9). As armadilhas foram colocadas no peridomicílio (estábulos, galinheiros, pocilgas e chiqueiros) ao entardecer, devido ao hábito crepuscular dos flebotomíneos. Ao amanhecer, essas armadilhas foram retiradas. Após a captura, os flebotomíneos foram mantidos em gaiolas de criação confeccionadas com tecido do tipo voil. Sobre o tecido foram colocados pequenos chumaços de algodão contendo solução açucarada 50%. As gaiolas foram acondicionados em pequenas caixas de isopor contendo algodão molhado para manutenção da umidade ambiente e temperatura. Em seguida, foram transportadas até o Insetário do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ-BA, num veículo com ar condicionado devido à duração da viagem e às altas temperaturas da região.

Os flebotomíneos adultos *P. papatasi* (linhagem Turquia) e *P. duboscqi* (linhagem Senegal), provenientes de colônias estabelecidas e mantidas na “Faculty of Sciences” da “Charles University” em Praga, República Tcheca, foram gentilmente cedidas pelo professor Peter Volf.

2.2 Alimentação sangüínea

Antes da alimentação sangüínea, os chumaços de algodão contendo a solução açucarada foram retirados das gaiolas e um hamster (*Mesocricetus auratus*) anestesiado com Ketamin (0,1mL/ 100g) foi introduzido na gaiola. Para que todas as fêmeas se alimentassem, o animal foi

mantido no interior da gaiola durante o efeito do anestésico de aproximadamente uma hora. Após a retirada do hamster, foi colocado um novo chumaço de algodão embebido com solução açucarada para que as fêmeas e os machos se alimentassem. No dia seguinte, um novo hamster foi oferecido para aumentar as chances das fêmeas se alimentarem.

2.3 Individualização

As fêmeas ingurgitadas (três a quatro dias após alimentação sangüínea) foram transferidas individualmente para potes forrados com papel de filtro para realizarem a postura (Fig. 10). As fêmeas foram mantidas nestes potes até a oviposição e morte. Foram oferecidos diariamente com solução açucarada; e num papel de filtro foi gotejada água para manutenção da umidade necessária para potencializar a oviposição.

Após a morte, cada fêmea foi cuidadosamente dissecada em lupa (microscópio estereoscópico) com o auxílio de estiletos entomológicos. Parte das fêmeas (o último segmento) foi montada sobre lâmina e lamínula e realizada a identificação taxonômica da espermateca no microscópio óptico. A identificação das espécies *L. intermedia* e *L. whitmani* foi realizada com base nos critérios descritos por Young & Duncan (1994).

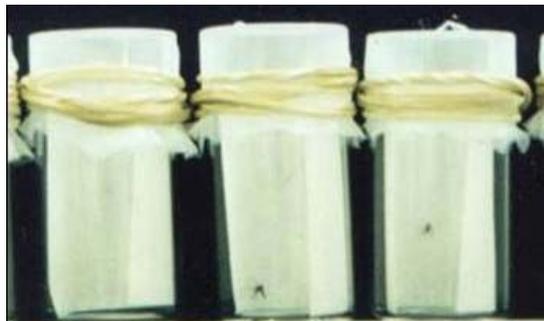


Fig. 10: Pote de individualização dos flebotomíneos.

2.4 Manutenção da colônia

Após a identificação das espécies (*L. intermedia* e *L. whitmani*), os ovos foram transferidos para potes de plástico transparente (6 cm de altura por 10 cm de diâmetro) devidamente etiquetados. A base destes potes era constituída de gesso para manutenção da umidade, necessária para a eclosão dos ovos, emergência e sobrevivência das larvas. O procedimento de transferência dos ovos foi executado com o auxílio de leves jatos de água

destilada em seringa de 3mL e agulha de 13x4mm para minimizar os danos aos ovos e a conseqüente interrupção do desenvolvimento embrionário. Após o nascimento, as larvas foram mantidas até a fase de pupa com ração constituída de terra vegetal, fezes de coelho e ração comercial para peixe, na proporção de 0,45: 0,45: 0,1, respectivamente. Após a emergência dos adultos, estes foram transportados para gaiolas de criação e receberam dieta açucarada e sanguínea.

Para o combate de organismos prejudiciais à criação alguns procedimentos foram realizados: a) lavagens dos ovos com álcool 70%, seguidas de três enxágües com água destilada; b) utilização de areia seguida de agitação para destruição de hifas de fungos (procedimento realizado diariamente); e c) retirada manual de ácaros com auxílio de estilete.

2.5 Coleta das amostras

2.5.1 Coleta das formas imaturas

Vinte exemplares de cada estágio de desenvolvimento de *L. intermedia* e *L. whitmani* foram coletados dos potes para o estudo das formas imaturas. Antes da fixação, as amostras foram lavadas em solução de detergente neutro e enxaguadas em PBS (tampão fosfato salina) pH 7.2 para diminuir possíveis contaminações (areia, fungos, restos de ração). As amostras foram transferidas para microtubos do tipo “Eppendorf” contendo 1mL de solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M), e permaneceram durante toda a noite a temperatura ambiente e na ausência de luminosidade.

Para a separação das larvas de segunda (L_2), terceira (L_3) e de quarta (L_4) fases foi realizada a contagem dos dias do ciclo de vida. Para tanto, a cada dois dias foi separado um pote no qual foram colocadas todas as larvas L_2 recentemente transformadas. Cinco a sete dias após, as larvas L_3 eram coletadas. Após este mesmo período, as larvas L_4 foram também coletadas. As demais larvas L_4 seguiram o ciclo de vida e transformaram-se adultos.

2.5.2 Coleta dos adultos

Dez exemplares de fêmeas adultas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi* foram utilizados para os estudos das sensilas. Os adultos foram imobilizados em freezer a -20°C , lavados em solução de detergente neutro, enxaguados com PBS pH 7.2, e dissecados em

lupa com o auxílio de estiletes entomológicos de forma que restasse apenas o tórax (sem patas e asas) e a cabeça dos insetos. As amostras foram transferidas para microtubos do tipo “Eppendorf” contendo 1mL da solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) durante toda a noite e foram processadas como descrito abaixo.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material previamente fixado foi lavado três vezes em PBS pH 7.2, pós-fixado com 1% tetróxido de ósmio (OsO_4) acrescido de 0.8% de ferricianato de potássio em tampão cacodilato 0.1M pH 7.2 durante 2h à temperatura ambiente e no abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e, então, desidratadas em gradiente crescente de etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% por 3 vezes) por dez minutos. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico e montadas em suportes apropriados com fita de carbono dupla face; e então metalizadas. As amostras para estudos das formas imaturas foram metalizadas com partículas de ouro. As amostras para estudos das sensilas com partículas de platina (Fernandes et al. 2002). A seguir, as amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio JSM 5600 JEOL.

2.7 Classificação das sensilas

Os tipos morfo-funcionais das sensilas foram classificados de acordo com a sua morfologia cuticular baseados em correlações com sensilas descritas na literatura (Altner 1977, Zacharuk 1985, Keil 1997b, 1999, Hallberg & Hansson 1999, Mitchell et al. 1999).

2.8 Contagem de sensilas das antenas

Após a identificação de cada morfotipo de sensila, todas as sensilas localizadas em cada segmento das antenas de 10 fêmeas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi* foram contadas. Para tanto, consideramos que foram contados $\frac{3}{4}$ das sensilas visualizadas nos dezesseis segmentos das antenas destes flebotomíneos, pois o $\frac{1}{4}$ restante estava aderido à fita adesiva de carbono necessária para a fixação do material nos suportes do microscópio eletrônico de varredura. Essa região não foi considerada na contagem das sensilas.

2.9 Medição das estruturas das formas larvares, dos segmentos antenais e das sensilas caéticas das formas adultas

Estruturas de 10 exemplares de cada estágio larvar; cada segmento antenal e as sensilas caéticas das antenas de 10 exemplares fêmeas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi* foram medidos utilizando o programa analítico do MEV. O tamanho total das antenas foi obtido através da soma dos segmentos antenais.

2.10 Análise estatística

Para comparar a dimensão dos segmentos antenais e da sensila caética; e o número de sensilas presentes nas antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi* foi utilizado o teste ANOVA com comparações múltiplas de Tukey. Quando o modelo paramétrico (ANOVA) não foi adequado utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn. Todos os testes foram realizados com nível de confiança de 95% ($\alpha= 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Aspectos microanatômicos das formas imaturas de *L. intermedia* e *L. whitmani*

Através da microscopia eletrônica de varredura, pela primeira vez, foram observados aspectos gerais e detalhados dos estágios imaturos, ovos e larvas, de *L. intermedia* e *L. whitmani*, permitindo, desta forma, comparar aspectos morfológicos desses dois importantes vetores de leishmaniose cutânea.

3.1.1 O ovo

Os ovos dos flebotomíneos estudados apresentaram formato elíptico e alongado (*L. intermedia* - comprimento de $0,308 \pm 0,016$ mm e largura $0,074 \pm 0,003$ mm e *L. whitmani* - comprimento de $0,307 \pm 0,010$ mm e largura $0,077 \pm 0,002$ mm). Nas duas espécies estudadas observamos no exocório cristas arranjadas longitudinalmente, as quais na sua maioria não são conectadas (Figs. 11 e 12). Detalhes em grande aumento permitiram observar que estas cristas são formadas por fileiras de estruturas palisádicas individualizadas (diâmetro de $0,576 \pm 0,074$ µm em *L. intermedia* e $0,775 \pm 0,095$ µm em *L. whitmani*) se projetando da superfície do ovo (altura de $0,454 \pm 0,040$ µm em *L. intermedia* e $0,597 \pm 0,043$ µm em *L. whitmani*) (Figs. 13 e 14). Pequenos tubérculos foram também observados em toda a superfície dos ovos (Figs. 13 e 14).

3.1.2 A eclosão da larva

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar o momento de eclosão das larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani*. A eclosão das larvas provocou uma fratura oblíqua irregular na parede do ovo. (Figs. 15-17 e 20). O primeiro sinal observado foi o aparecimento da cabeça da larva em uma pequena abertura lateral no pólo anterior do ovo (Figs. 15 e 16). Seguindo este evento inicial, a cabeça inteira foi exposta para fora do ovo sendo possível observar o órgão perfurador (Figs. 16-18). Neste mesmo momento, o longo filamento caudal também foi visualizado no lado de fora (Figs. 17-19). A seguir, o corpo da larva saiu do ovo (Figs. 19 e 20). Todos esses eventos seqüenciais permitiram o total escape da larva.

3.1.3 A larva

3.1.3.1 Aspectos gerais

As larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani* apresentaram aspectos gerais similares, porém diferenciando-se em algumas estruturas morfológicas.

O tamanho entre cada estágio larvar diferiu. A larva de primeira fase, foi a de menor tamanho (*L. intermedia* - comprimento de $0,467\pm 0,09$ mm e largura de $0,085\pm 0,002$ mm e *L. whitmani* - comprimento de $0,491\pm 0,089$ mm e largura de $0,078\pm 0,021$ mm). A larva de quarta fase é a última fase larvar anterior a pupação (*L. intermedia* - comprimento de $2,116\pm 0,392$ mm e largura de $0,262\pm 0,052$ mm e *L. whitmani* - comprimento de $2,032\pm 0,420$ mm e largura de $0,349\pm 0,093$ mm).

O tegumento das larvas de ambas as espécies apresentam-se coberto por minúsculos espinhos dispostos irregularmente (Figs. 21-24), exceto na região basal da cabeça e nas extremidades (aparelho bucal e lóbulo anal) (Figs. 25-29).

3.1.3.2 O corpo

O corpo das larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani* foi observado como sendo longo e dividido em doze segmentos (três torácicos e nove abdominais) (Figs. 21-24). Na parte ventral das larvas foram encontradas estruturas elípticas e bulbosas projetando-se da superfície de cada segmento, as pseudopernas (Figs. 21-24). As pseudopernas diferenciaram os segmentos torácicos dos abdominais, pois se encontraram somente presentes nos segmentos abdominais, exceto no penúltimo e último, no qual se localiza o lóbulo anal (Figs. 23 e 24). As pseudopernas das duas espécies de *Lutzomyia* mostraram pequenas diferenças no tamanho (*L. intermedia* - comprimento de $0,068\pm 0,001$ mm e largura de $0,030\pm 0,004$ mm e *L. whitmani* - comprimento de $0,108\pm 0,005$ mm e largura de $0,057\pm 0,006$ mm). Em adição, a morfologia do lóbulo anal foi completamente diferente nas duas espécies. (Figs. 25 e 26). O lóbulo anal de *L. whitmani* mostrou-se mais enrugado e menor do que o de *L. intermedia* (*L. intermedia* - comprimento de $0,114\pm 0,002$ mm e largura de $0,123\pm 0,003$ mm e *L. whitmani* - comprimento de $0,067\pm 0,006$ mm e largura de $0,076\pm 0,006$ mm).

3.1.3.3 A cabeça

As larvas de *L. intermedia* e de *L. whitmani* apresentaram cabeça globular, esclerotizada e bem individualizada (Figs. 27-29). Na parte ventral da cabeça foi visualizado o aparelho bucal que é do tipo mastigador. Este aparelho apresentou peças bucais proeminentes situadas em uma região circular, a qual sobressaiu da superfície do tegumento. No centro superior desta região localizou-se o clipeo e abaixo dele o labro ladeado por um par de mandíbulas. Abaixo das mandíbulas encontraram-se as maxilas e, abaixo destas estruturas, na região central, localizou-se o mentum (Figs. 27 e 29). Porém, foram facilmente notadas diferenças morfológicas nas peças bucais entre as duas espécies, pois o *L. whitmani* apresentou este órgão melhor definido e robusto (Figs. 27 e 28). Uma pequena diferença também foi encontrada no tamanho do aparelho bucal entre as espécies (*L. intermedia* - comprimento de $0,147 \pm 0,025$ mm e largura de $0,135 \pm 0,025$ mm e *L. whitmani* - comprimento de $0,092 \pm 0,032$ mm e largura de $0,091 \pm 0,027$ mm).

No topo da cabeça pôde ser observado o órgão perfurador (Figs. 16, 18, 19 e 29), estrutura somente encontrada na L₁ que a auxilia a sair do ovo. Esse órgão possui um aspecto de pirâmide com cristas sobressaindo de uma base arredondada que se unem no ápice. O órgão perfurador encontrado nas duas espécies de flebotomíneos estudadas apresentou morfologia similar com pequenas diferenças nas suas dimensões (*L. intermedia* - comprimento de $0,027 \pm 0,003$ mm e largura de $0,018 \pm 0,001$ mm e o *L. whitmani* - comprimento de $0,023 \pm 0,002$ mm e largura de $0,019 \pm 0,001$ mm).

Na região apical da cabeça das larvas foi observado um par de antenas. A estrutura das antenas foi igual nas duas espécies estudadas. Porém, foi observada uma modificação na estrutura das antenas entre a fase L₁ e a L₂. A antena das larvas L₁ apresentou-se com formato de estruturas globulares com um segmento cilíndrico fusionado com um segundo segmento ovóide distal (Figs 30 e 31). As antenas das larvas L₂, L₃ e L₄ apresentaram-se como estruturas digitiformes ligadas a um cone truncado (Figs. 32 e 33).

Em ambas as espécies, detalhes das antenas de todas as fases larvais revelaram que estas possuem sensilas inseridas na região ventral e no ápice, independentemente da mudança da sua morfologia que acontece durante a maturação para as larvas L₂ (Figs. 30-33).

3.2 Órgãos sensoriais das larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani*

Seis diferentes tipos de sensilas tricóides foram visualizados em todas as fases larvais de *L. intermedia* e *L. whitmani*: tricóide do tipo escova, tricóide do tipo fracamente escova, tricóide longa e curva, tricóide pequena, tricóide longa e tricóide multiporo longa.

As sensilas tricóides do tipo escova são assim denominadas por possuírem ramificações que crescem em tamanho da base para o ápice (Figs. 34 e 35) e as tricóides do tipo fracamente escova por possuírem poucas destas ramificações (Fig. 36). As demais sensilas tricóides encontradas apresentaram um aspecto liso (Figs. 37 e 38).

As sensilas tricóides do tipo escova localizaram-se em linha no topo da cabeça atrás das antenas, nas regiões dorsal e lateral do corpo da larva, estando ausentes na região ventral (Figs. 21-24 e 29). As sensilas tricóides do tipo fracamente escova encontraram-se no meio da cabeça em frente às antenas (Fig. 29). As sensilas tricóides pequenas e tricóides longas foram encontradas no aparelho bucal e dispostas em linha em frente às do tipo fracamente escova, além de serem encontradas em círculo, formando uma coroa ao redor do lóbulo anal de *L. intermedia* e de *L. whitmani* (Figs. 25-29). As tricóides longas e curvas foram encontradas dispostas em cada extremidade da pseudoperna em ambas as espécies formando um par em cada estrutura locomotora (Figs. 23 e 24). Foram observados diferentes graus de curvatura deste tipo de sensila (Figs. 37 e 38). A sensila tricóide multiporo longa é conhecida nos flebotomíneos como filamento caudal. Foram encontrados poros nos filamentos caudais de todas as fases larvais de *L. intermedia* e *L. whitmani*. Utilizando um pequeno aumento não foi possível observar diferenças no padrão dos poros entre as duas espécies (Fig. 42). Porém, num grande aumento foi possível revelar padrões distintos da organização dos poros cuticulares. O *L. intermedia* possui os poros dispostos em sulcos e o *L. whitmani* arranjos na superfície da sensila (Figs. 43 e 44).

Foi possível observar as sensilas tricóides recobrimo abundantemente todo o corpo das larvas (Figs. 34-39). Porém, foram também observados três diferentes tipos de sensilas inseridas nas antenas das larvas L₁: a) uma sensila reduzida em forma de estaca com dilatação bulbosa, denominada de basicônica clavada, no ápice da antena; b) três pequenas sensilas do tipo cone protegidas pela estrutura antenal, denominadas de celocônica romba na região proximal da antena; c) uma sensila do tipo cone com dilatação bulbosa protegida pela estrutura antenal, a

celocônica clavada multiporo (Fig. 40). Foram observados poros na superfície da região em forma de bulbo desta sensila (Fig. 41).

3.3 Aspectos anatômicos e sensilas das antenas das fêmeas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*

3.3.1 Aspectos gerais das antenas

As fêmeas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi* apresentaram um par de antenas filiformes formadas por dezesseis segmentos: um escapo triangular (primeiro ou segmento basal) (Figs. 45 e 46), pedicelo globular (segundo segmento) (Figs. 45 e 47) e quatorze flagelômeros filiformes (Fig. 45). Estas estruturas apresentaram aspectos gerais similares em todas as espécies estudadas com exceção de *P. duboscqi* como descreveremos abaixo.

Os flagelômeros I-XI apresentaram um aspecto filiforme, sendo o flagelômero I o mais filiforme (Fig. 53). Os flagelômeros II-XI apresentaram-se morfologicamente semelhantes (Figs. 66, 68, 69, 71 e 72). Em *P. duboscqi* foi encontrado uma subdivisão na base dos flagelômeros VI ao XI que o diferenciou das outras espécies (Fig. 67). As demais espécies apresentaram algumas subdivisões em sua base, porém de maneira aleatória. Os flagelômeros XII, XIII e XIV apresentaram-se globulares e enrugados, sendo esta característica, em geral, mais acentuada a partir do flagelômero XII (Figs. 73-75 e 79 e 80).

Todos os dezesseis segmentos das antenas encontraram-se cobertos por pequenos espinhos não inervados denominados na literatura como microtríquias (Shanbhag et al. 1999, Fernandes et al. 2002, 2004). Estas estruturas foram a maior parte das pilosidades encontradas nas antenas (Figs. 48-52, 64 e 65).

3.3.2 Dimensão dos segmentos antenais:

As antenas das espécies estudadas apresentaram um comprimento médio de: a) *L. intermedia* $1,354 \pm 0,037$ mm; b) *L. whitmani* $1,271 \pm 0,036$ mm; c) *P. duboscqi* $1,349 \pm 0,034$ mm; e d) *P. papatasi* $1,260 \pm 0,037$ mm.

Em todas as espécies estudadas, o primeiro flagelômero foi o de maior dimensão (Graf. 1). Foi também observado um comprimento significativamente maior nos flagelômeros IX-XI das antenas das espécies do gênero *Lutzomyia*, e no flagelômero XIV do gênero *Phlebotomus* (Graf. 1).

3.3.3 Tipos de sensilas

Foram encontrados seis tipos e nove subtipos de sensilas nas antenas dos flebotomíneos estudados: a) celocônica (sulcadas I, II e “mãos em prece”); b) tricóide (de ponta fina, de ponta romba e pequena); c) caética; d) escamiforme; e) campaniforme, f) basicônica. Sensilas basicônicas somente foram encontradas nas espécies do gênero *Phlebotomus*.

Segue abaixo a descrição detalhada da estrutura cuticular de cada um dos tipos e subtipos de sensilas encontradas.

a) Sensilas celocônicas sulcadas

Sensilas em forma de estaca com sulcos em sua superfície e com estrutura protetora de cobertura. Foram observados três subtipos desta sensila, as sulcadas I, II e “mãos em prece”. A sensila celocônica sulcada I possui uma estrutura protetora de microtríquias que se unem apenas na região basal (Figs. 76-78); a sensila celocônica sulcada II possui microtríquias com base fusionada e ápice solto formando pontas (Fig. 61); a sensila celocônica sulcada “mãos em prece” possui uma estrutura cuticular de cobertura semelhante a duas mãos unidas em posição de reza (Figs. 62 e “inset”).

b) Sensilas tricóides

- Sensilas tricóides de ponta romba

Pêlos setiformes cilíndricos e longos de tamanhos variados, com arestas do tipo escova, ponta romba e com encaixe flexível (Figs. 55, 65, 66 e 68).

- Sensilas tricóides de ponta fina

Pêlos setiformes longos com encaixe parcialmente fixo, ponta fina (Figs. 79-82).

- Sensilas tricóides pequenas

As sensilas tricóides pequenas foram formadas por pêlos setiformes curtos com encaixe flexível. Foram encontrados dois subtipos de sensilas tricóides pequenas: a) as sensilas tricóides pequenas com ponta afiada (Figs. 48-50 e 56); b) as sensilas tricóides pequenas com ponta romba, as quais quando comparados são menores do que as de ponta afiada (Figs. 57-59 e 70 e “inset”).

c) Sensilas caéticas

Pêlos longos e robustos presos em seus encaixes apresentando poros em suas superfícies (Figs. 63-65). Foi observado um padrão diferente na disposição dos poros entre os gêneros estudados. No gênero *Phlebotomus* os poros encontraram-se dispostos em sulcos paralelos e em *Lutzomyia* dispostos na superfície (Figs. 64 e 65). Foi observada em um único espécime de *L. intermedia* uma sensila caética com base bifurcada (Fig. 60).

d) Sensilas escamiformes

Pêlos tricóides com formato lanceolado e com ramificações ou arestas do tipo escova em sua superfície semelhante a escama (Figs. 51 e 54).

e) Sensilas campaniformes

Sensilas em forma de papilas ou cúpula com pouca projeção da superfície do tegumento (Figs. 51 e 52).

f) Sensilas basicônicas

Pêlos tricóides diminutos sem encaixe similares a uma estaca (Figs. 58 e 59).

3.3.4 Distribuição das sensilas nos segmentos antenais

Os flagelômeros apresentaram uma maior variedade de tipos e subtipos de sensilas quando comparados ao escapo e pedicelo (Tab. 1).

A localização das sensilas em cada um dos segmentos das antenas das quatro espécies de flebotomíneos estudadas encontra-se detalhada conforme descrito abaixo e na tabela 1:

3. 3.4.1 Escapo

No escapo de todas as espécies foram encontradas as seguintes sensilas: tricóides de ponta romba distribuídas no meio do segmento e pequenas de ponta afiada na região basal (Fig. 46). Foram observadas três a quatro sensilas tricóides pequenas de ponta afiada em todas as espécies, exceto em *P. papatasi*, no qual foram observadas apenas três destas sensilas (Figs. 48 e 49).

3. 3.4.2 Pedicelo

No pedicelo de todas as espécies foram observadas as seguintes sensilas: escamiformes e tricóides de ponta romba dispostas em linha no meio do segmento; duas a três tricóides pequenas de ponta afiada encontradas na região basal (Figs. 47, 49 e 50) e duas campaniformes na região apical (Figs. 51 e 52).

3.3.4.3 Flagelo

- Flagelômero I

No flagelômero I foram observados o maior número e tipos diferentes de sensilas (Fig. 53 e Tab. 1). Neste segmento foram observadas as sensilas: caética, celocônica, escamiforme, tricóide de ponta romba, tricóide pequena (de ponta romba e de ponta afiada) e basicônica.

Na região basal do flagelômero I foram encontradas sensilas escamiformes (Fig. 54) e as tricóides pequenas de ponta romba em todas as espécies. As sensilas tricóides pequenas de ponta romba foram encontradas em grupos de quatro no gênero *Lutzomyia* (Fig. 57) e de duas no *Phlebotomus* sempre localizadas próximas as sensilas basicônicas (Figs. 58 e 59). As sensilas basicônicas em *P. duboscqi* foram encontradas em número de seis dentro de uma cova sensorial rasa (Fig. 58) diferenciando-a de *P. papatasi* com cinco unidades em cova sensorial profunda (Fig. 59). A sensila tricóide pequena de ponta afiada somente foi observada em *L. whitmani* e em *L. intermedia* (Fig. 56).

Na região mediana foram encontradas inúmeras sensilas escamiformes (Figs. 53 e 54) e tricóides de ponta romba (Figs. 53 e 55) em todas as espécies.

Na região apical foram encontradas várias sensilas tricóides de ponta romba e duas caéticas em todas as espécies (Figs. 53 e 55). Uma sensila celocônica foi observada no ápice deste apenas em duas espécies (Fig. 55). Em *L. intermedia* a sensila celocônica foi do tipo sulcada II (Figs. 60 e 61) e em *P. papatasi* sulcada “mãos em prece” (Figs. 62 e “inset”).

- Flagelômeros II

Foram observadas cerca de vinte unidades das sensilas tricóides de ponta romba e duas sensilas caéticas ao longo e uma celocônica no ápice (Fig. 66). As sensilas celocônicas foram de dois tipos: as sensilas celocônicas sulcada “mãos em prece” em *P. duboscqi*, *P. papatasi* e *L. whitmani* (ausente em *L. intermedia*) (Figs. 62 e “inset”) e a sensila celocônica sulcada II encontrada apenas em *L. intermedia* (Fig. 61). Porém, excepcionalmente, em 2 exemplares de *L. whitmani* a sensila celocônica sulcada “mãos em prece” foi substituída por uma sensila celocônica sulcada II (Fig. 61).

- Flagelômeros III

As sensilas encontradas foram similares às do flagelômero II, porém não foram encontradas as sensilas celocônicas sulcadas II.

- Flagelômeros IV-VIII

Nestes flagelômeros foram encontradas cerca de vinte unidades das sensilas tricóides de ponta romba e duas caéticas ao longo dos segmentos (Fig. 68).

- Flagelômero IX

As sensilas encontradas neste flagelômero foram similares às dos descritos acima (flagelômeros IV-VIII), porém com uma sensila tricóide pequena de ponta romba localizada na região apical (Figs. 69 e 70 e “inset”).

- Flagelômero X

As sensilas deste flagelômero foram similares às descritas nos flagelômeros IV-VIII, porém a espécie *P. duboscqi* apresentou entre uma e duas sensilas tricóides de ponta fina localizadas na região apical (Figs. 71 e 72).

- Flagelômero XI

As sensilas deste flagelômero foram similares às do flagelômero IX. Porém, não foi encontrada a sensila tricóide pequena de ponta romba na região apical em *P. papatasi*; e ocorreu a presença de uma a duas sensilas tricóides de ponta fina na região apical no gênero *Phlebotomus* (Figs. 71-72).

- Flagelômeros XII e XIII

As sensilas tricóides de ponta romba, tricóides de ponta fina e celocônicas sulcada I foram encontradas em todas as espécies (Figs. 73-76). Duas sensilas caéticas foram observadas somente no gênero *Phlebotomus* (Fig. 75). Em contraste, uma ou duas sensilas caéticas bem pequenas foram observadas em *L. whitmani* e ausentes em *L. intermedia* (Figs. 73 e 74 e Graf. 2). As sensilas tricóides pequenas de ponta romba foram encontradas somente no ápice do flagelômero XIII de todas as espécies (Fig. 70 e “inset”).

- Flagelômero XIV

Foram observadas neste flagelômero as seguintes sensilas: tricóide de ponta romba principalmente na região basal; tricóides de ponta fina por quase todo o segmento, exceto na região basal; duas sensilas tricóides pequenas de ponta romba no ápice e celocônicas sulcadas I dispostas por todo segmento (Figs. 79-80). Esse segmento apresentou um prolongamento na sua região distal terminando com uma sensila tricóide em todas as espécies estudadas (Fig. 81). Curiosamente, uma sensila tricóide maior do que a normalmente encontrada foi observada apenas em *P. papatasi* (Fig. 82).

3.3.5 Dimensão da sensila caética

Durante a análise da presença das sensilas caéticas nas espécies estudadas, notamos diferenças nas suas dimensões. Este fato nos levou a uma análise comparativa detalhada das suas dimensões e distribuições ao longo dos flagelômeros.

Encontramos variações nas dimensões das sensilas caéticas em todos os flagelômeros em que esta sensila se encontrava presente (Graf. 2). O *L. whitmani* foi o que mostrou a maior

variação desta sensila (16,3-64,6 μ m). A espécie que apresentou o tamanho mais estável foi o *L. intermedia* (58,6-68,6 μ m) seguida de *P. papatasi* (25,0-47,5 μ m) e de *P. duboscqi* (41,0-79,8 μ m).

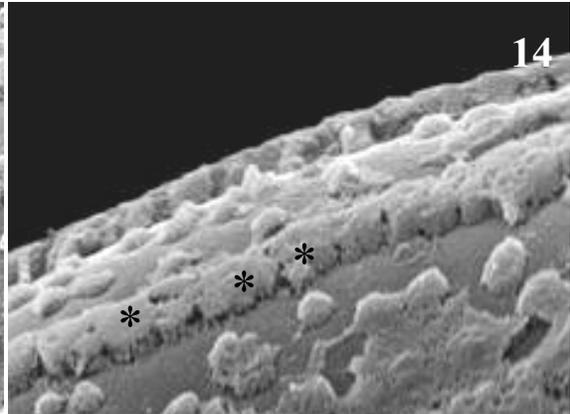
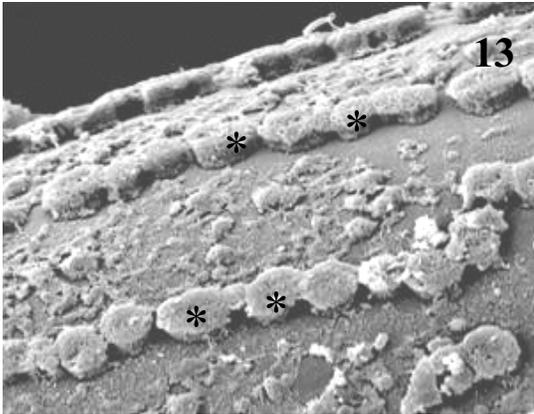
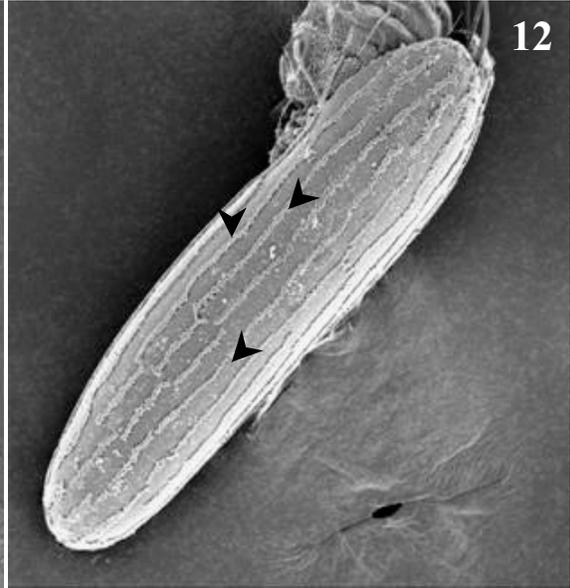
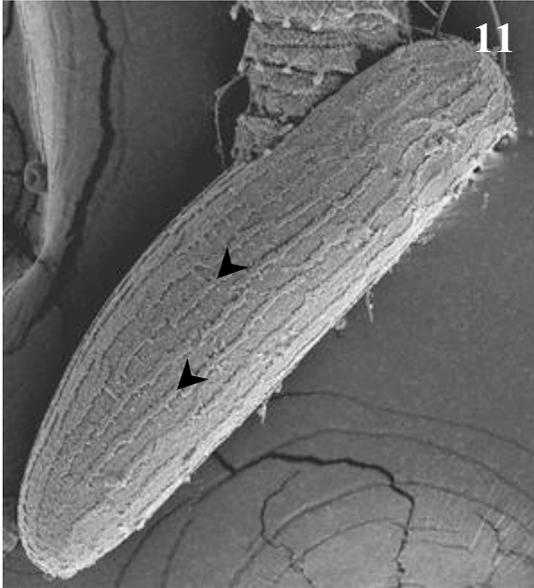
Não encontramos diferenças nas dimensões da sensila caética entre *L. intermedia* e *L. whitmani* (Graf. 2). Porém, encontramos diferenças entre as espécies do gênero *Phlebotomus*. As dimensões das sensilas caéticas foram maiores em todos os flagelômeros de *P. duboscqi* quando comparada com as de *P. papatasi*. Comparando cada uma das espécies estudadas, todas as sensilas caéticas de *P. papatasi* foram às de menores dimensões com exceção dos flagelômeros XII e XIII. Além disso, as dimensões das sensilas caéticas nos flagelômeros foram características de cada uma das espécies estudadas, sendo as do gênero *Lutzomyia* similares do flagelômero I até o XI.

3.3.6 Número de sensilas

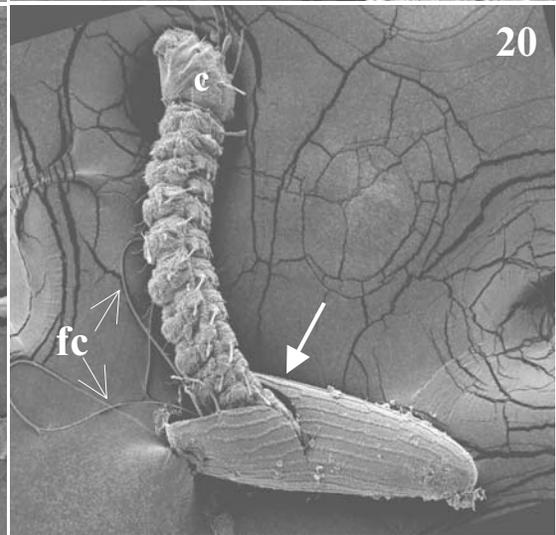
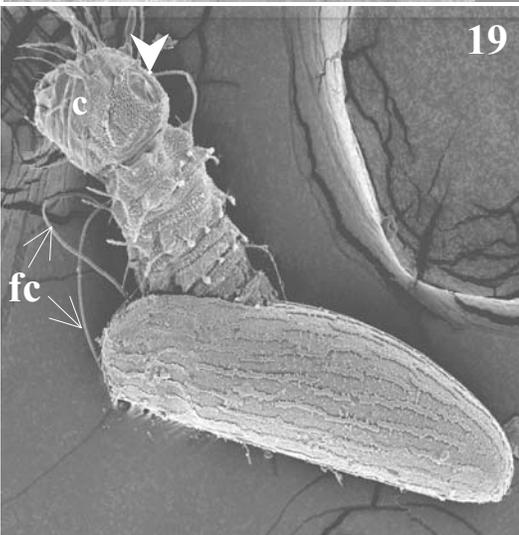
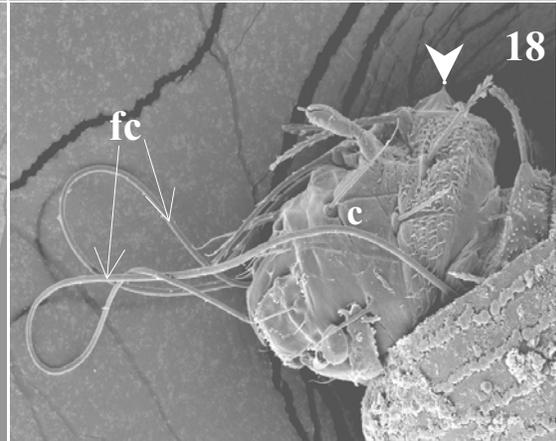
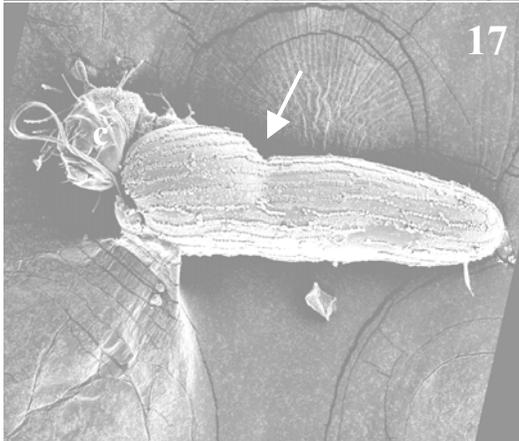
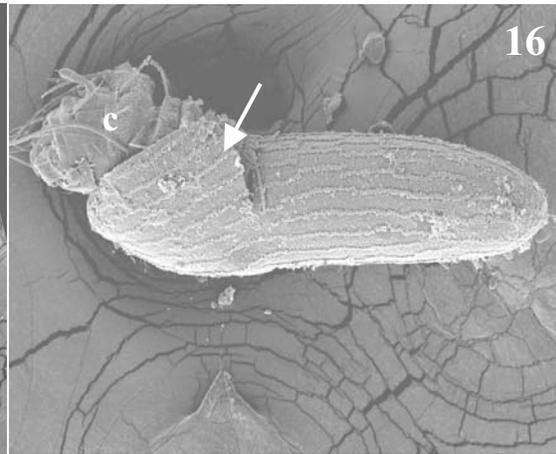
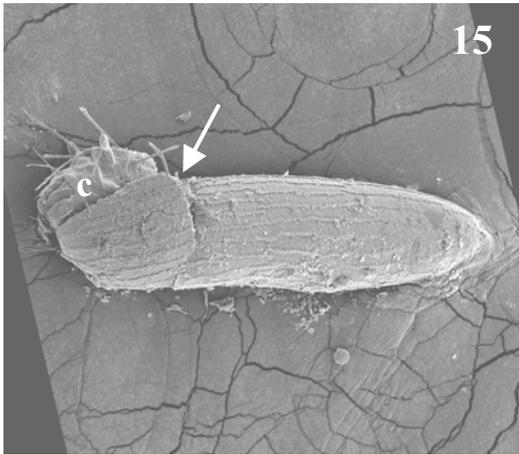
Os flagelômeros de todas as espécies estudadas apresentaram um maior número de sensilas quando comparados ao escapo e o pedicelo (Graf. 3). Dentre os flagelômeros, o flagelômero I apresentou cerca de quatro vezes mais sensilas do que os outros. Porém, o número de sensilas no último flagelômero das espécies do gênero *Phlebotomus* foi cerca de duas vezes maior do que as espécies do gênero *Lutzomyia* (Graf. 3 e Figs. 79 e 80). Um número significativamente maior de sensilas também foi encontrado em outros flagelômeros do gênero *Phlebotomus*, tais como: os flagelômeros II, III, V. No escapo da espécie *P. papatasi* foi encontrada uma diminuição e no flagelômero XIII um aumento significativo do número de sensilas.

Para verificar qual ou quais sensilas estariam envolvidas na diferença quantitativa observadas nos últimos flagelômeros, foi realizada uma análise quantitativa separada de cada sensila. Não foi observada diferença significativa no número de sensilas celocônicas sulcadas I no último flagelômero, mas esta foi significativa nos flagelômeros XII e XIII do gênero *Phlebotomus* (Graf. 6). Um número (cerca de 7 vezes maior) foi observado nas sensilas tricóides de ponta fina no último flagelômero das espécies do gênero *Phlebotomus* (Graf. 5). Um aumento significativo no número de sensilas tricóides de ponta romba foi observado no último flagelômero para as espécies do gênero *Lutzomyia*, ao contrário dos flagelômeros II, III e V, nos quais as espécies *P. papatasi* e *P. duboscqi* apresentaram maior número (Graf. 4).

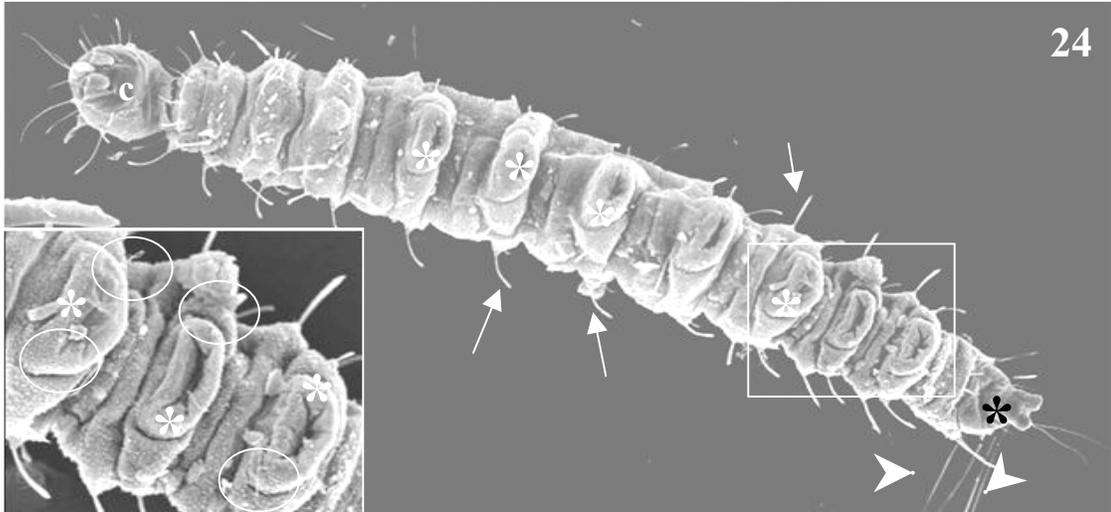
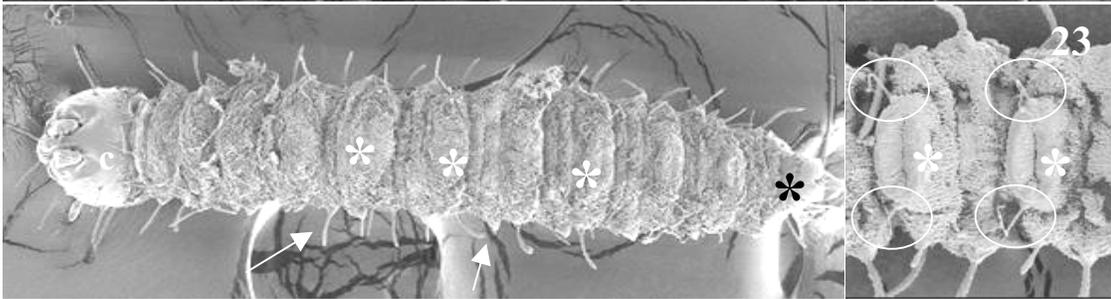
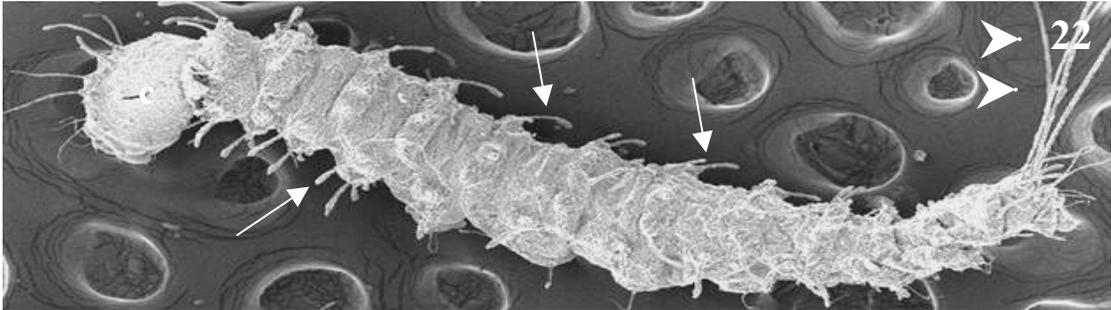
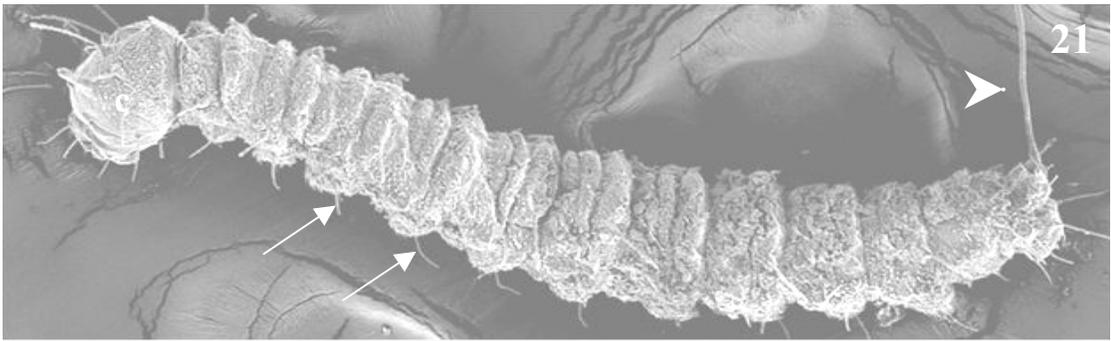
Figs. 11-14. Superfície externa de ovos de *L.intermedia* (Figs. 11 e 13) e *L.whitmani* (Fig. 12 e 14) mostrando a ornamentação do exocório com cristas longitudinais não conectadas (cabeças de seta). Imagens de grande aumento do exocócion (Figs. 13 e 14) mostrando detalhes das cristas formadas por unidades de estruturas palisádicas (asteriscos). Aumentos: Fig. 11 = 300x, Fig. 12 = 300x, Fig. 13 = 4000x, Fig. 14 = 3000x.



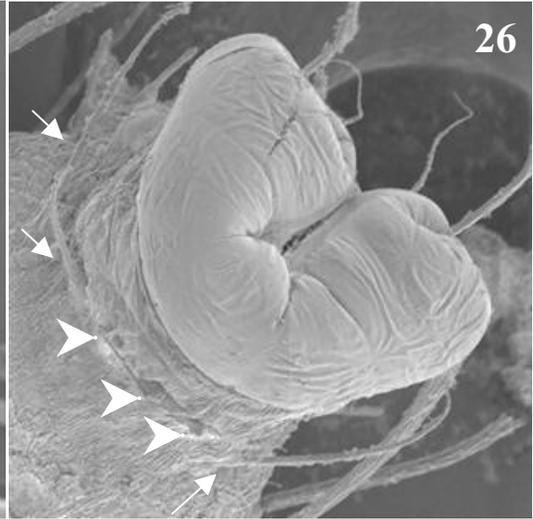
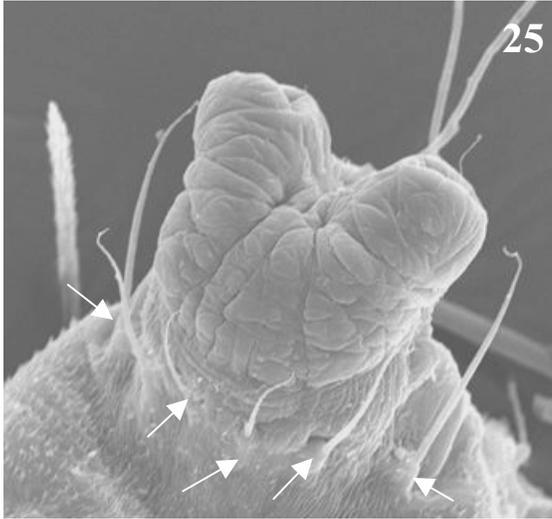
Figs. 15-20. Eventos seqüenciais da quebra do ovo de *L.intermedia* (Figs. 15-20) e *L.whitmani* (não mostrado). As figuras 15 e 16 mostram uma pequena fratura lateral (no pólo anterior) (seta) na parede dos ovos onde a cabeça da larva é inicialmente exposta. Nas figuras 17 e 18 podem ser observadas as cabeças (c) das larvas expostas para fora da parede do ovo. Na figura 18 é possível visualizar o órgão perfurador (cabeça de seta) na cabeça (c) da larva e o longo filamento caudal (fc). As figuras 19 e 20 mostram larvas saindo do ovo tendo a metade e quase todo o corpo para fora. Note o órgão perfurador (cabeça de seta) na cabeça (c) da larva. Aumentos: Fig. 15 = 270x, Fig. 16 = 330x, Fig. 17 = 230x, Fig. 18 = 550x, Fig. 19 = 230x, Fig. 20 = 190x.



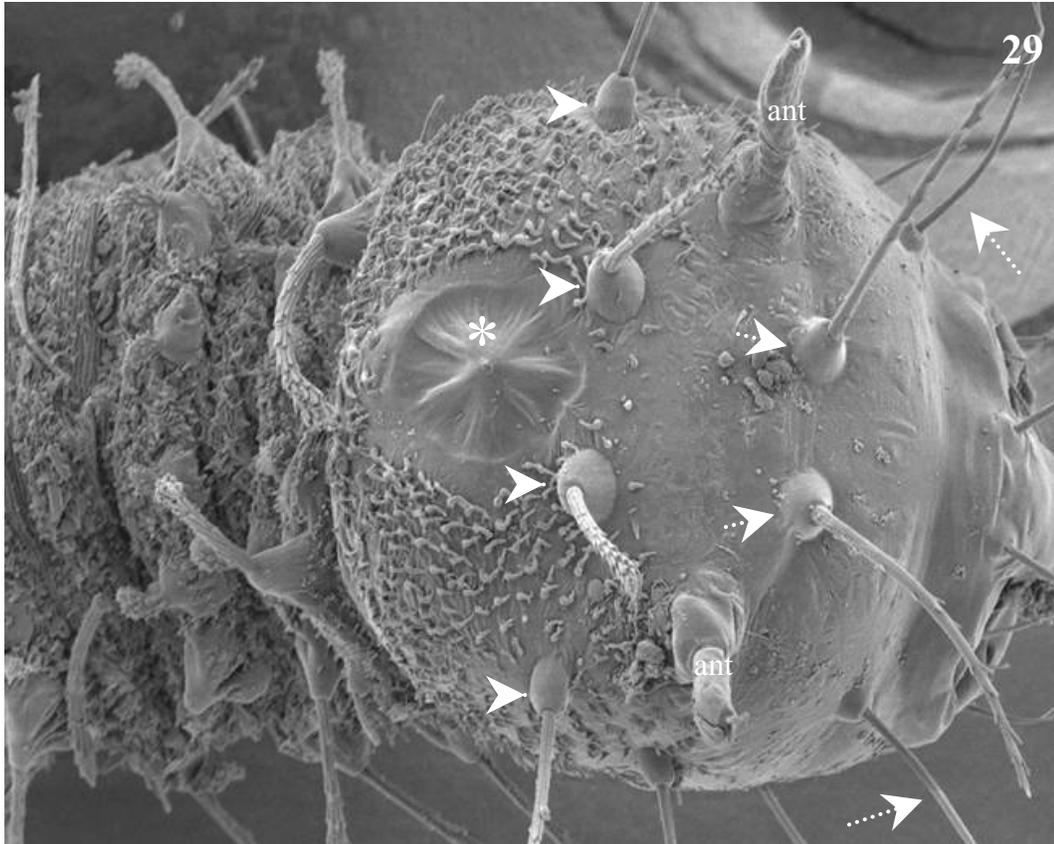
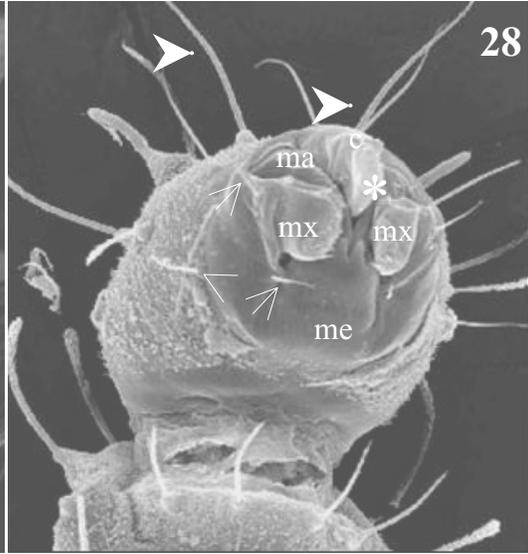
Figs. 21-24. Aspectos gerais da microanatomia das larvas de *L.intermedia* (Figs. 21 e 23) e *L.whitmani* (Fig. 22 e 24). Vista lateral das larvas (Figs. 21 e 22) mostrando as cabeças (c), os corpos segmentados e os filamentos caudais (cabeças de seta). Na superfície externa ventral (Figs. 23 e 24) são facilmente visualizados os três segmentos torácicos e os nove abdominais (asteriscos branco), sendo possível também distinguir a cabeça do lóbulo anal (asteriscos preto). Nas figuras 23 e 24 é possível visualizar as pseudopernas (asteriscos brancos) que estão somente presentes nos segmentos abdominais. Detalhes da superfície externa ventral mostrando as pseudopernas e as sensilas tricóides curvas e longas (círculo) em ambas as espécies. As sensilas tricóides do tipo escova (setas) estão presentes em toda a região dorsal e lateral dos segmentos das larvas. Aumentos: Fig. 21= 220x, Fig. 22 =60x, Fig. 23 = 160x e inset = 500x, Fig. 24 = 35x e inset = 250x.



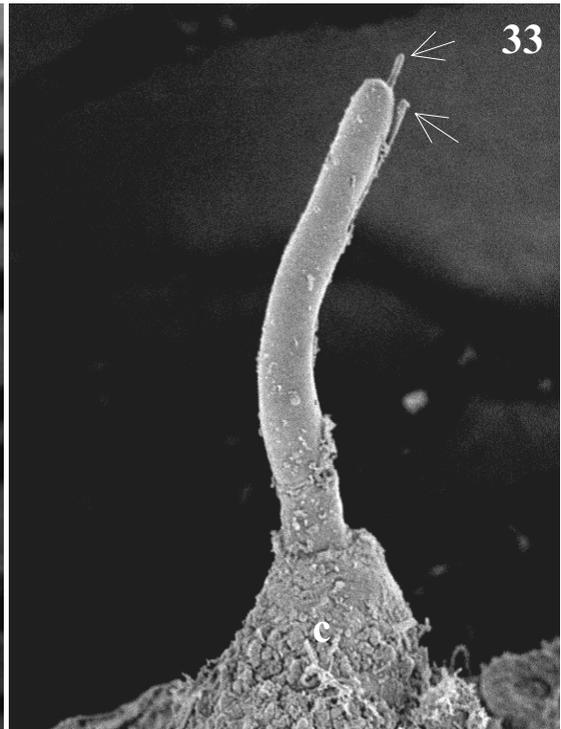
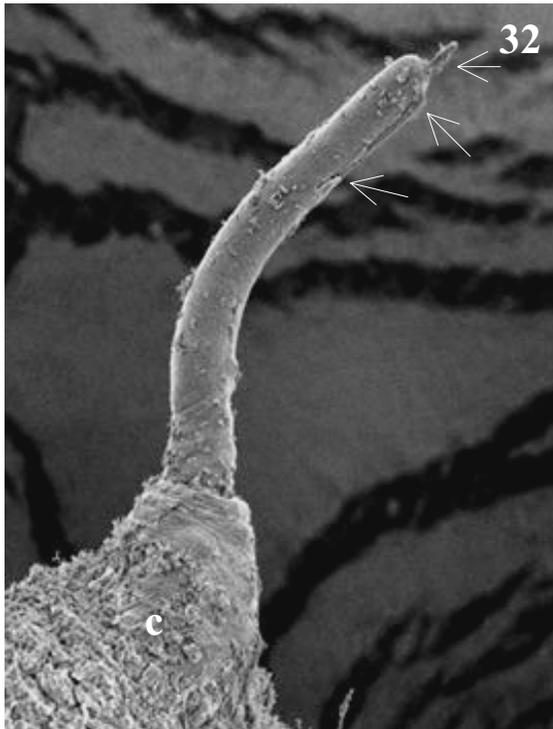
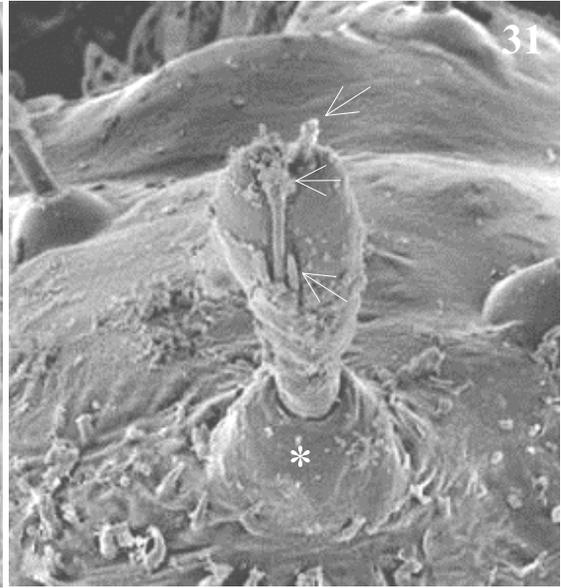
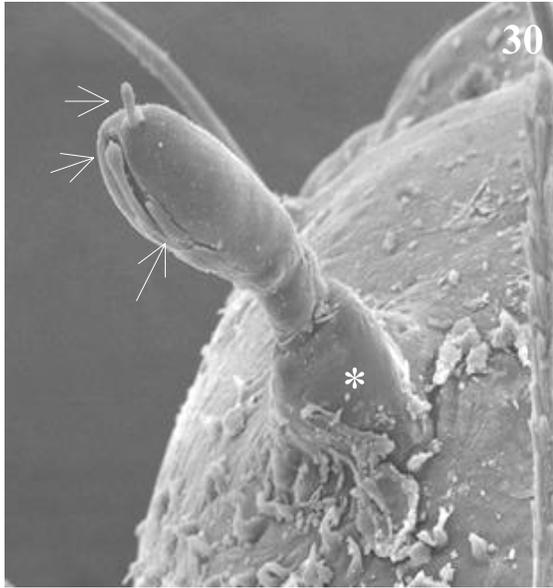
Figs. 25 e 26. Lóbulos anais das larvas de *L.whitmani* (Fig. 25) e *L.intermedia* (Fig. 26). Detalhes dos lóbulos anais mostrando em *L.whitmani* a presença de uma estrutura mais enrugada e menor quando comparada ao *L.intermedia* (Fig. 26). Observe a coroa de sensilas tricóides pequenas e longas (setas), as quais contornam a base dos lóbulos anais. Algumas sensilas tricóides pequenas e longas foram perdidas durante o processamento da amostra mostrando somente as inserções (cabeças de seta). Aumentos: Fig. 25 = 500x, Fig. 26 = 400x.



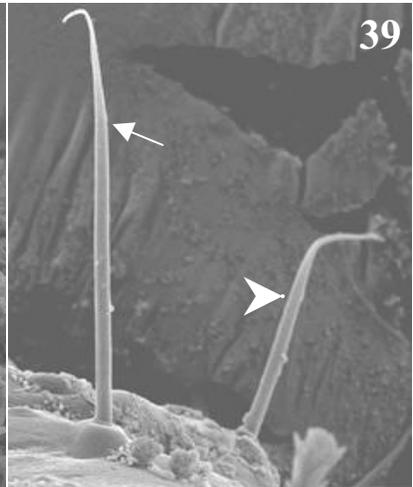
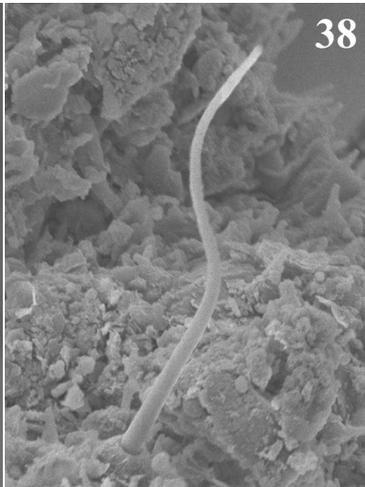
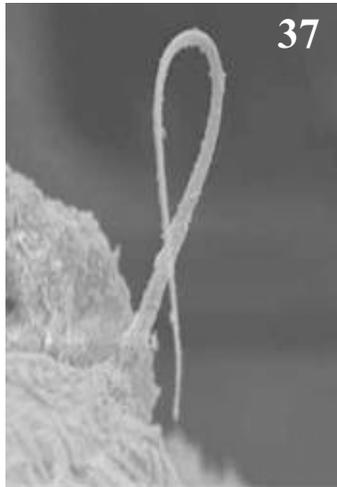
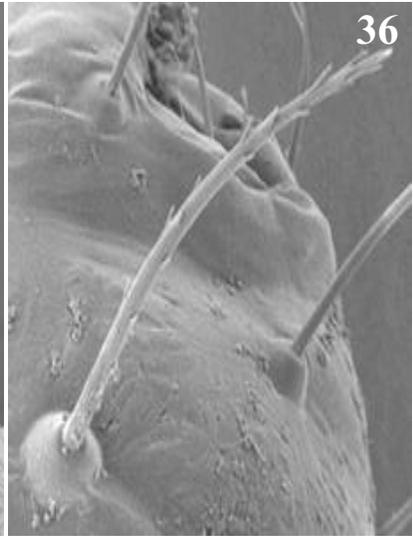
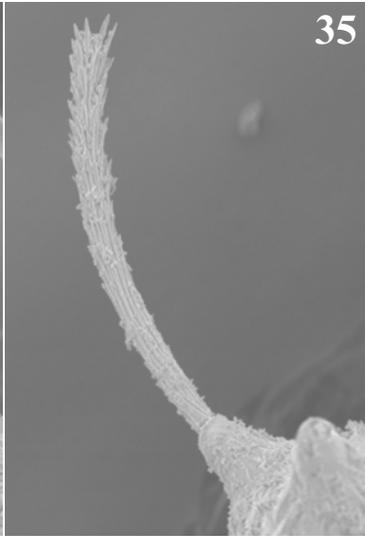
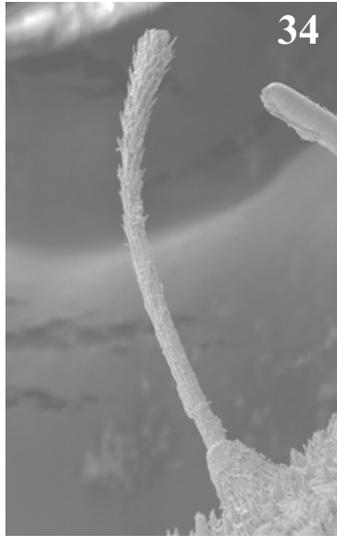
Figs. 27-29. Microanatomia da cabeça das larvas de *L.intermedia* (Figs. 27 e 29) e *L.whitmani* (Fig. 28). Detalhes da face ventral das cabeças mostrando o robusto aparelho bucal. É possível distinguir o clipeo (c), labro (asterisco), mandíbulas (ma), maxilas (mx) e mentum (me) (Figs. 27 e 28). Observe que estas estruturas estão melhor definidas em *L.whitmani* (Fig. 28). Note as sensilas tricóides no ápice da cabeça (cabeças de seta) e as sensilas tricóides pequenas no aparelho bucal (setas). Grande aumento da face dorsal da cabeça (Fig. 29) mostrando a estrutura do órgão perfurador (asterisco) semelhante a uma pirâmide; quatro sensilas tricóides do tipo escova (cabeças de seta) em frente ao órgão perfurador (asterisco), as duas antenas (ant) no meio da cabeça, sensilas tricóides do tipo fracamente escova (setas pequenas) localizadas em frente as antenas e na face mais frontal as sensilas tricóides longas (setas grandes). Aumentos: Fig. 27 = 350x, Fig. 28 = 300x e Fig. 29 = 1000x.



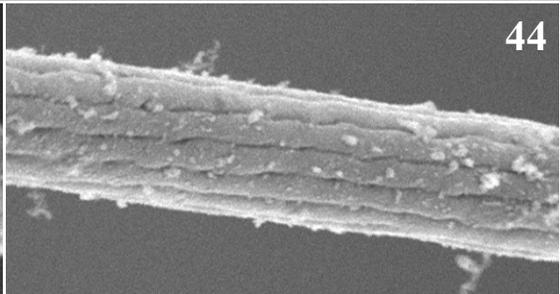
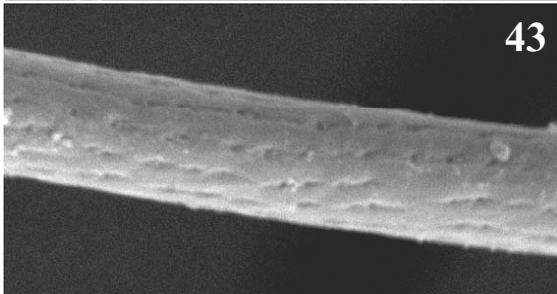
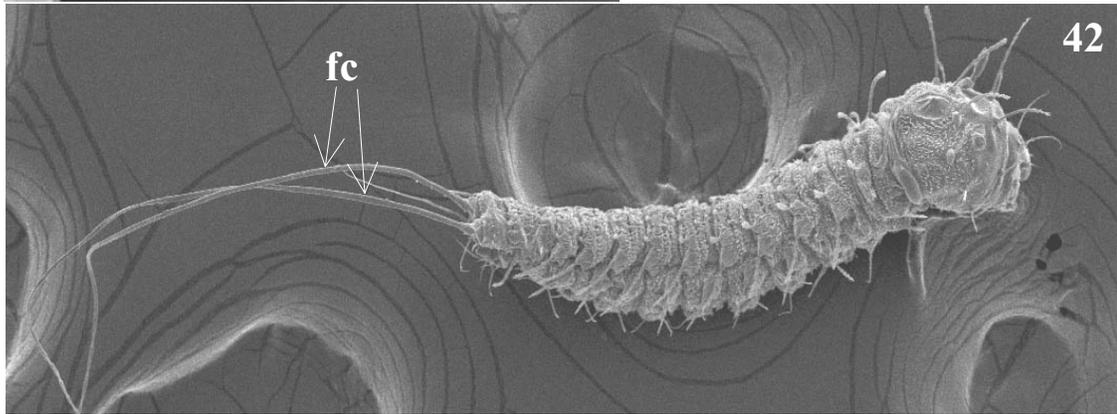
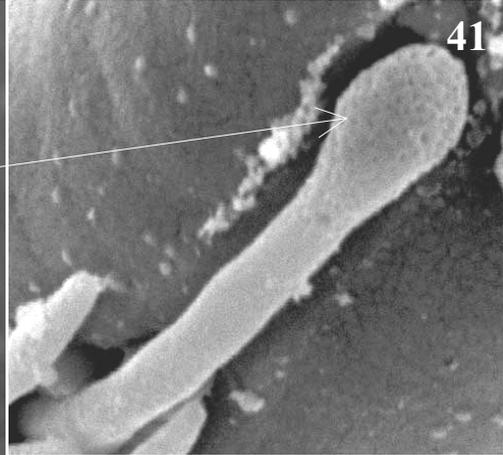
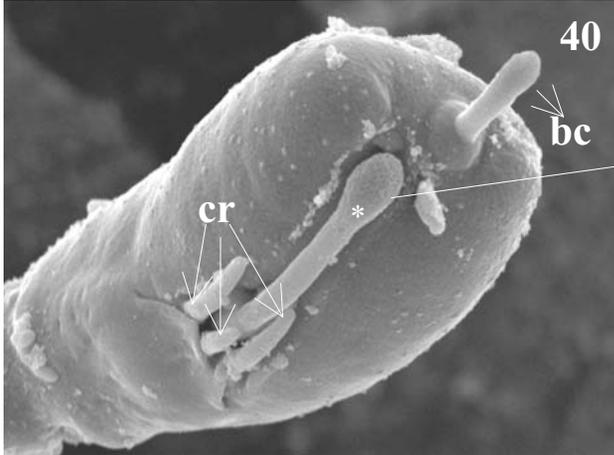
Figs. 30-33. Microanatomia das antenas das larvas de *L. intermedia* (Figs. 30 e 32) e *L. whitmani* (Figs. 31 e 33). A antena da L₁ é uma estrutura lobular composta de um segmento cilíndrico fusionado com um segundo segmento distal ovóide (asteriscos) (Figs. 30 e 31). A antena da L₂, a qual permanece até o estágio L₄, é uma estrutura digitiforme ligada a um cone truncado (c) (Figs. 32 e 33). Observe a presença de sensilas inseridas na região superior e apical nas antenas (setas). Aumentos: Fig. 30 = 2000x, Fig. 31 = 2000x, Fig. 32 = 1000x, Fig. 33 = 1000x.



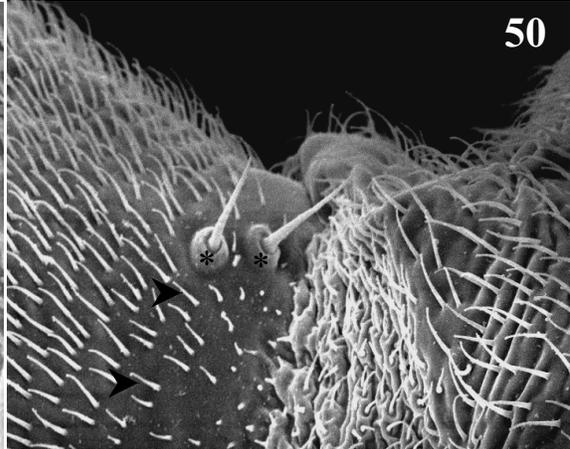
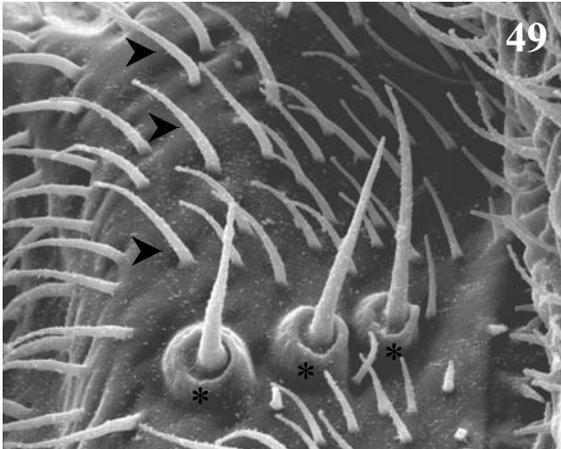
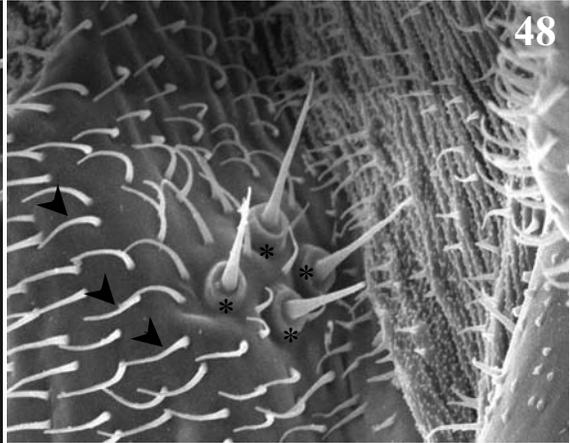
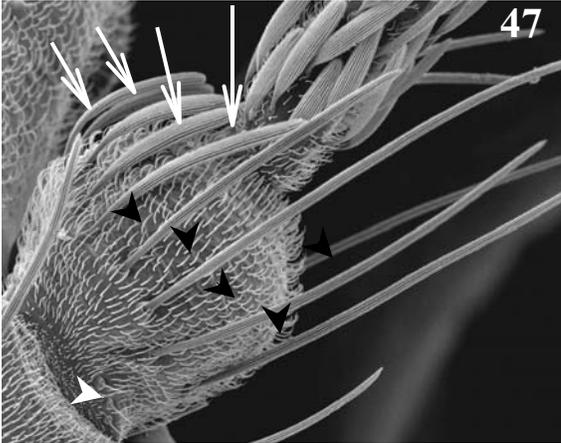
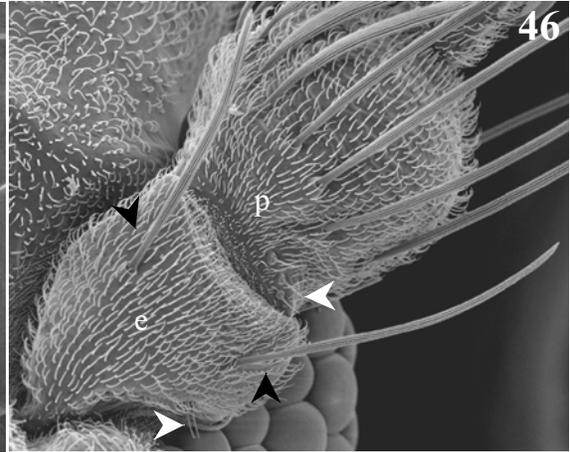
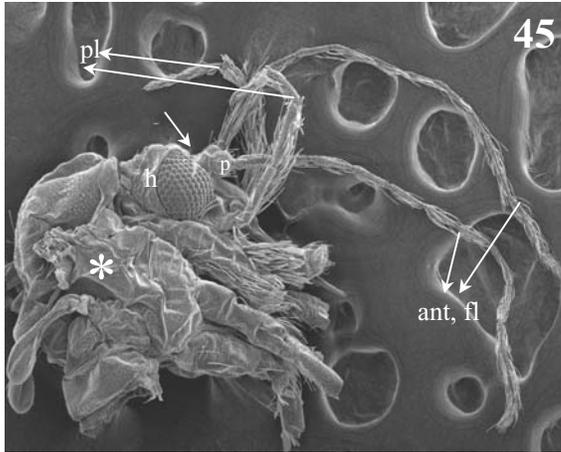
Figs. 34-39. Microanatomia dos tipos de sensilas das larvas de *L.intermedia* e *L.whitmani* (Figs. 34-39). Sensilas tricóides do tipo escova encontradas na cabeça (Fig. 34) e nas regiões lateral e dorsal dos segmentos corporais (Fig. 35). Sensilas tricóides do tipo fracamente escova observadas no meio da cabeça (Fig. 36). Sensilas tricóides longas e curvas localizadas na lateral de cada pseudoperna com diferentes graus de dobramentos (Figs. 37 e 38). Sensilas tricóides pequenas (cabeça de seta) e sensilas tricóides longas (setas) presentes no topo da cabeça (Fig. 39). Aumentos: Fig. 34 = 1000x, Fig. 35 = 1000x, Fig. 36 = 2000x, Fig. 37 = 2000x, Fig. 38 = 3000x e Fig. 39 = 2000x.



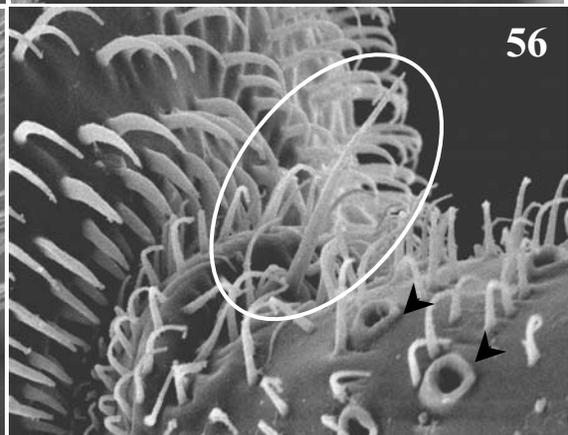
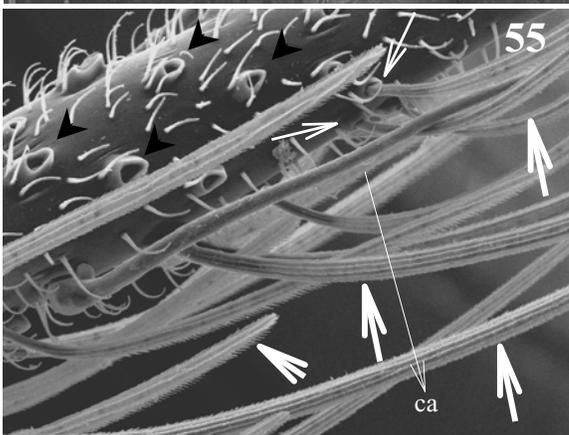
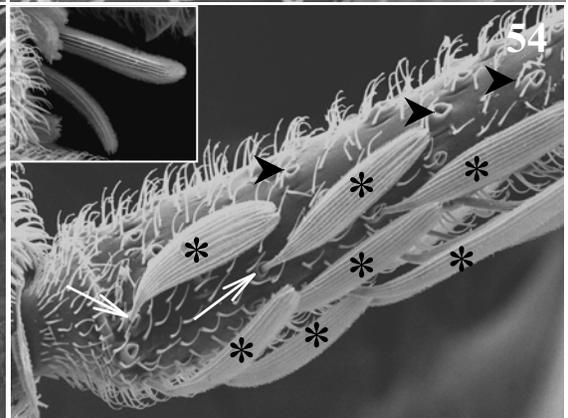
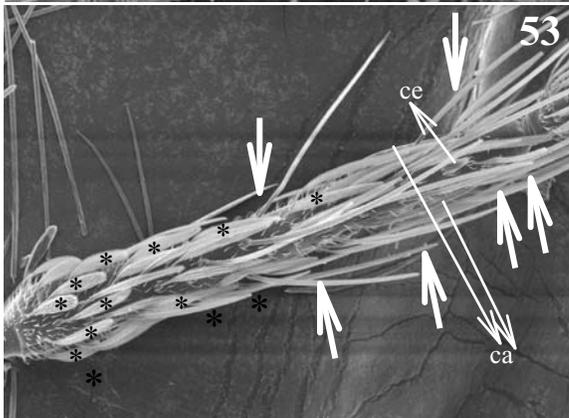
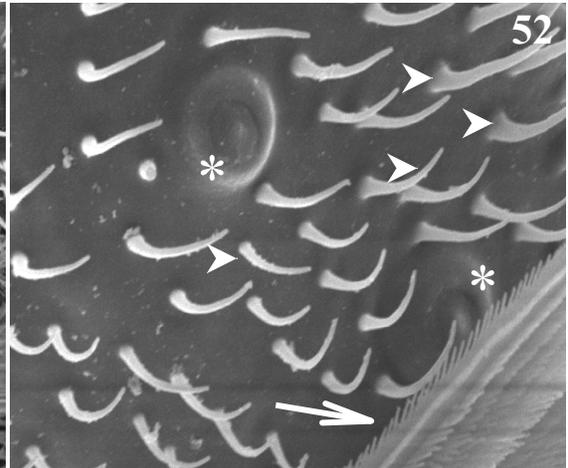
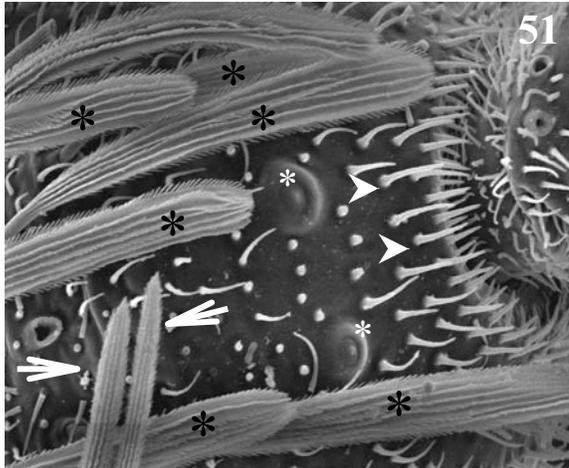
Figs. 40-44. Microanatomia das sensilas de *L.intermedia* (Figs. 40, 41, 42 e 43) e *L.whitmani* (Figs. 44). A figura 40 mostra uma vista geral da antena das larvas L₁ de *L.intermedia*, a qual é morfológicamente similar a de *L.whitmani*. Note as inserções de cinco sensilas. Observe a sensila basicônica clavada (bc) no ápice, três sensilas celocônicas pequenas e rombas (cr) na região proximal e na base da sensila celocônica clavada multiporo (asterisco). Observe em grande aumento os poros da sensila celocônica clavada (Fig. 41). A figura 42 mostra uma visão geral de um par de filamentos caudais (fc) (sensilas tricóides) localizados no último segmento das larvas L₁ de *L.intermedia*. Grande aumento desta estrutura revelou poros em sua superfície e padrões de distribuições distintos nas duas espécies, tendo a *L.intermedia* os poros dispostos na superfície e a *L.withmani* poros dentro dos sulcos (Fig. 44) e . Aumentos: Fig. 40 = 9.000x, Fig. 41 = 21.600x, Fig. 42 = 150x, Fig. 43 = 6.000x, Fig. 44 = 8.000x.



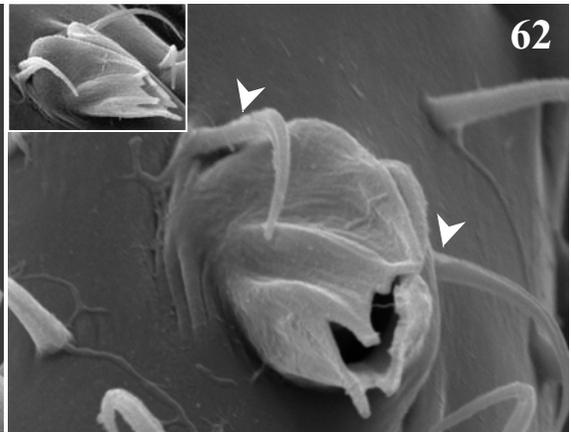
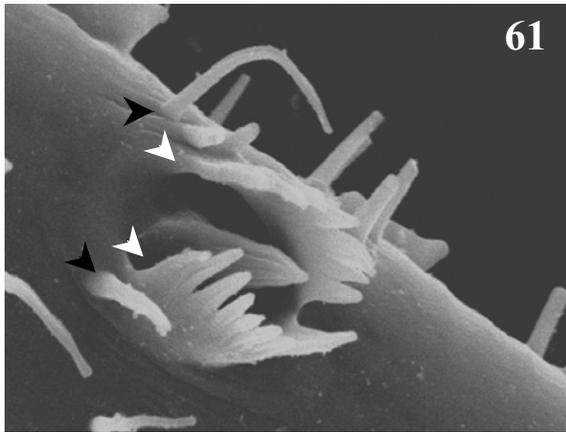
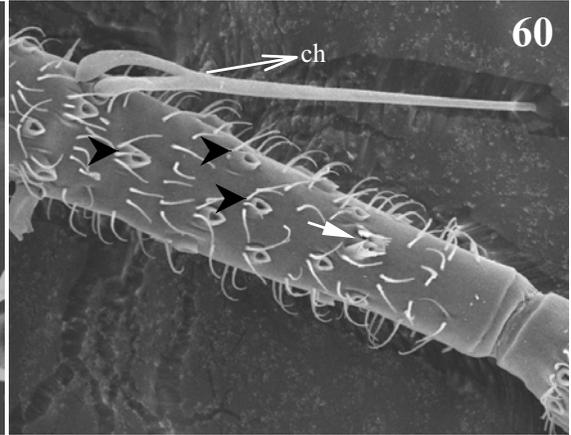
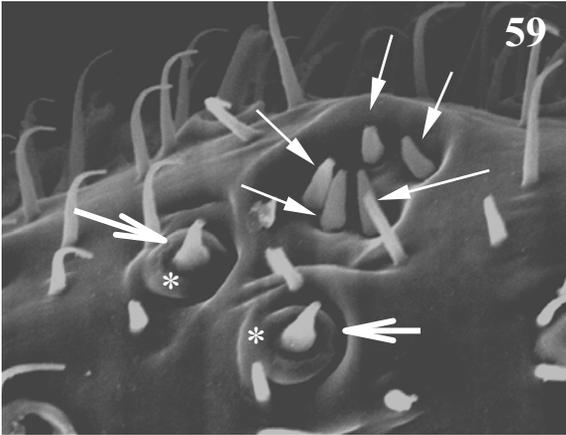
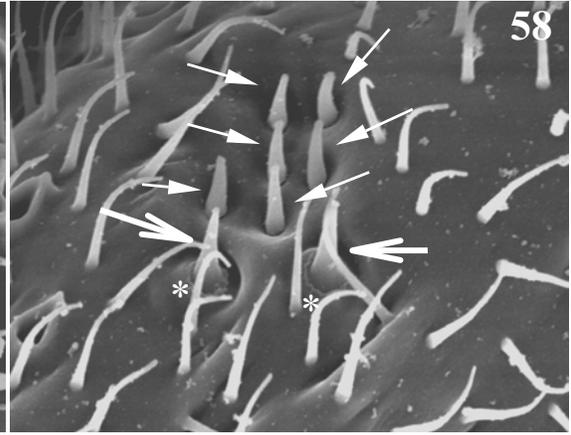
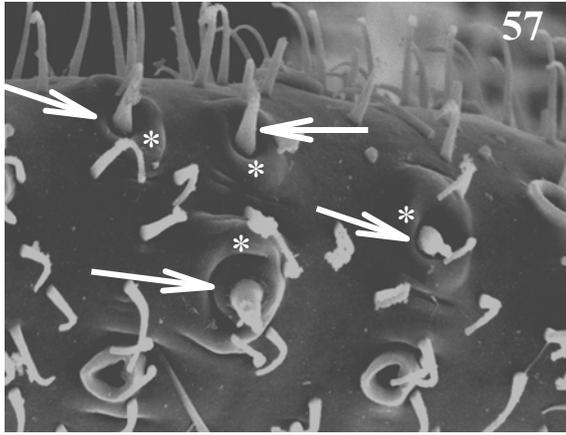
Figs. 45-50: Sensilas das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani* (Figs. 46-48), *P. duboscqi* (Figs. 45 e 50) e *P. papatasi* (Fig. 49). Fig. 45 - Vista lateral de parte de um flebotomíneo mostrando o tórax (asterisco branco) e a cabeça (c) com antenas (ant) e palpos labiais (pl). Na antena podemos diferenciar o escapo (seta fina), o pedicelo (p) e um longo flagelo (fl). Figs. 46-47 - Escapo (e) e pedicelo (p) com sensilas tricóides pequenas de ponta afiada (cabeças de seta brancas), sensilas tricóides de ponta romba (cabeças de seta pretas) e sensilas escamiformas (seta). Figs. 48-50 - Microtríquias (cabeças de seta) e sensilas tricóides pequenas de ponta afiada encontradas no escapo e pedicelo. Note o encaixe flexível que sustenta as sensilas tricóides pequenas de ponta afiada (asterisco preto). Fig. 48 - Quatro sensilas tricóides pequenas de ponta afiada encontradas no escapo de *L. intermedia*, *L. whitmani* e *P. duboscqi*. Fig. 49 - Três sensilas tricóides pequenas de ponta afiada encontradas no escapo e pedicelo de todas as espécies. Fig. 50 - Duas sensilas tricóides pequenas de ponta afiada encontradas no pedicelo de todas as espécies. Aumentos: Fig. 45 = 76x, Fig. 46 = 661x, Fig. 47 = 400x, Fig. 48 = 1000x, Fig. 49 = 4000x, Fig. 50 = 4000x.



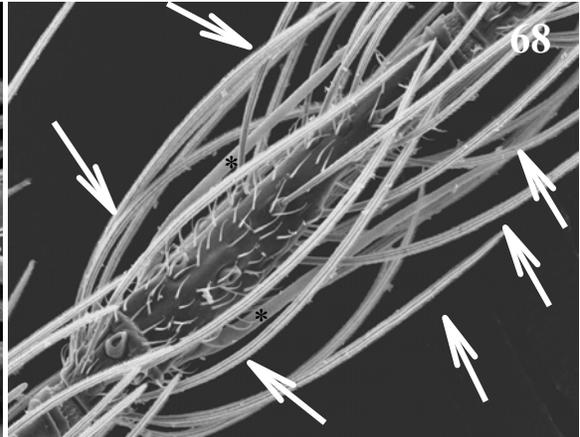
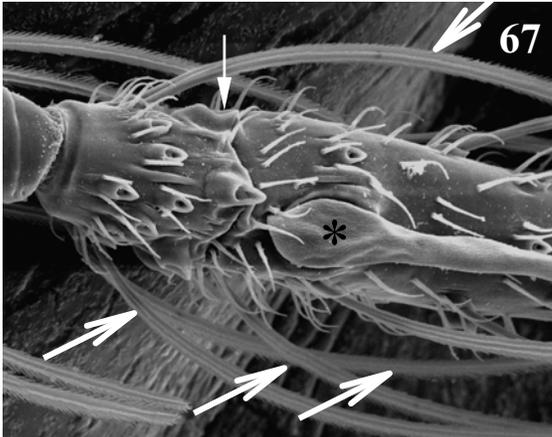
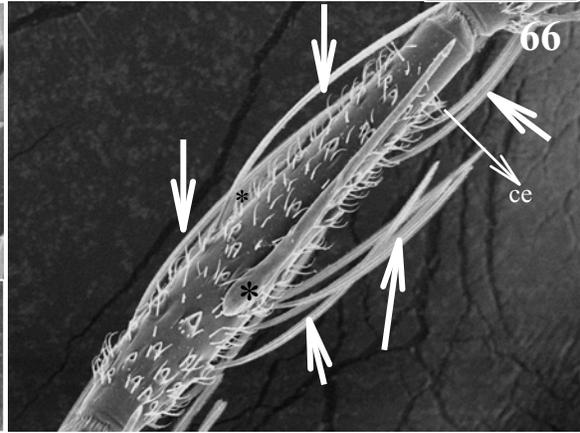
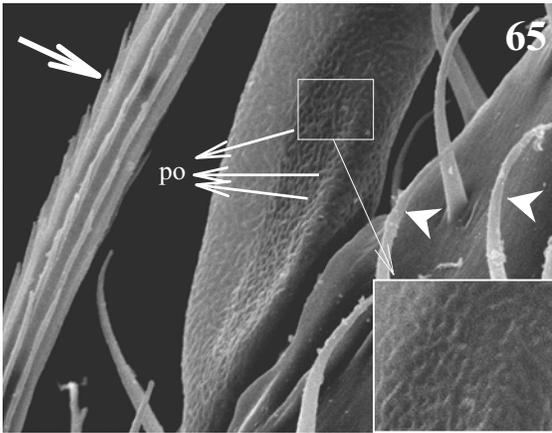
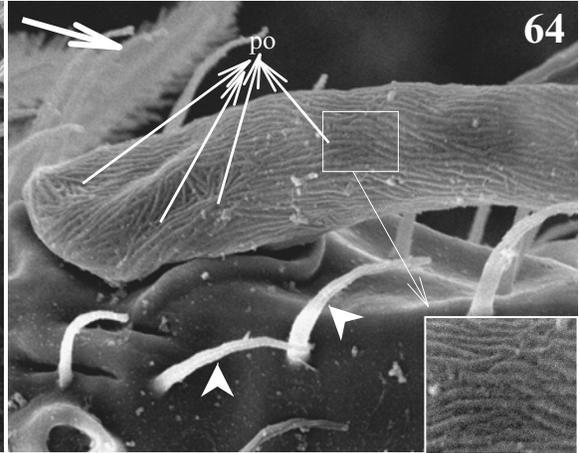
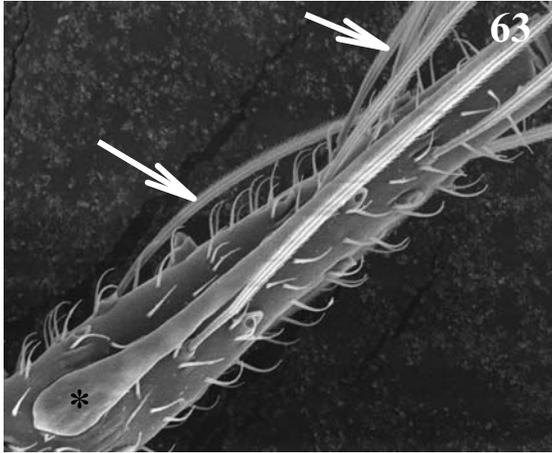
Figs. 51-56: Sensilas das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani* (Figs. 54-56), *P. duboscqi* (Figs. 51 e 52) e *P. papatasi* (Fig. 53). Fig. 51 - Pedicelo com microtríquias (cabeças de seta); sensilas tricóides de ponta romba (setas), sensilas escamiformas (asteriscos pretos) e sensilas campaniformas (asteriscos brancos). Fig. 52 - Grande aumento das sensilas campaniformas (asteriscos brancos), da sensila tricóide de ponta romba (seta grossa) e das microtríquias (cabeças de seta). Fig. 53 - Vista geral do flagelômero I com sensilas escamiformas (asteriscos) na região basal-mediana, sensilas tricóides de ponta romba (setas) na região mediana-distal e duas sensilas caética (ca) na região apical encontradas em todas as espécies; e uma sensila celocônica (ce) encontrada apenas nas espécies *L. intermedia* e *P. papatasi*. Fig. 54 - Foto em grande aumento da base do flagelômero I mostrando as sensilas escamiformas de formato lanceolado (asterisco preto e "inset"). Fig. 55 - Foto em grande aumento da região apical do flagelômero I mostrando as sensilas tricóides de ponta romba de formato cilíndrico (setas grossas) e uma sensila caética (ca). Nas figuras 54 a 56 podem ser observados o encaixe flexível (setas finas) e apenas o encaixe sem as sensilas (cerdas caducas) (cabeças de seta) das sensilas tricóides de ponta romba (Fig. 55) e das escamiformas (Figs. 54 e 56). Nas figuras 51, 52, 54 e "inset" e 55 podem ser visualizadas as arestas ou ramificações que se projetam da superfície das sensilas tricóides de ponta romba (Figs. 52 e 55) e das escamiformas (Figs. 51 e 54 e "inset"). Fig. 56 - Sensila tricóide pequena de ponta afiada (círculo) na base do flagelômero I presentes apenas em *L. whitmani* e em *L. intermedia*. Aumentos: Fig. 51 = 1400x, Fig. 52 = 3200x, Fig. 53 = 2000x, Fig. 54 = 700x "inset" = 2000x, Fig. 55 = 1200x, Fig. 56 = 3000x.



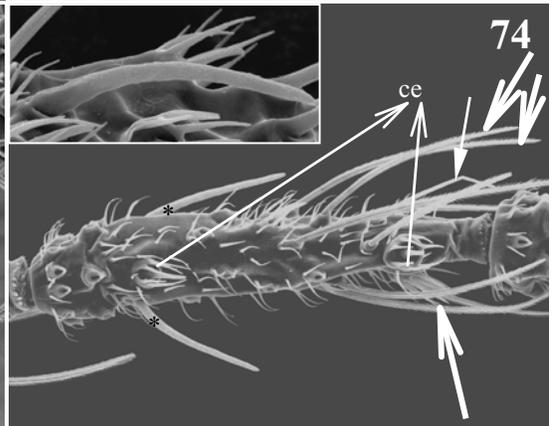
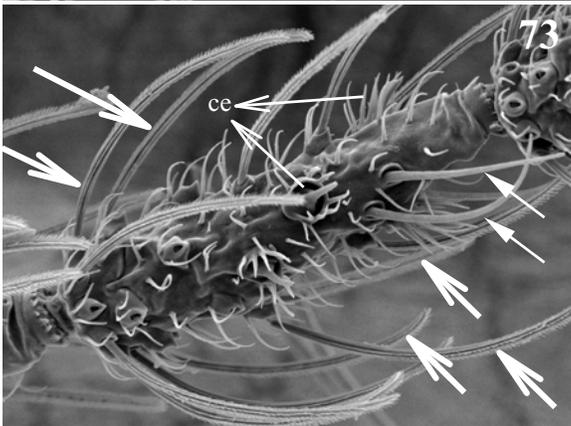
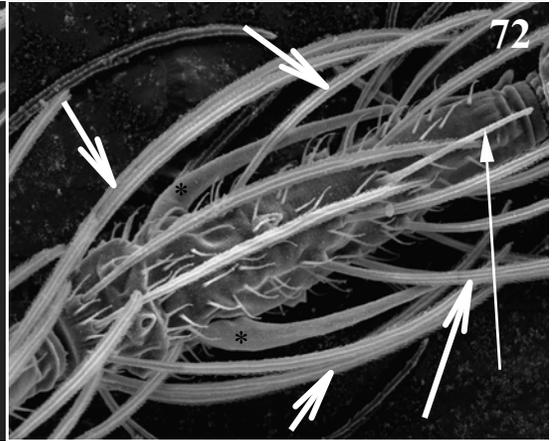
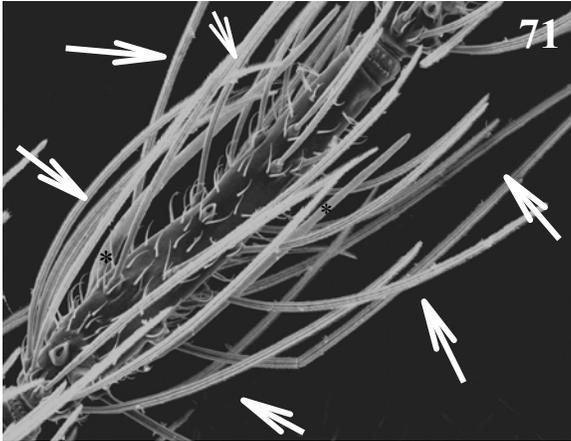
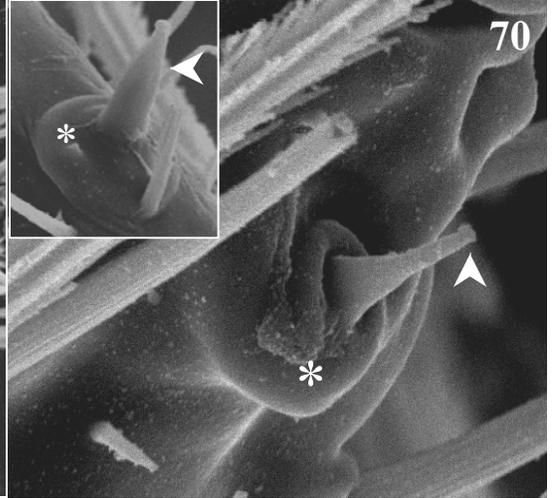
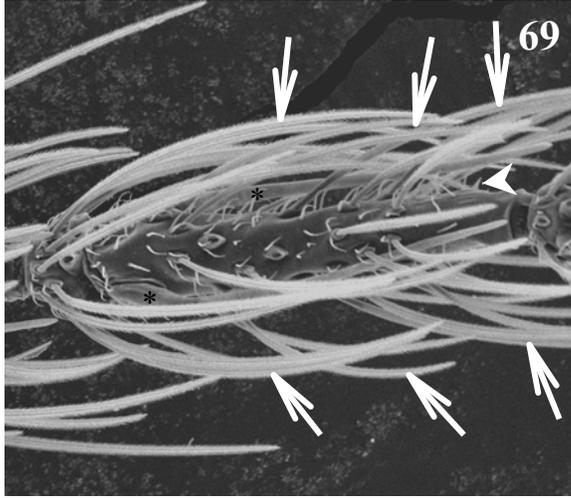
Figs. 57-62: Sensilas das antenas de *L. intermedia* (Figs. 57, 60 e 61), *L. whitmani* (Fig. 62), *P. duboscqi* (Fig. 58) e *P. papatasi* (Fig. 59). Fig. 57 - Quatro sensilas tricóides pequenas de ponta romba (seta) encontradas na base do flagelômero I de *L. intermedia* e *L. whitmani*. Fig. 58 - Grupo de sensilas agrupadas na base do flagelômero I de *P. duboscqi*. Observe duas sensilas tricóides pequenas de ponta romba (setas) e seis sensilas basicônicas (setas finas) em depressão rasa do tegumento. Fig. 59 - Grupo de sensilas agrupadas na base do flagelômero I de *P. papatasi*. Observe duas sensilas tricóides pequenas de ponta romba (setas) e cinco sensilas basicônicas (setas finas) em depressão profunda do tegumento. Nas figuras 57 a 59 pode-se observar o encaixe flexível (asterisco branco) das sensilas tricóides pequenas de ponta romba; e a ausência de encaixe nas sensilas basicônicas (seta fina). Fig. 60- Ápice do flagelômero I de *L. intermedia* mostrando uma sensila caética (ca) com base bifurcada, uma sensila celocônica sulcada II (seta) e encaixes das sensilas tricóides de ponta romba (cabeças de seta). Fig. 61 - Grande aumento da sensila celocônica sulcada II encontrada nos flagelômeros I e II de *L. intermedia* e no II de *L. whitmani* mostrando os sulcos em sua superfície e a estrutura de microtríquias protetoras, as quais são unidas na base ao seu redor (cabeças de seta brancas) e duas microtríquias laterais (cabeças de seta pretas). Fig. 62 - Sensila celocônica "mãos em prece" em face frontal e lateral ("inset") com duas microtríquias (cabeças de seta) ao seu redor encontradas no ápice do segundo e terceiro flagelômeros das espécies estudadas, exceto *L. intermedia*. Observe a estrutura cuticular protetora desta sensila que parece com duas mãos unidas em posição de reza. Aumentos: Fig. 57 = 3800x, Fig. 58 = 3600x, Fig. 59 = 5300x, Fig. 60 = 850x, Fig. 61 = 7600x, Fig. 62 = 15500x e "inset" = 7300x.



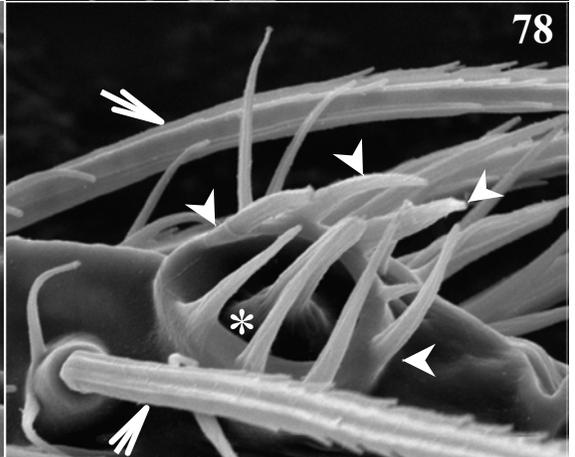
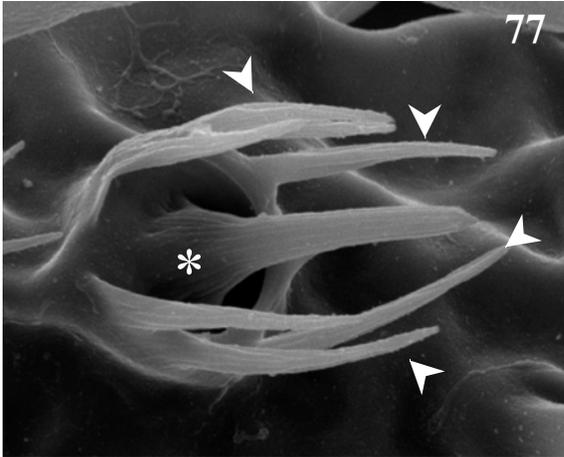
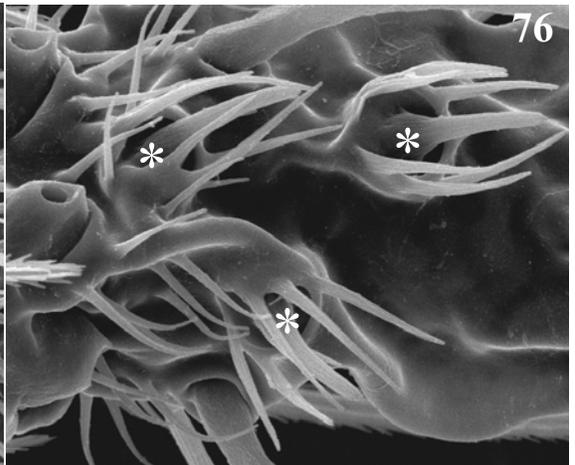
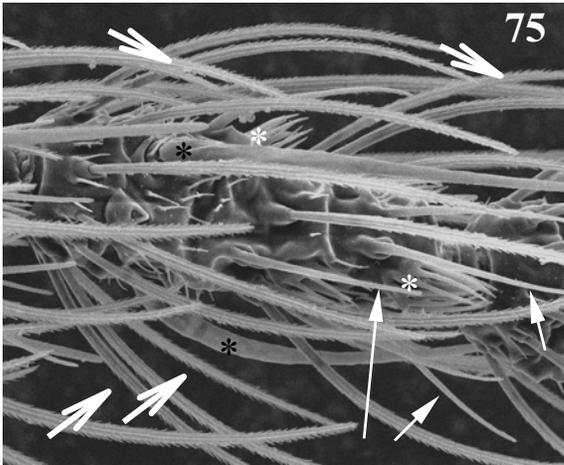
Figs. 63-68: Sensilas das antenas de *L. intermedia* (Figs. 65 e 68), *L. whitmani*, *P. duboscqi* (Figs. 63, 64, 66 e 67) e *P. papatasi*. Fig. 63- Estrutura cuticular da sensila caética (pêlo robusto) (asterisco) e sensilas tricóides de ponta romba (setas grossas) encontradas em todas as espécies estudadas. Figs. 64 e 65 - Sensila caética com poros (po), sensilas tricóides de ponta romba (setas) e microtríquias (cabeças de seta) características de todas as espécies. Note o encaixe firme da sensila caética que a deixa presa a superfície do tegumento; e as ramificações na superfície da sensila tricóide de ponta romba. Observe os diferentes padrões de poros, os quais encontram-se dispostos em sulcos paralelos no gênero *Phlebotomus* (Fig. 64 “inset”) e dispostos na superfície no *Lutzomyia* (Fig. 65 “inset”). Fig. 66 - Aspecto geral do flagelômero II e III comum a todas as espécies com microtríquias, várias sensilas tricóides de ponta romba (seta grossa), duas sensilas caéticas (uma não está completamente visível) (asteriscos) ao longo do segmento. Vê-se também uma sensila celocônica (ce) na região apical. Fig. 67 - Subdivisão da base do flagelômero (seta fina) somente encontradas nos flagelômeros VI a X de *P. duboscqi*. Fig. 68 - Aspecto geral dos flagelômeros IV a VIII em todas as espécies com sensilas caéticas (asteriscos) e sensilas tricóides de ponta romba (setas) distribuídas ao longo do segmento. Aumentos: Fig. 63 = 820x, Fig. 64 = 4500x, Fig. 65 = 5500x, Fig. 66 = 600x, Fig. 67 = 1200x, Fig. 68 = 700x.



Figs. 69-74: Sensila das antenas de *L. intermedia* (Figs. 71 e 73), *L. whitmani* (Figs. 70 e 74), *P. duboscqi* (Fig. 69) e *P. papatasi* (Fig. 72). Fig. 69 - Aspecto geral dos flagelômeros IX e XI característico de todas as espécies com duas sensila caética (asteriscos) e diversas sensilas tricóides de ponta romba (setas grossas) distribuídas ao longo de segmento. Veja uma sensila tricóide pequena de ponta romba (cabeça de seta) na região apical. Figs. 70 e "inset" - Grandes aumentos de duas sensilas tricóides pequenas de ponta romba (cabeças de seta) com encaixe fixo (asteriscos) encontradas nos flagelômeros IX, e XI e XIII dos flebotomíneos, exceto no flagelômero XI de *P. papatasi*. Fig. 71 - Flagelômero X das espécies de *Lutzomyia* com duas sensilas caética sensilas tricóides de ponta romba (setas) e duas sensilas caéticas distribuídas ao longo do segmento (asteriscos). Neste mesmo flagelômero e no XI foi possível observar uma sensila tricóide de ponta fina (seta longa) característica do gênero *Phlebotomus* (Fig. 72). Fig. 73 e 74 - Flagelômeros XII das antenas de *L. intermedia* (Fig. 73) e *L. whitmani*, (Fig. 74) com sensilas tricóides de ponta romba (setas), sensilas tricóides de ponta fina (setas finas), sensilas celocônicas sulcadas (ce). Observe o tamanho reduzido das sensilas caéticas de *L. whitmani* (Figs. 74 e "inset") e a ausência desta em *L. intermedia* (Fig. 73). Aumentos: Fig. 69 = 1000x, Fig. 70 = 10500x e "inset" = 5500x, Fig. 71 = 900x, Fig. 72 = 1300x, Fig. 73 = 6400x, Fig. 74 = 1500x e "inset" = 2300x.



Figs. 75-78: Sensilas das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani* (Figs. 76-78), *P. duboscqi* (Fig. 75). Fig. 75 - Flagelômeros XII e XIII de *P. papatasi* e *P. duboscqi*. Observe as sensilas caéticas (asteriscos pretos) sensilas tricóides de ponta romba (setas grossas) e de ponta fina (setas finas) e as sensilas celocônicas sulcadas II (asteriscos brancos) por todo o segmento. Fig. 76 - Várias sensilas celocônicas sulcadas II (asteriscos brancos) encontradas num mesmo flagelômero. Figs. 77 e 78 - Grande aumento das sensilas celocônicas sulcadas II (asteriscos brancos) encontradas nos flagelômeros XII ao XIV de todas as espécies. Observe os sulcos na superfície desta sensila e as a estrutura protetora formada por microtríquias que se unem apenas na base (cabeças de seta) rodeando estas. Aumentos: Fig. 75 = 1700x, Fig. 76 = 5000x, Fig. 79 = 66000x, Fig. 78 = 10800x, Fig. 79 = 1100x, Fig. 80 = 1400x.



Figs. 79-82: Sensilas das antenas de *L. intermedia* (Fig. 81), *L. whitmani* (Fig. 79), *P. duboscqi* (Fig. 80) e *P. papatasi* (Fig. 82). Figs. 79 e 80 - Flagelômeros XIV das espécies de *Lutzomyia* e de *Phlebotomus*, respectivamente. Note as sensilas tricóides de ponta fina (setas finas) por todo o segmento exceto na região basal, as tricóides de ponta romba (setas grossas) na região basal, as tricóides pequenas de ponta romba (tp) na base do prolongamento, e as sensilas celocônicas sulcadas I (asteriscos) por todo o segmento. Observe a diferença na quantidade das sensilas tricóides de ponta fina entre os dois gêneros estudados. Fig. 81 - Grande aumento da parte distal do flagelômero XIV representativa para todas as espécies com sensilas tricóides de ponta fina (setas finas), de ponta romba (setas grossa) e pequena de ponta romba (tp) na base da extensão e a sensila celocônica sulcada I (asterisco). Observe na ponta da extensão a existência de uma sensila tricóide (cabeça de seta). Fig. 82 - Ápice do flagelômero XIV de um espécime de *P. papatasi* com sensila tricóide grande na ponta da extensão (cabeça de seta). Aumentos: Fig. 79 = 1100x, Fig. 80 = 1400x, Fig. 81 = 3000x, Fig. 82 = 5100x.

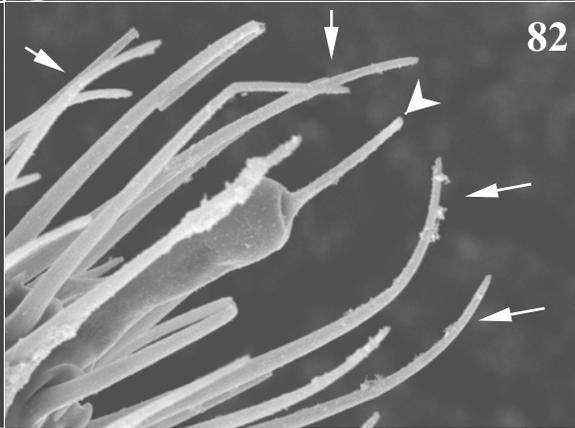
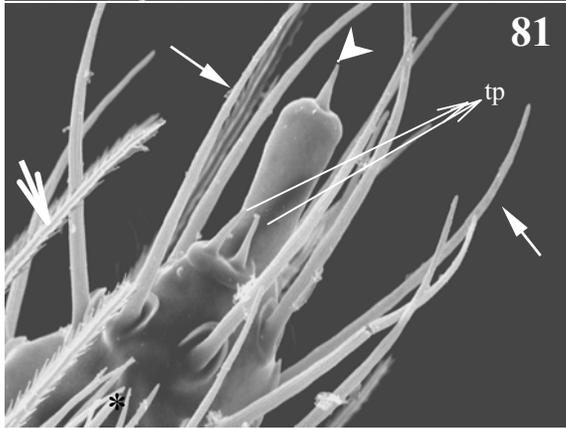
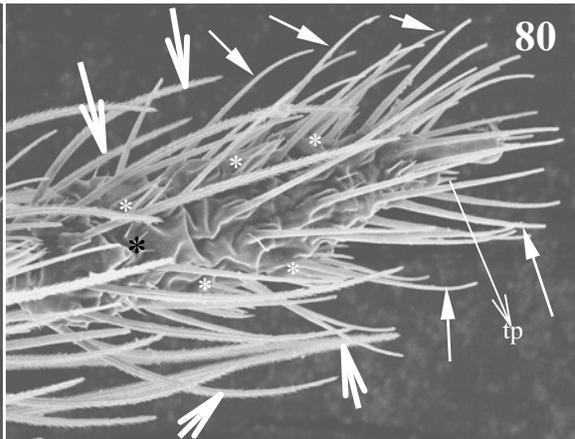
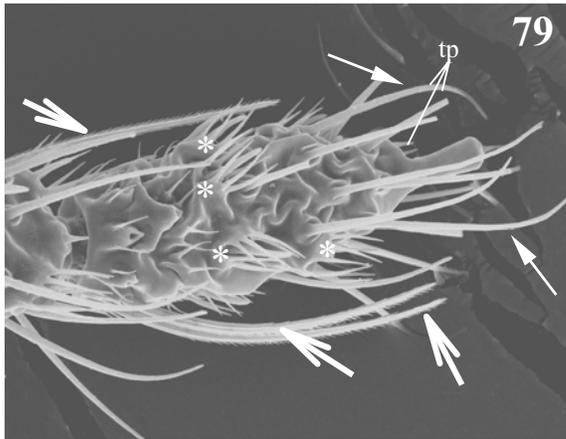


Tabela 1: Tipos e subtipos de sensilas encontrados em cada segmento antenal de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*.

Segmentos antenais	Sensila tricóide			Sensila celocônica			Sensila caética	Sensila basicônica	Sensila escami-forma	Sensila campani-forma	
	pequena		ponta romba	ponta fina	sulcada						
	ponta afiada	ponta romba			I	II					“mãos em prece”
Escapo	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>		<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>								
Pedicelo	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>		<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>						<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	
Flag. I	<i>Li Lw</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>		<i>Li</i>	<i>Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>		
Flag. II			<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>		<i>Li Lw</i>	<i>Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. III			<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>			<i>Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. IV - VIII			<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. IX		<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. X			<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Pd</i>			<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. XI		<i>Li Lw</i> <i>Pd</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Pd Pp</i>			<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. XII			<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>		<i>Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. XIII		<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>		<i>Lw</i> <i>Pd Pp</i>				
Flag. XIV		<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>	<i>Li Lw</i> <i>Pd Pp</i>						

Li - *L. intermedia*;

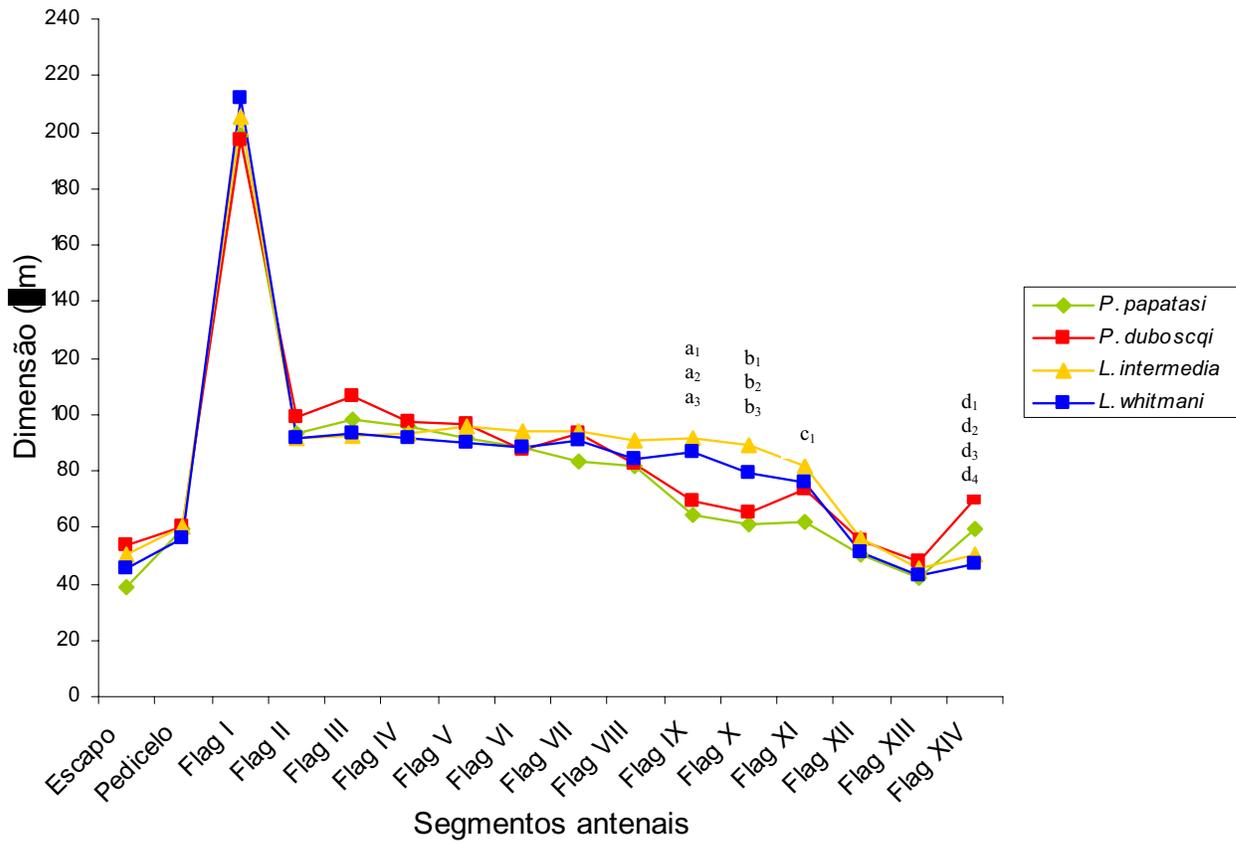
Lw - *L. whitmani*;

Pd - *P. duboscqi*;

Pp - *P. papatasi*;

Flag.- flagelômeros.

Dimensões dos segmentos antenais



Graf. 1: Dimensões dos segmentos das antenas de *L. intermedia* (Li) , *L. whitmani* (Lw) , *P. duboscqi* (Pd) e *P. papatasi* (Pp). Flag. - Flagelômero.

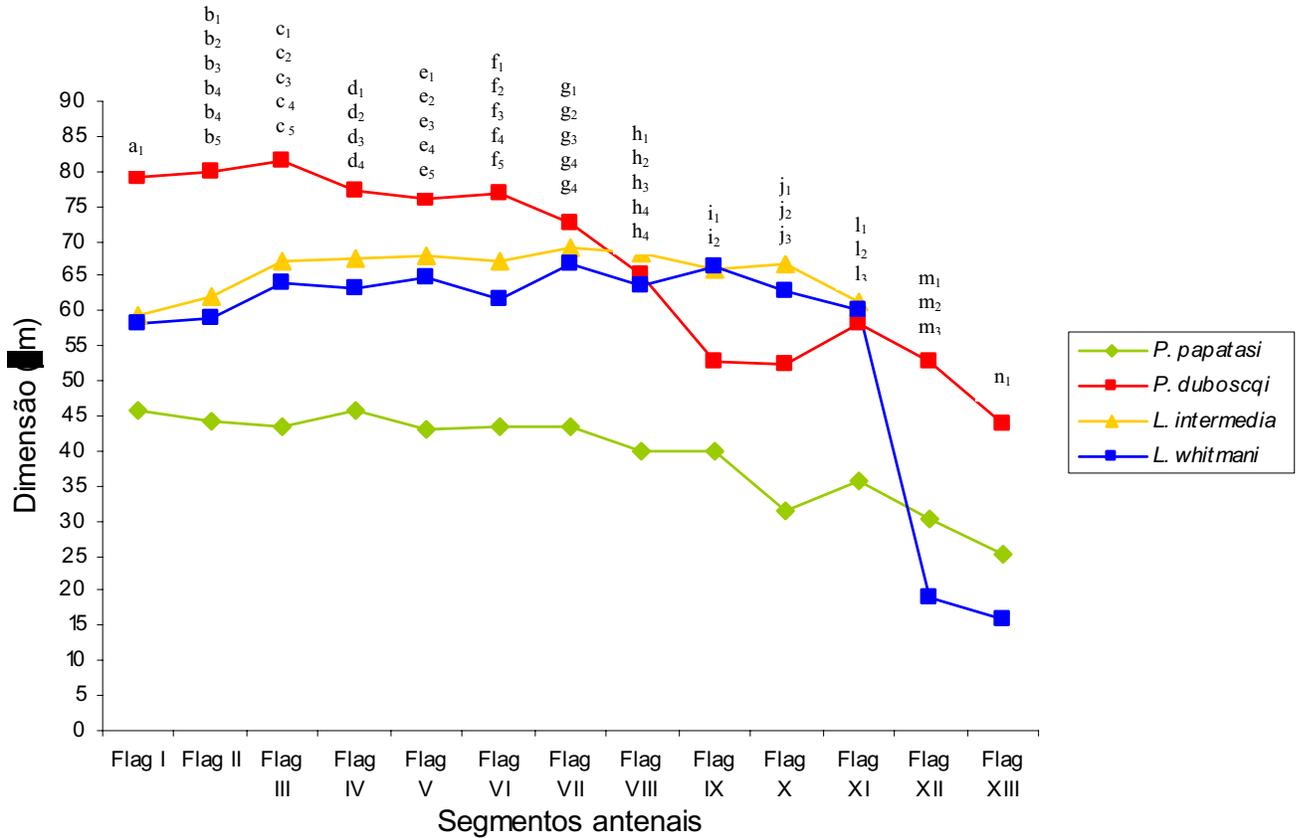
a₁ (Pp-Li) - p<0,01; a₂ (Li- Pd) - p<0,01; a₃ (Lw-Pd) - p<0,05;

b₁ (Pp-Li) - p<0,01; b₂ (Li- Pd) - p<0,01; b₃ (Lw-Pd) - p<0,05;

c₁ (Pp-Li) - p<0,01;

d₁ (Pp-Li) - p<0,05; d₂ (Pp-Lw) - p<0,05; d₃ (Li-Pd) - p<0,05; d₄ (Lw-Pd) - p<0,01.

Dimensões das sensilas caéticas



Graf. 2: Dimensões das sensilas caéticas nos diferentes flagelômeros das antenas das fêmeas das espécies *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*. Obs: Só foram representados no gráfico os seguimentos que possuem as sensilas caéticas, os flagelômeros I-XIII. Flag.- Flagelômero.

a1 (Pp-Pd) - $p < 0,001$;

b1 (Pp-Li) - $p < 0,001$; b2 (Pp-Lw) - $p < 0,01$; b3 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; b4 (Li- Pd) - $p < 0,001$; b5 (Lw-Pd)- $p < 0,001$;

c1 (Pp-Li) - $p < 0,001$; c2 (Pp-Lw) - $p < 0,01$; c3 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; c4 (Li- Pd) - $p < 0,01$; c5 (Lw-Pd)- $p < 0,01$;

d1 (Pp-Li) - $p < 0,01$; d2 (Pp-Lw) - $p < 0,01$; d3 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; d4 (Lw-Pd)- $p < 0,01$;

e1 (Pp-Li) - $p < 0,001$; e2 (Pp-Lw) - $p < 0,001$; e3 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; e4 (Li- Pd) - $p < 0,05$; e5 (Lw-Pd)- $p < 0,01$;

f1 (Pp-Li) - $p < 0,001$; f2 (Pp-Lw) - $p < 0,001$; f3 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; f4 (Li- Pd) - $p < 0,05$; f5 (Lw-Pd)- $p < 0,01$;

g1 (Pp-Li)- $p < 0,001$; g2 (Pp-Lw) - $p < 0,001$; g3 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; g4 (Lw-Pd)- $p < 0,05$;

h1 (Pp-Li) - $p < 0,001$; h2 (Pp-Pd) - $p < 0,01$;

i1 (Pp-Li) - $p < 0,001$; i2 (Pp-Lw) - $p < 0,001$; i3 (Pp-Pd) - $p < 0,01$; i4 (Li- Pd) - $p < 0,01$;

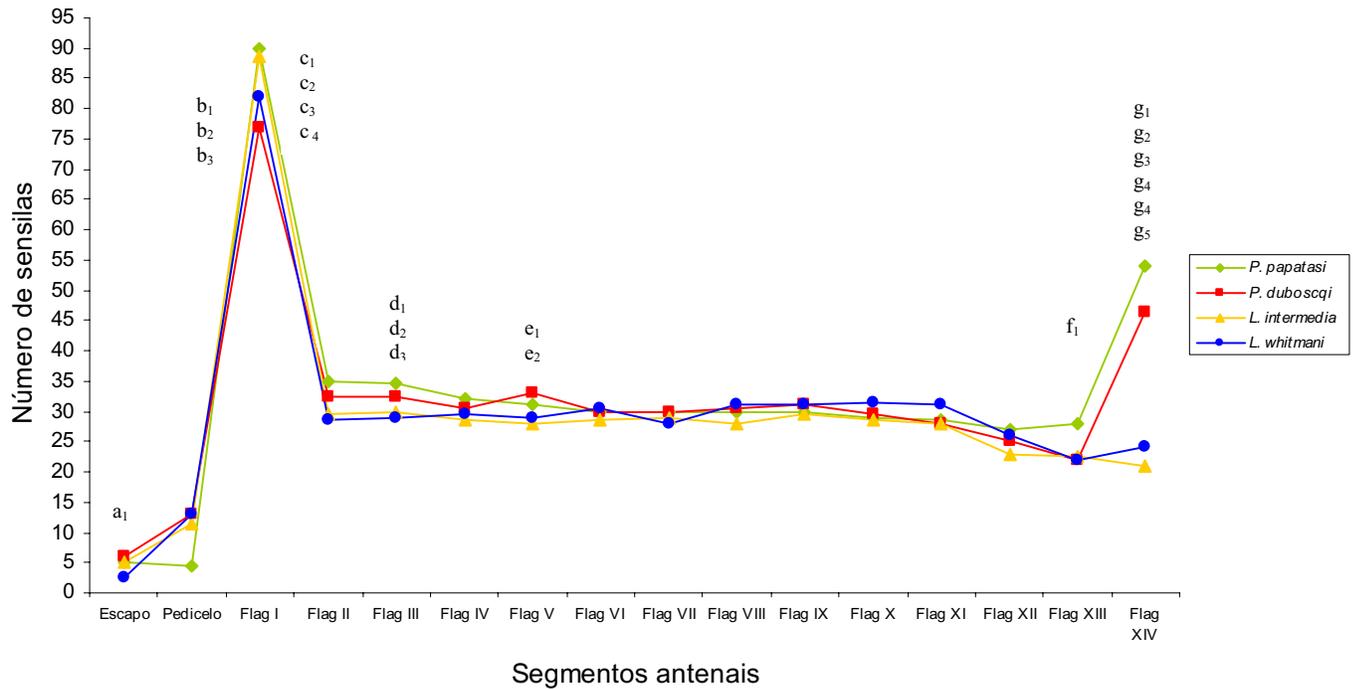
j1 (Pp-Li) - $p < 0,001$; j2 (Pp-Lw) - $p < 0,001$; j3 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; j4 (Li- Pd) - $p < 0,05$;

l1 (Pp-Li) - $p < 0,01$; l2 (Pp-Lw) - $p < 0,05$; l3 (Pp-Pd) - $p < 0,05$;

m1 (Pp-Lw) - $p < 0,001$; m2 (Pp-Pd) - $p < 0,001$; m3 (Lw-Pd)- $p < 0,001$;

n1 (Lw-Pd)- $p < 0,01$.

Quantidade de sensilas nas antenas dos flebotomíneos



Graf. 3: Número total de sensilas por segmento da antena de *L. intermedia* (Li), *L. whitmani* (Lw), *P. duboscqi* (Pd) e *P. papatasi* (Pp). Flag. - Flagelômero.

a₁ (Li-Lw) - p<0,05;

b₁ (Pp-Pd) - p<0,01; b₂ (Li- Pd) - p<0,01; c₃ (Lw-Pd) - p<0,01;

c₁ (Pp-Li) - p<0,001; c₂ (Pp-Lw) - p<0,001; c₃ (Pd-Li) - p<0,01; c₄ (Pd- Lw) - p<0,01;

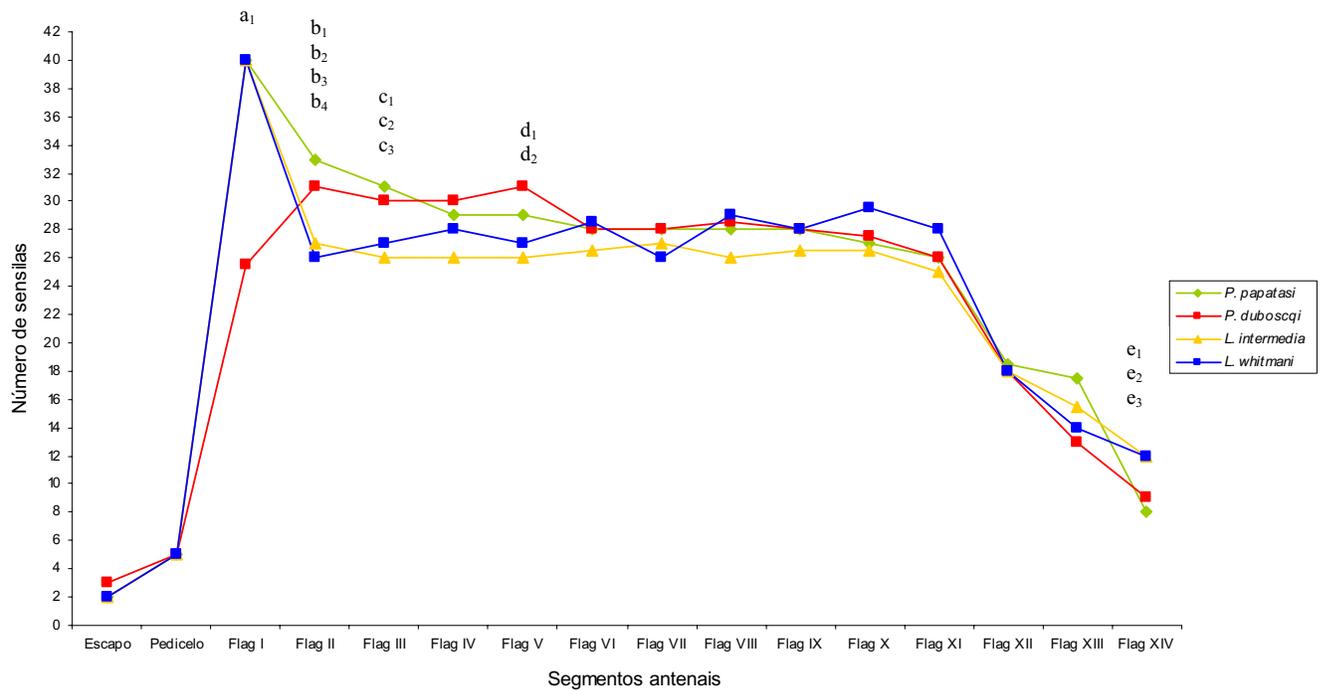
d₁ (Pp-Li) - p<0,05; d₂ (Pp-Lw) - p<0,01; d₃ (Lw-Pd) - p<0,05;

e₁ (Pd-Li) - p<0,01; e₂ (Pd-Lw) - p<0,01;

f₁ (Pp-Li) - p<0,05;

g₁ (Pp-Li) - p<0,001; g₂ (Pp-Lw) - p<0,001; g₃ (Pp-Pd) - p<0,001; g₄ (Li-Pd) - p<0,001; g₅ (Lw-Pd) - p<0,001.

Quantidade e distribuição da sensila tricóide de ponta romba



Graf. 4: : Número de sensilas tricóides de ponta romba encontradas nos segmentos das antenas de *L. intermedia* (Li), *L. whitmani* (Lw), *P. duboscqi* (Pd) e *P. papatasi* (Pp). Flag. - Flagelômero.

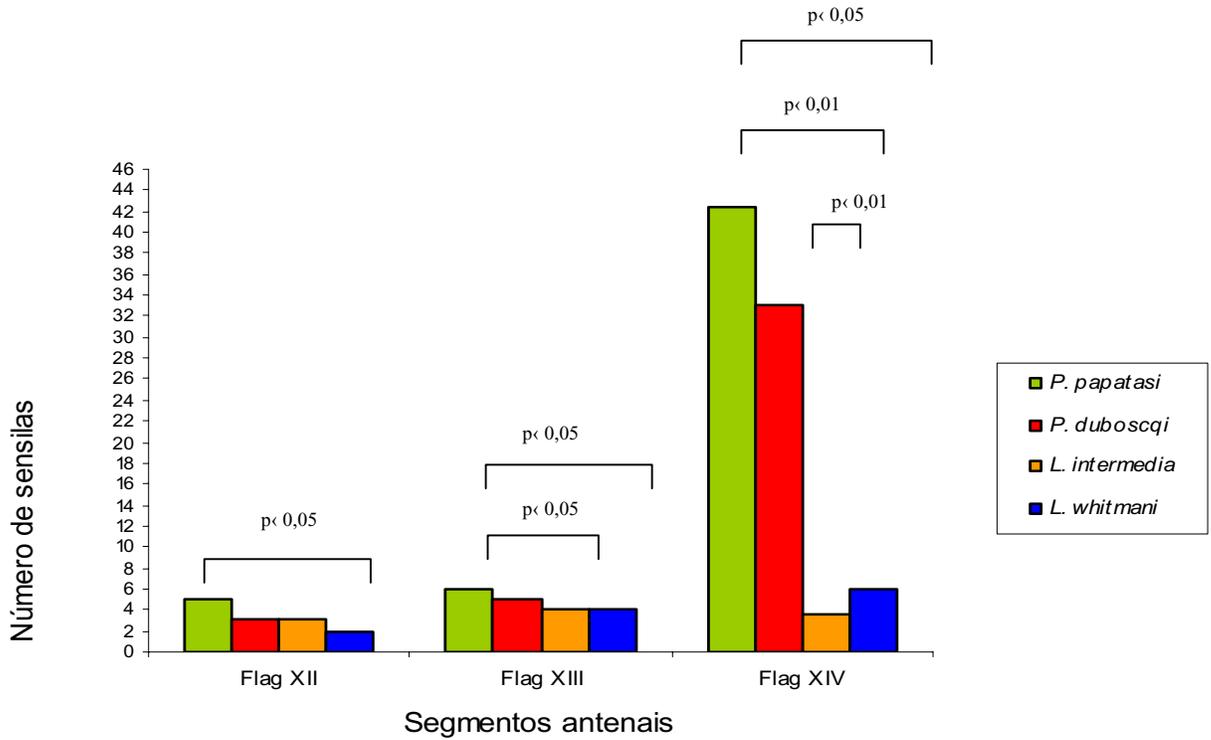
a₁ (Li-Pd) - p<0,01; b₁ (Pp-Li) - p<0,001; b₂ (Pp-Lw) - p<0,001; b₃ (Li- Pd) - p<0,01; b₄ (Lw-Pd) - p<0,01;

c₁ (Pp-Li) - p<0,05; c₂ (Pp-Lw) - p<0,05; c₃ (Lw- Pd) - p<0,05;

d₁ (Li- Pd) - p<0,01; d₂ (Lw-Pd) - p<0,01;

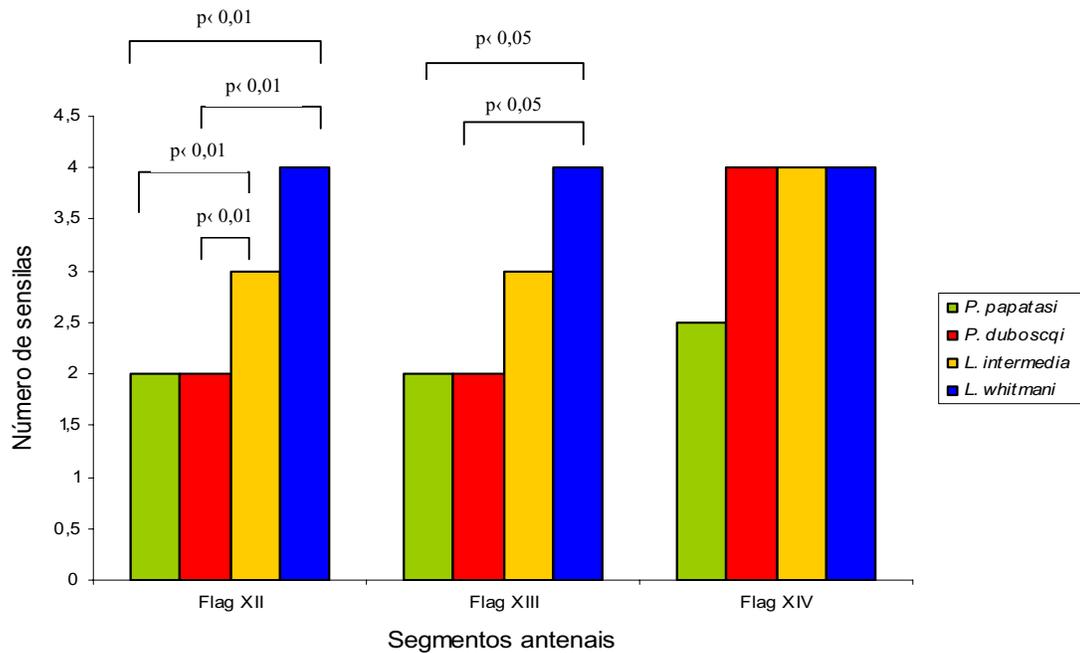
e₁ (Pp-Li) - p<0,05; e₂ (Pp-Lw)- p<0,01; e₃ (Lw-Pd) - p<0,01.

Quantidade e distribuição da sensila tricóide de ponta fina



Graf. 5 Número de sensilas tricóides de ponta fina encontradas nos últimos três segmentos das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*. Flag. - Flagelômero. As sensilas tricóides de ponta fina encontradas nos flagelômeros X e XI de *P. duboscqi* e no XI de *P. papatasi* não foram aqui representadas, pois devido ao seu encontro apenas em poucos exemplares o seu número esteve em torno do zero.

Quantidade e distribuição da sensila celocônica sulcada I



Graf. 6: Número de sensilas celocônicas sulcada I encontradas nos três últimos segmentos das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*. Flag.- Flagelômero. Esta sensila somente está presente nos flagelômeros XII-XIV.

L4. DISCUSSÃO

4.1 Aspectos morfológicos das formas imaturas de *L. intermedia* e *L. whitmani*

Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, este trabalho pode esclarecer em detalhes os aspectos morfológicos das espécies *L. intermedia* e *L. whitmani*, os quais provavelmente não poderiam ser observados com a microscopia óptica. Com essa ferramenta conseguimos encontrar diferenças nas formas imaturas entre as duas espécies estudadas, diferentemente do que foi descrito por Barreto (1941).

O padrão de ornamentação do exócório dos ovos encontrado em *L. intermedia* e *L. whitmani* é o de cristas paralelas não conectadas. Contudo, em algumas regiões dos ovos foram encontradas cristas que se conectavam entre si. Foram também visualizados pequenos tubérculos entre estas cristas, semelhante à descrição de Almeida et al. (2004) em *L. intermedia*. Diferentemente, Barreto (1941) descreveu um padrão de ornamentação de cristas paralelas conectadas para *L. intermedia* e *L. whitmani*, porém utilizando a microscopia óptica. Foi também possível observar a constituição das cristas formadas por fileiras de estruturas palisádicas individuais que se projetam do tegumento do ovo. Diferentemente, os ovos de *L. longipalpis* apresentaram cristas não conectadas formadas por linhas de estruturas palisádicas duplas sem tubérculos entre elas (Secundino & Pimenta 1999).

Através da utilização continuada do MEV a partir da década de 70, alguns autores passaram a especular que os padrões de cristas são estruturas adaptativas que facilitam a postura de ovos em distintos ambientes (Ward & Ready 1975, Enrique Perez & Ogasaku 1997). No nosso estudo, não foram encontradas diferenças na ornamentação do exócório entre as duas espécies simpátricas. Porém, Rogo e colaboradores (1992) mostraram variações intra-específicas no exócório de *Phlebotomus aculeatus* e *Phlebotomus martini* que co-existiam na mesma região geográfica. Além disso, por exemplo, *Phlebotomus pedifer*, *L. longipalpis* e *Lutzomyia diabolica* possuem o mesmo padrão de cristas do exócório, o de cristas não conectadas (Endris et al. 1987, Rogo et al. 1992, Secundino & Pimenta 1999) mesmo vivendo em regiões geográficas distantes e completamente diferentes. Outra sugestão apresentada por diversos autores através de observações de 23 espécies de flebotomíneos utilizando a microscopia eletrônica de varredura, foi a de que as ornamentações do exócório refletiriam relações filogenéticas entre as espécies (Endris et al. 1987, Feliciangeli et al. 1993, Enrique Perez & Ogasaku 1997, Fausto et al. 2001). Em conclusão, de acordo com os nossos resultados e com a literatura acima mencionada podemos

concluir que as ornamentações do exocório não devem ser utilizadas exclusivamente como ferramenta taxonômica.

A eclosão dos flebotomíneos dos ovos ocorre através de uma fratura na casca do ovo, similarmente a outros Diptera. De acordo com os nossos resultados, as larvas de primeiro estágio de *L. intermedia* e *L. whitmani* provocam uma fratura oblíqua irregular na parede do ovo, pela qual podem ser visualizados a cabeça da larva com o órgão perfurador em seu ápice e os longos filamentos caudais enrolados. A fratura do ovo é provavelmente provocada pela fricção do órgão perfurador contra o endocório; e o escape da larva provavelmente ocorre com o auxílio de movimentos do corpo da larva e dos filamentos caudais. Um mecanismo similar de quebra e de escape foi descrito em *L. longipalpis* (Leite & Williams 1997, Secundino & Pimenta 1999) que mostrou os ovos obliquamente fraturados. Nos flebotomíneos podemos supor que não há uma área preferencial para a quebra do ovo como nos mosquitos, nos quais a fratura é sempre transversal e localizada na região anterior do ovo (Rodriguez et al. 1992, Pereira et al. 2005).

Através do MEV visualizamos detalhes da estrutura do órgão perfurador. Esse órgão é apenas encontrado nas larvas de primeira fase, sendo perdido após a muda para as larvas L₂. Esta estrutura tem sido utilizada como ferramenta taxonômica para diferenciar as larvas L₁ das L₂ nos mosquitos e simulídeos (Breland 1959, Alvan-Aguilar & Hamada 2003).

O órgão perfurador, similar em ambas as espécies, apresentou uma formação cuticular de aspecto piramidal com base arredondada e foi localizado no dorso da cabeça das larvas L₁. Leite et al. (1997) e Secundino & Pimenta (1999) observaram um órgão perfurador similar em *L. longipalpis*. Distintamente, os órgãos perfuradores das larvas L₁ dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles albimanus* possuem um formato de cone que termina em uma ponta muito fina. O órgão perfurador de *A. albimanus*, distintamente dos demais, é capaz de se contrair e expandir, sendo exposto na cabeça da larva somente durante o escape do ovo (Rodriguez et al. 1992, Pereira et al. 2005). Portanto, parece que a estrutura do órgão perfurador pode diferenciar gênero, mas não espécies, pelo menos para flebotomíneos.

As larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani* exibiram poucas diferenças entre si e apresentaram aspectos similares aos descritos nos flebotomíneos *Phlebotomus bahiensis* e *L. longipalpis* (Sherlock & Carneiro 1963, Secundino & Pimenta 1999). As larvas dos flebotomíneos estudados são semelhantes em diversos aspectos, tais como: formato filiforme e divisão do corpo em doze segmentos (3 torácicos e 9 abdominais); cabeça arredondada e bem definida acima dos segmentos torácicos, aparelho bucal do tipo mastigador; pseudopernas localizadas somente nos segmentos abdominais; espinhos por todo corpo com exceção do lóbulo

anal, aparelho bucal e base da cabeça; um par de filamentos caudais nas larvas L₁ e dois pares nas demais.

Uma característica importante que possibilitou distinguir as duas espécies foi encontrada no lóbulo anal, o qual é completamente diferente nas duas espécies. O lóbulo anal de *L. intermedia* apresentou-se muito maior e com um aspecto menos enrugado do que o de *L. whitmani*. Essa característica pode ser uma ferramenta taxonômica para ajudar a identificar e separar estas espécies simpátricas.

Um aspecto comum às duas espécies foi a modificação da morfologia das antenas, sendo lobular em L₁ e digitiforme nas demais fases. Com estes resultados, podemos inferir que as antenas mudam de forma após a muda das larvas L₁ para a L₂ continuando com o mesmo formato até o último estágio de larva (L₄). Estas observações contrastam com Barreto (1941) que descreveu antenas do tipo digitiforme em todas as fases larvais de *L. intermedia* e *L. whitmani*. Pessoa et al. (2001) descreveram o mesmo padrão que observamos nas antenas das larvas de quarto estágio em ambas as espécies. A modificação do aspecto da antena que ocorre da L₁ para a L₂ e permanece até a última fase larval somente pode ser observada e caracterizada pelo fato de termos estudado todas as fases larvais, distintamente dos outros autores.

A morfologia das antenas, a quantidade de filamentos caudais e a presença ou ausência de órgão perfurador são características que poderão ser utilizadas na taxonomia para diferenciar as larvas L₁ das demais fases. O fato de tantas mudanças nas estruturas entre L₁ e L₂ pode ser reflexo de uma delicada e importante fase de desenvolvimento das larvas de flebotomíneos.

Em resumo, as espécies *L. intermedia* e *L. whitmani* são em geral similares, mas podem ser distinguidas na sua microanatomia. A maior parte das similaridades encontradas entre as duas espécies pode ser devido ao fato destas espécies compartilharem um ancestral comum recente como demonstrado por Mazzoni et al. (2002); ou destas ocorrerem simpatricamente, adaptando-se ao longo do tempo às condições ambientais muito semelhantes.

4.2 Aspectos morfológicos dos órgãos sensoriais

Foram estudadas e analisadas comparativamente as sensilas das larvas de *L. intermedia*, de *L. whitmani* e as sensilas das antenas das fêmeas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi*.

A função dos órgãos sensoriais foi inferida a partir da morfologia cuticular do órgão e da presença de poros, correlacionando-o com outras sensilas de insetos descritas na literatura. De

acordo com Altner et al. (1977) e Schaller (1982) existe uma correlação entre a morfologia e a fisiologia de tipos de células sensoriais.

Observamos visualmente um número relativamente menor de sensilas nas larvas quando comparado com os insetos adultos. Somente nas antenas das fêmeas de flebotomíneos estudados foram encontradas cerca de 620 a 710 sensilas. Segundo Barreto (1941), as larvas de flebotomíneos possuem cerca de 160 a 210 sensilas em toda a sua extensão. Esses resultados estão de acordo com as observações de Zacharuk (1985) que revisou trabalho de vários autores e encontrou um grande aumento no número de sensilas durante a diferenciação para o estágio adulto de insetos, sendo devido em parte a pêlos (sensilas tricóides) e a ganchos olfatórios (sensilas basicônicas). Esse aumento do número de sensilas demonstra uma necessidade de sensorial dos adultos que provavelmente está relacionada à reprodução e à dispersão proporcionada pelo vôo. No nosso estudo, não foi observado nenhum subtipo de sensila em comum entre a fase larvar e o inseto adulto. Segundo Hallberg & Hansson (1999), órgãos sensoriais das larvas e dos insetos adultos são sempre diferentes em termos de número de células, organização e função, refletindo os diferentes estilos de vida dos dois estágios.

As sensilas tricóides predominaram em relação a todos os outros tipos tanto nas larvas quanto nas antenas das fêmeas dos flebotomíneos estudados. Para Zacharuk (1985), quase todas as sensilas que são encontradas por todas as partes do tegumento dos insetos são sensilas tricóides de vários tamanhos e formas, além dos órgãos campaniformes que possuem distribuições mais ou menos regulares e em padrões bilaterais.

4.2.1 Órgãos sensoriais das larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani*

Nas larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani* foram observados seis tipos de sensilas tricóides distribuídas ao longo do corpo. Nos flebotomíneos algumas destas estruturas como as sensilas tricóides do tipo escova e a longa multiporo nunca haviam sido descritas como sendo órgãos sensoriais, mas simplesmente como apêndices, sendo denominadas como cerdas e filamentos por diversos autores (Barreto 1941, Sherlock & Carneiro 1963, Leite & William 1996 e 1997, Secundino & Pimenta 1999).

As sensilas tricóides longas e curvas com diferentes graus de curvatura (aspecto morfológico) foram observadas em cada lado das estruturas locomotoras, as pseudopernas. Esta sensila pode ser uma característica particular destas duas espécies, pois não foram observadas em *L. longipalpis* (Leite & William 1996 e 1997, Secundino & Pimenta 1999) e no *Phlebotomus*

bahiensis (Sherlock & Carneiro 1963). Baseado neste fato pode-se supor que esta sensila deve ser uma estrutura importante para a adaptação de *L. intermedia* e *L. whitmani* aos microambientes em que habitam, provavelmente devido à simpatria em destas espécies. Além dessa consideração, outra característica peculiar destas espécies são as sensilas tricóides pequenas e sensilas tricóides longas ao redor do lóbulo anal. Esse tipo de sensila não foi descrito em *L. longipalpis* e *P. bahiensis* (Sherlock & Carneiro 1963, Leite & William 1996 e 1997, Secundino & Pimenta 1999).

Foram observadas as sensilas tricóides pequenas e tricóides longas apresentando-se algumas vezes retas e outras curvas. Este fato foi também observado por Fernandes & Linardi (2002) no segmento II do aparelho bucal da mosca *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae). Sensilas mecanoreceptoras análogas a estas, também foram encontradas nos palpos maxilares de *Drosophila melanogaster* por Riesgo-Escovar et al. (1997). A sensila tricóide do tipo escova, devido à localização bilateral em todos os segmentos do corpo da larva, pode ser uma importante estrutura no fornecimento de informações mecânicas relacionadas com a orientação espacial. A sensila tricóide do tipo escova, as tricóides longas e curvas encontradas nas pseudopernas e as tricóides pequenas e as longas observadas ao redor do lóbulo anal parecem ter estrutura cuticular características de sensilas mecanoreceptoras (Keil 1997b).

Algumas sensilas tricóides pequenas, devido à sua localização no aparelho bucal e bem perto das peças bucais, podem ter a função de quimiorrecepção por contato (gustação), podendo desta forma ser importantes na identificação do alimento. A procura do alimento para as larvas é muito importante, visto que estas são vorazes e só param de procurar comida e de se alimentar durante as fases de muda e na fase pupal.

Além dessas sensilas tricóides, foram também descritos mais dois tipos de sensilas inseridas nas antenas das larvas: a basicônica clavada e a celocônica (romba e a clavada multiporo). Foram identificados poros na parede da sensila celocônica clavada nas antenas das larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani*. Portanto, esta sensila passou a ser denominada como celocônica clavada multiporo. Sensilas olfatórias com dilatação apical semelhante a um bulbo e com poros na parede tem sido encontradas nas antenas de *Trichogramma galloi* e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), nos palpos maxilares de *Culicoides hollensis* e *Culicoides melleus* (Diptera: Ceratopogonidae), na antena da mosca *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) (Cônsoi et al. 1999, Kline & Axtell 1999, Fernandes et al. 2004, respectivamente). Spiegel et al. (2005) revelaram uma sensila nos palpos maxilares dos adultos de *L. longipalpis*, semelhante a que encontramos na antena das larvas de *L. intermedia* e *L.*

whitmani. Esses autores também revelaram através do MEV a presença de poros na superfície desta sensila, os quais sugerem uma função quimiorreceptora.

Foi também encontrada outra sensila com poros na sua superfície, a sensila tricóide longa multiporo. Esta sensila é conhecida nas larvas de flebotomíneos como filamentos caudais presentes em todas as larvas de flebotomíneos, exceto no *Phlebotomus tobii* (Killick-Kendrick et al. 1989). Nas espécies estudadas foram observadas diferenças no padrão de poros. O *L. intermedia* apresentou os poros dos filamentos caudais dispostos em sulcos e em *L. intermedia* os poros encontraram-se arranjados homogeneamente na superfície da sensila sem a presença de sulcos. Poros nestas sensilas já tinham sido descritos por Pessoa et al. (2001) em *L. intermedia*, *L. whitmani*, *Lutzomyia lenti*, *L. longipalpis* e *Lutzomyia evandroi*. Contudo, esses autores não descreveram nenhuma diferença entre o padrão de poros das duas primeiras espécies, como demonstrado neste trabalho.

O encontro de uma sensila olfatória (sensila celocônica clavada multiporo) na antena das larvas de flebotomíneos é coerente com o sugerido por Zacharuk (1985). Segundo o autor, antenas que tem como característica um flagelo muito reduzido, como nas formas larvais, possuem seus receptores com função de quimio-, termo- e higrorrecepção. As sensilas quimiorreceptoras encontradas nas larvas devem ser importantes para o encontro de comida e para responder a feromônios de agregação liberados por outros indivíduos.

No presente estudo foram então encontradas uma maioria de sensilas com aparente função mecanorreceptora (sensilas tricóides), uma com possível função gustativa (sensilas tricóides pequenas) e duas sensilas com funções quimiorreceptoras demonstradas, a sensila celocônica clavada multiporo e a sensilas tricóides longas multiporo. Estes achados e as interpretações corroboram os dados encontrados nas larvas de *Toxorhynchites brevipalpis* (McIver 1982), as quais apresentavam cerca de 85% dos neurônios associados principalmente com as cerdas corporais sensíveis a pistas mecânicas, e os 15% restantes associados a quimiorreceptores restritos às antenas, aparelho bucal e faringe.

4.2.2 Morfologia e órgãos sensoriais das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi*

4.2.2.1 Aspectos gerais das antenas

Encontramos em *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi* um par de antenas filiformes, formadas por um escapo triangular, um pedicelo globular e 14 flagelômeros filiformes. Aspectos similares foram descritos por Ilango (2000) no *Phlebotomus argentipes*. Em contraste, Zayed et al. (2002) descreveram a antena de *P. papatasi* e *P. bergeroti* com um escapo, pedicelo e 13 flagelômeros. Estas diferenças encontradas entre os dois trabalhos podem ser devido à utilização de diferentes populações de *P. papatasi*, sendo o do presente estudo da Turquia e o de Zayed et al. (2002) do Egito. É provável que estas populações de *P. papatasi* do Egito e Senegal acumularam diferenças particulares por diferentes pressões seletivas sofridas nos diferentes habitats devido ao isolamento geográfico.

Todos os segmentos antenais das espécies de flebotomíneos estudadas apresentaram-se cobertas por pêlos (tricomias, espinhos) considerados não inervados chamados microtríquias, sendo estas as pilosidades mais abundantes que recobrem as antenas. Esses resultados corroboram com o descrito em diferentes espécies de Cyclorrafá (Shanbhag et al. 1999, Fernandes et al. 2002, 2004).

4.2.2.2 Dimensão das antenas e da sensila caética

Foram encontradas poucas diferenças nas dimensões das antenas nas espécies estudadas, sendo a de *P. papatasi* a de menor tamanho seguida por *L. whitmani*, por *P. duboscqi*; e por fim a de *L. intermedia* com o maior tamanho.

No nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas nas dimensões do flagelômero I entre as espécies estudadas, apesar do comprimento do flagelômero I ser um caráter utilizado para diferenciação de espécies (Galati 2003). Porém, diferenças nas dimensões foram encontradas em outros flagelômeros das antenas entre as espécies incluídas no estudo, inclusive diferenças que separam os gêneros em estudo. Encontramos também variações nas dimensões dos flagelômeros das antenas em cada espécie de flebotomíneo. Esse achado concorda com Zacharuk (1985) que cita grandes variações nos flagelômeros, principalmente no comprimento, indo desde pequenos flagelômeros até grandes com subdivisões formando sub-segmentos. No presente

estudo, subdivisões delimitando regiões na base do flagelômeros foram encontradas em *P. duboscqi*. Contudo em todas as outras espécies somente foram encontradas subdivisões ocasionais dos flagelômeros.

Diferenças marcantes foram encontradas na dimensão das sensilas caéticas. Estas sensilas possuem tamanhos diferentes entre as espécies estudadas, exceto quando se compara os flagelômeros I ao XI nas espécies *L. intermedia* e *L. whitmani*. Diferenças marcantes na dimensão foram detectadas entre as duas espécies de *Phlebotomus*, sendo este um caráter importante para diferenciar estas espécies crípticas, inclusive podendo ser utilizado como ferramenta taxonômica. Variações também ocorreram entre o tamanho destas sensilas nos diferentes flagelômeros das antenas de todas as espécies. A grande variação observada na espécie *L. whitmani* é devido à diminuição drástica do comprimento das sensilas caéticas a partir do flagelômero XII. Além disso, a espécie *L. intermedia* não apresentou esta sensila a partir do XII flagelômero. Essas características são importantes e também poderão ser utilizadas como caracteres taxonômicos destas espécies. Estas observações concordam com as descrições de Rispaill & Léger (1998). Para Galati (2003), as sensilas caéticas (ascóides em flebotomíneos) podem variar muito em comprimento e este caráter pode ser uma característica importante para a taxonomia dos mesmos.

4.2.2.3 Tipos de sensilas

Nas antenas das quatro espécies de flebotomíneos estudados foram encontrados três tipos de sensilas tricóides, três tipos de celocônicas sulcadas, um de campaniforme, um de caética e um de basicônica. As sensilas basicônicas foram encontradas somente no subgênero *Phlebotomus*.

Ilango (2000) realizou um estudo morfológico das sensilas das antenas de *Phlebotomus argentipes* e descreveu para esta espécie as sensilas tricóide, celocônica, caética, basicônica e “auriculicium”. Zayed et al. (2002) analisaram as sensilas de *P. papatasi* e *P. bergeroti* descrevendo as seguintes sensilas: tricóide, celocônica, caética, basicônica, campaniforme, escamiforme, “bohm” e “falcate”. Encontramos no nosso trabalho sensilas semelhantes em *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*, porém algumas sensilas não foram encontradas, tais como as sensilas “bohm”, “falcate” e a “auriculicium”. Essa diferença tanto entre diferentes gêneros, quanto dentro do mesmo gênero e da mesma espécie (*P. papatasi*) pode ser devido a diferenças inter e intra-específicas ou a diferentes sistemas de classificação utilizados. Segundo Zacharuk (1985) é muito difícil caracterizar as sensilas dentro das categorias propostas

atualmente, apesar de todas as terminologias disponíveis; e, portanto, a tendência é nomear sensilas que fogem dos padrões sugeridos criando-se novos tipos. Outra explicação plausível para a diferença encontrada em *P. papatasi* seria o estudo de diferentes populações dessa espécie visto que no presente trabalho foram estudadas as sensilas de *P. papatasi* da Turquia e no estudo de Zayed et al. (2002) *P. papatasi* do Egito como abordado anteriormente.

No presente estudo foram encontrados três diferentes sub-tipos de sensilas tricóides nas antenas de todas as espécies estudadas: tricóide pequena, de ponta fina e de ponta romba. Este tipo de sensila foi o mais abundante e diverso, sendo a única distribuída em todos os segmentos das antenas. As sensilas tricóides de ponta fina foram observadas a partir do flagelômero X. Pophof et al. (2005) testaram a resposta de uma sensila tricóide nas fêmeas de mariposas *Cactoblastis cactorum* (também similares a tricóide de ponta fina dos flebotomíneos aqui estudados) a diferentes voláteis e revelaram que estas sensilas respondiam a certos terpenos. Spiegel et al. (2005) utilizando o método de coloração pela prata em *L. longipalpis* mostraram que as sensilas tricóides das labelas eram quimiorreceptoras de contato (gustatórias) e que as sensilas tricóides dos palpos eram olfatórias. Todavia, as sensilas tricóides de ponta romba e a pequena de ponta afiada encontradas em nosso estudo possuem um encaixe flexível que é característico de mecanosensilas. Além disso, as sensilas tricóides pequenas de ponta afiada encontram-se localizadas na base do escapo e pedicelo em todas as espécies e na base do flagelômero I em *L. whitmani* e *L. intermedia*. A proximidade destas sensilas com as junções dos segmentos sugere a função de propriocepção. Esses dados são semelhantes aos descritos por Zacharuk (1985) e Spänhoff et al. (2003) que mostraram escapos e pedicelos suportando principalmente mecanosensilas, como exteroceptores e proprioceptores nos insetos em geral.

As sensilas escamiformes são pêlos com formato de escama que foram observados no pedicelo e no flagelômero I de todas as espécies analisadas. Essas estruturas foram consideradas em nosso estudo como sendo sensilas de acordo com sua estrutura cuticular e utilizando o sistema de classificação descrito por Zacharuk (1985), o qual define as sensilas escamiformes como sendo pêlos tricóides semelhantes a escamas e que possuem um ou mais neurônios. Spiegel et al. (2005) descreveram uma estrutura similar nos palpos de *L. longipalpis*, porém como estruturas não inervadas. Estudos complementares da ultra-estrutura desta sensila devem ser realizados através da procura de células sensoriais para confirmar que estas estruturas sejam realmente sensilas.

As sensilas campaniformes foram observadas em todas as espécies localizadas perto da articulação do pedicelo e do flagelômero I, sendo provavelmente importantes na detecção de

movimentos da antena (propriocepção). Spiegel et al. (2005) também encontraram sensilas campaniformes na junção dos palpos maxilares de *L. longipalpis*. Além disso, um estudo de revisão realizado por Keil (1997b) mostra que estas sensilas são encontradas em diferentes articulações, sendo importantes na percepção de estresse cuticular. Portanto, podemos inferir que essa sensila deve ter a função de propriocepção.

Nas antenas de todas as espécies analisadas foi encontrado um pequeno número de sensilas celocônicas, sendo encontrada uma única nos três primeiros flagelômeros e de duas a quatro nos três últimos flagelômeros. Esse dado está de acordo com Chapman (1998) que descreveu que nos insetos as sensilas celocônicas aparecem em pequeno número, ocorrendo principalmente em grupos nos segmentos terminais ou em número de uma a duas nos primeiros flagelômeros. Em nossos estudos observamos um tipo desta sensila: a sulcada, a qual foi subdividida em I, II e “mãos em prece”. Encontrou-se em todas as espécies a celocônica sulcada com microtríquias livres que denominamos de I. Porém outro tipo, a celocônica II com microtríquias unidas na base até a região mediano-distal, foi encontrada apenas no gênero *Lutzomyia*. Em *L. whitmani* esta sensila só esteve presente apenas em poucos exemplares e quando a sensila sulcada “mãos em prece” não era encontrada, podendo esta característica ser devido a uma variabilidade fenotípica de alguns espécimes. Pophof et al. (2005) descreveram uma sensila celocônica na mariposa *Cactoblatis cactorum* semelhante em sua ultra-estrutura a sensila celocônica sulcada I encontrada nas antenas dos flebotomíneos aqui estudados. Neste trabalho, os autores demonstraram a resposta destas sensilas a odores como aldeídos alifáticos e a ácidos. Em baratas (*Periplaneta americana*) foi mostrada uma sensila celocônica (sem estrutura protetora visível), semelhante morfológicamente com as sensilas celocônicas vislumbradas nas sulcadas I e II, a qual respondia a ácidos graxos e a mudanças de temperatura e umidade (Altner et al. 1977).

Com exceção da espécie *L. intermedia*, todas as demais espécies estudadas apresentaram um novo sub-tipo de sensila celocônica, a sensila celocônica sulcada “mãos em prece”. Essa sensila foi recentemente descrita nos flagelômeros I a III de fêmeas e machos de *L. longipalpis* (Fernandes comunicação pessoal, Fernandes et al. artigo em preparação). Esta sensila possui sulcos em sua superfície que devem ser expostas, através da abertura da estrutura cuticular protetora em formato de duas mãos unidas, quando provavelmente esta sensila é submetida a estímulos apropriados.

Os sulcos das sensilas celocônicas são considerados por apresentar poros microscópicos (Shields & Hildebrand 2001). Portanto, inferimos que as sensilas celocônicas com estas

características, as quais foram encontradas nas diferentes espécies de flebotomíneos estudadas, são sensilas quimiorreceptoras com função olfatória. Contudo, não podemos descartar a termo e higrorrecepção que são funções descritas para muitas sensilas celocônicas encontradas em vários insetos, como por exemplo foi mostrado em baratas por (Altner et al. 1977).

As sensilas caéticas, conhecidas nos flebotomíneos como ascóides, apresentaram-se em todas as espécies como pêlos longos e robustos. Uma variação desta sensila (sensila caética com base bifurcada) foi observada em um único espécime de *L. intermedia*. Spiegel et al. (2005) também observaram uma sensila capitada com base bifurcada nos palpos maxilares de *L. longipalpis*. Essa variação de caráter pode ter ocorrido devido por uma variação do padrão gerada por exemplo por uma modificação apenas no fenótipo do indivíduo, por uma mutação em genes ou também devido a um reaparecimento de características ancestrais (atavismo). Em todas as espécies estudadas, essa sensila mostrou-se coberta por poros, porém um padrão diferente de poros foi observado entre os diferentes gêneros estudados, sendo estes dispostos em sulcos paralelos no gênero *Phlebotomus* e dispostos homogeneamente sob a superfície no *Lutzomyia*. O encontro de poros na superfície desta sensila sugere uma função de quimiorrecepção a distâncias (olfação). É considerado que a ausência de poros na cutícula sensorial impede a quimiorrecepção, um único poro limita a quimiorrecepção ao contato, e muitos poros possibilitam a olfação (Zacharuk 1985). Dougherty et al. (1995) demonstraram que as sensilas caéticas de *L. longipalpis* respondem a extratos de feromônios e a odores de fezes de coelho e de galinha; e que estes dois últimos odores provocam uma resposta de oviposição nas fêmeas grávidas. Além disso, esses autores observaram também uma resposta destas mesmas sensilas a terpenos voláteis, os quais são moléculas liberadas por plantas. Dougherty et al. (1999) mostraram também que as sensilas caéticas de *L. longipalpis* respondem a odores das glândulas anais e caudais de raposa. Merivee et al. (2004) mostraram uma resposta das sensilas caéticas de *Pterostichus aethiops* a nove diferentes tipos de sais, provavelmente possuindo função quimiorreceptora de contato, podendo perceber variações no teor de sais do meio ou na mudança de pH deste. Contudo, de acordo com os resultados do padrão de poros encontrados no nosso estudo e nos trabalhos com o flebotomíneo *L. longipalpis*, as sensilas caéticas podem ser importantes na percepção de odores pelos flebotomíneos oriundos de hospedeiros vertebrados e de plantas, necessários para o direcionamento do inseto até as suas fontes de alimentação (sanguínea e de carboidratos). Considerando estas propriedades, podemos especular que a maior dimensão desta sensila foi encontrada em *P. duboscqi* e pode estar influenciando e aumentando a eficiência desta espécie na localização das suas fontes alimentares.

Sensila basicônicas foram encontradas por nós como característica do gênero *Phlebotomus*, estando ausentes em *Lutzomyia*. Estas sensilas mostraram-se como pêlos pequenos similares a um cone. Aspectos morfológicos similares foram revelados em moscas e gafanhotos (Ochieng et al. 1998, Fernandes et al. 2004). Onchieng et al. (1998) observaram ultra-estruturalmente as sensilas basicônicas no gafanhoto *Schistocerca gregaria*, e as descreveram com parede de poros e com vários dendritos ramificados, característica típica de receptores olfatórios. Fernandes et al. (2004) observaram parede de poros na sensila basicônica na mosca *Cochliomyia hominivorax*, os quais permitem o acesso de substâncias voláteis sendo esta sensila considerada quimiorreceptora.

Poucas variações ocorreram nos tipos e subtipos de sensilas encontrados nas antenas desses quatro importantes vetores de leishmaniose cutânea. Foi encontrada pelo menos uma sensila com localização particular em cada espécie estudada, exceto em *L. whitmani*, como se segue: a) A espécie que mais apresentou singularidades foi *L. intermedia* seguida de *P. papatasi*. O *L. intermedia* foi o único que apresentou a sensila celocônica sulcada I no ápice do seu flagelômero I. Porém, estiveram ausentes as sensilas celocônicas sulcadas “mãos em prece” nos flagelômeros I a III e as sensilas caéticas nos flagelômeros XII e XIII. b) Somente em *P. papatasi* foram encontrados as sensilas celocônicas “mãos em prece” no flagelômero I, todavia, as sensilas tricóides pequenas de ponta romba foram ausentes no flagelômero XI. c) Em *P. duboscqi* foi encontrada a sensila tricóide de ponta fina no flagelômero X.

Além dessas diferenças particulares encontradas separando as espécies, foram encontradas diferenças importantes distinguindo os gêneros de flebotomíneos. Por exemplo, a sensila celocônica sulcada II e a tricóide pequena de ponta afiada no flagelômero I somente foram encontradas no gênero *Lutzomyia*. Porém, as sensilas basicônicas no flagelômero I e a tricóide de ponta fina somente foram encontradas no flagelômeros XI do gênero *Phlebotomus*. Apesar de poucas variações ocorrerem nos tipos e subtipos de sensilas entre as espécies estudadas, diferenças foram observadas na quantidade e localização dos diferentes tipos e subtipos de sensilas nos segmentos antenais. Resultados similares foram encontrados por Catalá (1997) comparando as sensilas das antenas de cinco gêneros de triatomíneos e por Gracco & Catalá (2000) estudando quatro espécies pertencentes a dois gêneros da família Triatominae, *Triatoma sordida*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius prolixus*. Essa conservação de tipos de órgãos sensoriais entre os dois gêneros estudados, os quais habitam diferentes áreas geográficas sendo submetidos a diferentes pressões seletivas, refletem a importância desses órgãos nas fêmeas de flebotomíneos. Adaptações associadas à exploração de diferentes habitats e

hospedeiros culminando na modificação do padrão ancestral, poderiam explicar essas diferenças em abundância e distribuição de sensilas.

4.2.2.4 Número de sensilas

Em geral, a maior diversidade e quantidade de sensilas foi encontrada principalmente no primeiro e no último flagelômeros. A maior variedade de tipos de sensilas ocorreu nos flagelômeros e estas tendem a serem mais numerosas nas porções mais distais, como foi revisado por Zacharuk (1985) em vários insetos.

Os resultados da contagem das sensilas das antenas dos flebotomíneos revelaram variações significativas entre os dois gêneros e diferentes espécies. Este tipo de estudo tem sido amplamente utilizado em insetos como ferramenta taxonômica (Chapman 2002; Catalá & Schofield 1994, Catalá 1997, Gracco & Catalá 2000).

Foram demonstradas variações significativamente maiores no número de sensilas nos quatro flagelômeros (II, III, V e XIV) das espécies do gênero *Phlebotomus* quando comparado ao *Lutzomyia*. O flagelômero que apresentou um número mais significativo de sensilas foi o último. Este fato pode estar associado ao maior tamanho do último flagelômero nas espécies do gênero *Phlebotomus*. De acordo com Chapman (1998), o maior número de quimiorreceptores pode estar relacionado com o comprimento da antena. Porém, verificamos que a variação no comprimento não está relacionada com o aumento abrupto no número de sensilas no último flagelômero do gênero *Phlebotomus*. A nossa análise também demonstrou que esta diferença foi relacionada a um tipo específico de sensila, a sensila tricóide de ponta fina, a qual é cerca de 8 a 10 vezes mais numerosa no último flagelômero de *Phlebotomus* que no de *Lutzomyia*. Esta diferença poderia ser explicada por uma modificação no padrão ancestral durante o curso da evolução, tanto por diminuição no número desta sensila em *Lutzomyia* quanto por um aumento em *Phlebotomus*, os quais poderiam ser determinados por diferentes pressões seletivas impostas pelo ambiente e pela adaptação destas espécies a estas pressões. Esse maior número de sensilas poderia refletir um comportamento diferente nas espécies de *Phlebotomus* como, por exemplo, pode influenciar na localização e preferência de hospedeiros.

Poros foram observados em uma sensila inserida na antena e nos filamentos caudais de larvas de *L. intermedia* e de *L. whitmani*, como também nas sensilas caéticas encontradas nas antenas de *L. intermedia* e *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi*. Além destas sensilas, nas antenas das fêmeas dos flebotomíneos estudados foram também observados sulcos nas sensilas

celocônicas que sustentam poros microscópicos. A presença de poros na parede destas sensilas indicam a função quimiorrecepção. A quimiorrecepção é uma modalidade muito importante não só para os estágios adultos como também para os estágios imaturos de insetos. A importância dessa modalidade para os flebotomíneos pode estar correlacionada com o seu estilo de vida, com a necessidade de encontrar alimento, uma fonte de carboidrato, um hospedeiro no qual conseguirá o alimento sanguíneo necessário para a produção dos seus ovos; na percepção de feromônios para comunicação intra-específica, para o encontro de um parceiro potencial; e finalmente no encontro de um sítio de oviposição adequado. Estudos subsequentes podem revelar a quimiorrecepção em outras sensilas descritas neste trabalho, como por exemplo, as sensilas basicônicas, e alguns tipos de sensilas tricóides, como a de ponta fina citadas por outros autores. Segundo Zayed et al. (2002), em *P. papatasi* e *P. bergeroti*, além da sensila caética, a basicônica e a tricóide devem ter um papel importante na procura do seu hospedeiro através da olfação.

Variações encontradas nas dimensões dos segmentos antenais e na sensila caética, nos tipos e nos números de órgãos sensoriais entre as espécies estudadas podem ser importantes e utilizadas como características taxonômicas para separar os gêneros, assim como para separar as espécies simpátricas (*L. intermedia* e *L. whitmani*) e as espécies crípticas (*P. papatasi* e *P. duboscqi*).

Este estudo morfológico poderá estabelecer bases fundamentais para considerações taxonômicas posteriores de importantes vetores. Estudos morfológicos com esses insetos são muito relevantes e, devem continuar a serem executados para que se possa entender cada vez mais sobre esses organismos, seu comportamento, fisiologia, habilidades e adaptações a diferentes ambientes, principalmente, os que os tornam aptos a sobreviverem em ambientes altamente modificados e antropofílicos.

Os resultados obtidos para as sensilas dos flebotomíneos estudados revelam que as larvas e os insetos adultos são equipados de órgãos sensoriais. Este estudo poderá auxiliar no direcionamento adequado dos trabalhos de eletrofisiologia que são importantes para corroborar e/ou auxiliar na identificação das funções das sensilas. Podendo então, ser utilizado como começo para mapeamento das sensilas potenciais para serem utilizadas num controle biológico com semioquímicos, além de poder estabelecer bases para serem utilizadas posteriormente na taxonomia desses importantes vetores.

5. CONCLUSÕES

Foi possível observar e caracterizar diversos aspectos microanatômicos dos estágios de desenvolvimento de *L. intermedia* e de *L. whitmani* através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

As formas imaturas de *L. intermedia* e de *L. whitmani* são similares morfológicamente, porém possuem alguns aspectos que as diferenciam, tais como: tamanho das estruturas, morfologia do lóbulo anal e padrão de poros dos filamentos caudais;

Os aspectos morfológicos das antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi* estabeleceram diferenças entre as espécies.

Os três tipos de sensilas presentes nas larvas de *L. intermedia* e *L. whitmani*: basicônica clavada, celocônica (romba e clavada multiporo), tricóide (do tipo escova, do tipo fracamente escova, curva e longa, pequena longa e longa multiporo) foram caracterizadas.

Cinco tipos comuns de sensilas foram caracterizadas nas antenas de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi*: caética, celocônica (sulcada I e II, e “mãos em prece”), tricóide (pequena de ponta romba e de ponta afiada; de ponta fina; de ponta romba), campaniforme e escamiforme. Sensilas basicônicas foram caracteristicamente encontradas no gênero *Phlebotomus*.

Foram encontradas diferenças entre a presença e localização das sensilas nas antenas dos *L. intermedia*, *L. whitmani*, *P. papatasi* e *P. duboscqi*. Estas características poderão ser utilizadas para a separação dos gêneros como também das espécies estudadas.

Parede de poros ou sulcos porosos foram observados em quatro sensilas, duas destas presentes nas larvas (celocônica clavada multiporo e tricóide longa multiporo) e duas nas antenas dos flebotomíneos adultos (caética e celocônica), inferindo a estas a função quimiorreceptora.

Foi possível também supor prováveis funções das sensilas encontradas neste estudo baseado na sua localização e na literatura existente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida DN, da Silva OR, Brazil BG, Soares MJ 2004. Patterns of exochorion ornaments on eggs of seven South American species of *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 41: 819-25.

Altner H 1977. Insektensensillen: Bau- und Funktionsprinzipien. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft. 70: 139-53.

Altner H, Sass H, Altner I 1977. Relationship between structure and function of antennal chemo-, hygro-, and thermoreceptive sensilla in *Periplaneta americana*. Cell Tissue Res. 176: 389-05.

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

Ashford RW 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol. 14: 523-32.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, et al. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg. 44: 536-46.

Barreto M 1941. Morfologia dos ovos, larvas e pupas de alguns flebótomos de São Paulo. Ann Fac Med Univ São Paulo. 17: 357-27.

Beach R, Kiilu G, Hendricks L, Oster C, Leeuwenburg J 1984. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: transmission of *Leishmania major* to man by the bite of a naturally infected *Phlebotomus duboscqi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 78: 747-51.

Brandao-Filho SP, Campbell-Lendrum D, Brito ME, Shaw JJ, Davies CR 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93: 488-94.

Breland OP 1959. The first instar of *Orthopomyia alba* (Beker) and *Orthopomyia singifera* (Coquillett) with comparative notes (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 137-41.

Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Silans LN, Desjeux P 2001. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96: 159-62.

Catalá S, Schofield C 1994. Antennal sensilla of *Rhodnius*. *J Morphol* 21: 193-203.

Catalá SS 1997. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera, Reduviade): a comparative study of five genera. *Int J Insect Morphol Embryol.* 26: 67-63.

Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>>. Acesso em 13 de outubro. 2005.

Chapman RF 1998. *The insects: Structure and function.* 4th ed. Cambridge University, United Kingdom. XXVII + 770pp.

Chapman RF 2002. Development of phenotypic differences in sensillum populations on the antennae of a grasshopper, *Schistocerca americana*. *J Morphol.* 254: 186-94.

Clements AN 1963. *The physiology of mosquitoes.* Macmillan company, New York. XVI + 393pp.

Cônsoli LF, Kitagima EW, Parra JRP 1999. Sensilla on the antenna and ovipositor of the parasitic *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). *Microsc Res Tech.* 45: 313-24.

Dedet JP, Derouin F, Cornet M 1978. Infestation spontanée de *Phlebotomus duboscqi* par des promastigotes de Leishmania au Senegal. C R Acad Sc Paris. 286: 301-02.

Desjeux P 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. World Health Stat Q 45.

Desjeux P 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 95: 239-43.

Dougherty MJ, Guerin PM, Ward RD 1995. Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in volatiles of faeces from vertebrates. Physiol Entomol. 20: 23-32.

Dougherty MJ, Guerin PM, Ward RD, Hamilton JGC 1999. Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. Physiol Entomol. 24: 251-62.

Endris RG, Young DG, Perkins PV 1987. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 24: 412-15.

Enrique Perez J, Ogusuku E 1997. Chorion patterns on eggs of *Lutzomyia* sandflies from the Peruvian Andes. Med Vet Entomol. 11: 127-33.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi G 1991. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. Mem Inst Oswaldo Cruz. 86: 499-00.

Fausto AM, Maroli M, Mazzini M 1992. Ootaxonomic and egg shell ultrastructure of *Phlebotomus* sandflies. Med Vet Entomol. 6: 201-08.

Fausto AM, Feliciangeli MD, Maroli M, Mazzini M 2001. Ootaxonomic investigation of five *Lutzomyia* species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96: 197-04.

Feliciangeli MD, Castejon OC, Limongi J 1993. Egg surface ultrastructure of eight new world phlebotominae sand fly species (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 30: 651-656.

Fernandes FF, Linardi PM 2002. Observations on mouthparts of *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr. 1781) (Diptera: Cuterebridae) by scanning electron microscopy. J Parasitol. 88: 191-194.

Fernandes FF, Pimenta PFP, Linardi PM 2004. Antennal sensilla of the new world screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol. 4: 545-551.

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. 4th ed. Universidade de São Paulo, São Paulo, X + 658 pp.

Galati 2003. Ecologia das Leishmanioses. In Rangel E F, Laison R, Flebotomíneos do Brasil. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 291-10.

Gebre-Michael T, Pratlong F, Lane RP 1993. *Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi* (Diptera: Phlebotominae), naturally infected with *Leishmania major* in southern Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 87: 10-11.

Ghosh KN, Bhattacharya A 1993. A comparison of Light Microscopic and Scanning Electron Microscopic study on the chorionic sculpturing of sandfly (*Phlebotomus argentipes*) eggs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 88: 335-37.

Gracco M, Catala S 2000. Inter-specific and developmental differences on the array of antennal chemoreceptors in four species of Triatominae (Hemiptera: reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 95: 67-74.

Gratz NG 1999. Emerging and resurging vector-borne diseases. Annu Rev Entomol. 44: 51-75.

Hallberg E, Hansson BS 1999. Arthropod sensilla: morphology and phylogenetic considerations. Microsc Res Tech. 47: 428-39.

Hanafi HA, Sawaf BM, Fryauff DJ, Beavers GM, Tetreault GE 1998. Susceptibility to *Leishmania major* of different populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) from endemic and non-endemic regions of Egypt. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 57-64.

Hashiguchi Y, Chiller T, Inchausti A, De Arias A, Kawabata M, Alexander JB 1992. Phlebotomine sandfly species in Paraguay and their infection with *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. 86: 175-80.

Ilango K 2000. Morphological characteristics of the antennal flagellum and its sensilla chaetica with character displacement in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti sensu lato (Diptera: Psychodidae). *J Biosci*. 25: 163-72.

Jacobson RL, Schlein Y 2001. *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major* parasites express alpha-amylase and alpha-glucosidase. *Acta Trop* 78:41-9.

Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, et al 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis*. 156: 73-83.

Keil TA 1997a. Comparative morphogenesis of sensilla: a review. *Int J Insect Morphol Embryol*. 26: 151-160.

Keil TA 1997b. Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microsc Res Tech*. 39: 506-31.

Keil TA 1999. Morphology and development of the peripheral olfactory organ. In: Hasson BS, *Insect olfaction*, Springer-Verlag, Berlin. p. 5-47

Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Peters W, Rioux JA, Bray RS 1985. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: the incrimination of *Phlebotomus papatasi* as the vector in the Al-Hassa oasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 79: 252-5.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Leger N, Pesson B, Madulo-Leblond G, Page AM 1989. Absence of outer caudal setae on all larval instars of *Phlebotomus tobbi* from the Ionian Greek islands. Med Vet Entomol. 3: 131-5.

Killick-Kendrick R 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol. 4: 1-24.

Kline DL, Axtell RC 1999. Sensilla of the antennae and maxillary palps of *Culicoides hollensis* and *C. melleus* (Diptera: Ceratopogonidae). J Med Entomol. 36: 493-502.

Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, Killick-Kendrick, The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Academic Press, London. p. 1-119.

Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure Ji, Koech DK, Roberts CR 1990. Development of *Lutzomyia major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi*. Am J Trop Med Hyg 43: 41-43.

Leite AC, Williams P, dos Santos MC 1991. The pupa of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae-Phlebotominae). Parassitologia. 33: 477-84.

Leite ACR, William P 1996. Description of the fourth larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 9: 571-578.

Leite ACR, William P 1997. The first instar larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 91: 571-578.

Madulo-Leblond G, Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pesson B 1991. Comparaison entre *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire, 1906 et *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786): Etudes morphologique et isoenzimatique. Parassitologia. 35: 387-391.

Marcondes CB 2001. Entomologia médica e veterinária. 1st ed., Athemeu, São Paulo, XIX + 432pp.

Maroli M, Bettini S 1997. Past and present prevalence of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Italy. *Parasite*. 4: 273-276.

Mazzoni CJ, Gomes CA, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA 2002. Molecular evolution of the period gene in sandflies. *J Mol Evol*. 55: 553-62.

McIver SB 1982. Sensilla mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 19: 489-535.

Merivee E, Renou M, Mand M, Luik A, Heidema M, Ploomi A 2004. Electrophysiological responses to salts from antennal chaetoid taste sensilla of the ground beetle *Pterostichus aethiops*. *J Insect Physiol*. 50: 1001-13.

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

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A 2002. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:185-88.

Mitchell BK, Itagaki H, Rivet MP 1999. Peripheral and central structures involved in insect gustation. *Microsc Res Tech*. 47: 401-15.

Mukhopadhyay J, Ghosh K 1999. Vector potential of *Phlebotomus duboscqi* and *P. papatasi*: a comparison of feeding behaviour, reproductive capacity and experimental infection with *Leishmania major*. *Ann Trop Med Parasitol*. 93: 309-18.

Neves DP, Melo ALM, Genaro O, Linardi PM 1995. *Parasitologia humana*. 9th ed., Atheneu, São Paulo, 524 pp.

Ochieng SA, Hallberg E, Hansson BS 1998. Fine structure and distribution of antennal sensilla of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Cell Tissue Res*. 291: 525-36.

Pereira IR, Hoch A 1990. *Lutzomyia intermedia* as a suspected vector of *Leishmania Viannia brasiliensis* in Bahia state, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 23: 235.

Pereira ST, Secundino NFC, Botelho ACC, Pinheiro VC, Tadei WP, Pimenta PFP 2005. Role of the egg buster in hatching of *Aedes aegypti*: scanning electron microscopy study. J Med Entomol (*in press*).

Pessoa SB, Martins AV 1978. Parasitologia médica. 10th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 986p.

Pessoa FAC, Guerra de Queiroz R, Ward RD 2001. External morphology of sensory structures of fourth instar larvae of neotropical species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) under scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96: 1103-08.

Pesson B, Madulo-Leblond G, Killick-Kendrick M, Tang Y, Killick-Kendrick R 1994. The armature in the genital atrium as a new taxonomic character distinguishing females of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). Ann Trop Med Parasitol. 88: 539-42.

Pophof B, Stange G, Abrell L 2005. Volatile organic compounds as signals in a plant-herbivore system: electrophysiological responses in olfactory sensilla of the moth *Cactoblastis cactorum*. Chem Senses. 30:51-68.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF 1984. Infecção de *Lutzomyia intermedia* Lutz e Neiva, 1912, em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar no estado do Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 79: 395-96.

Rangel EF, Laison R 2003. Ecologia das Leishmanioses. In Rangel E F, Laison R, Flebotomíneos do Brasil, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 291-310.

Reithinger R, Davies CR 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J Trop Med Hyg. 61: 530-41.

Rey L 1991. Parasitologia. 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 731 pp.

Riesgo-Escovar JR, Piekos WB, Carlson JR 1997. The maxillary palp of *Drosophila*: ultrastructure and physiology depends on the lozenge gene. *J Comp Physiol A* 180: 143-50.

Rispail P, Léger N 1998. Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 1. Considerations of morphological characters in the genus *Phlebotomus* Rondani & Berte 1840. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 773-85.

Rispail P, Dereure J, Jarry D 2002. Risk zones of human Leishmaniasis in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 477-83.

Rodriguez MH, Orozco A, Chavez B, Martinez-Palomo A 1992. Scanning electron microscopy of egg hatching of *Anopheles albinamus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 29: 887-90.

Rogo LM, Kokwaro ED, Mutinga MJ, Khamala CP 1992. Differentiation of vector species of phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Kenya by chorionic sculpturing of their eggs. *J Med Entomol*. 29: 1042-44.

Rojas E, Scorza JV, Morales G, Morales C, Barazarte R, Torres A 2004. Diversity and species composition of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Venezuelan urban focus of cutaneous leishmaniasis. *J Am Mosq Control Assoc*. 20: 189-94.

Salomón OD, Estani SS, Monzani AS, Studer C 2001a. Brote epidemico de leishmanioses Tegumentaria em Puerto Esperanza, Província Misiones, 1998. *Medicina*. 61: 385-90.

Salomón OD, Pascual MB, Molinari ML, Verri V 2001b. Study of a cutaneous leishmaniasis outbreak in general Vedia, province of Chaco, 1996. *Rev Inst Bras Med Trop*. 43: 99-04.

Schaller L 1982. Structural and functional classification of antennal sensilla of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res*. 225: 129-42.

Secundino NFC, Pimenta PFP 1999. Scanning Electron Microscopy study of the egg and immature stages of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Acta Microsc 8: 33-38.

Shandbhag SR, Muller B, Steinbrecht RA 1999. Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*. 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. Int J Insect Morphol Embryol. 28: 377-97.

Shaw JJ 1988. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 83: 486-90.

Shaw JJ 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz. 89: 471-78.

Sherlock IA, Carneiro M 1963. Descrição das fases imaturas do *Phlebotomus bahiensis* Mangabeira & Sherlock, 1961 (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 61: 491-94.

Sherlock IA, Maia H, Dias-Lima AG 1996. Resultados preliminares de um projeto sobre a ecologia dos flebotomíneos vetores de leishmaniose tegumentar no Estado da Bahia. Rev Soc Bras Med Trop 29: 207-14.

Shields VD, Hildebrand JG 2001. Responses of a population of antennal olfactory receptor cells in the female moth *Manduca sexta* to plant-associated volatile organic compounds. J Comp Physiol. 186: 1135-51.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF 2002. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97: 759-65.

Spänhoff B, Alecke C, Kascheck N, Lange J, Meyer EI 2003. Morphological characteristics of sensilla on the female ovipositor of *Lye phaeopa* (Psychomyiidae: Trichoptera). J Insect Sci. 3: 1-7.

Spiegel CN, Oliveira SMP, Brazil RP, Soares MJ. 2005. Structure and distribution of sensilla on maxillary palps and labella of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies. *Microsc Res Tech.* 66: 321-30.

Sudia WD, Chamberlain RW 1962. Battery – operated light trap, an improved model. *Mosq News.* 22: 126-129.

Sutcliffe JM 1994. Sensory bases of attractancy: morphology of mosquito olfactory sensilla. *J Am Mosq Control Assoc.* 10: 309-15.

Tapia FJ, Cáceres-Dimar G, Sánchez MA 1996. Molecular and immune mechanics in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Springer, Germany, 240 pp.

Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena, H, Montoya-Lerma J 2002. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forest in northern Colombia. *J Med Entomol.* 39: 451-56.

Ward RD 1972. Some observation on the biology and morphology of the immature stages of *Psychodopygus Wellcomei* Fraiha, Shaw and Laison, 1971. (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 70: 15-28.

Ward RD, Ready PA 1975. Chorionic sculpturing in some sandflies from Brazil (Diptera: Psychodidae). *J Ent.* 50: 127-34.

Ward RD 1976a. A revised numerical chaetotaxy for neotropical phlebotomine sandfly larvae (Diptera: Psychodidae). *Syst Entomol.* 1: 8-94.

Ward RD 1976b. The immature stages of some Phlebotomine sandflies from Brazil (Diptera: Psychodidae). *Syst Entomol.* 1: 227-40.

World Health Organization 1977. Scientific working group on leishmaniasis. Report of first meeting, TDR/ LEISH-SWG (1)/77.3, Geneva.

World Health Organization 2002. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. Weekly Epidemiol Record. 44: 365-372.

World Health Organization 2005. Leishmaniasis, 2003-2004. Seventeenth Programme Report/ WHO Making healthy research work for poor people, Geneva.

Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the west Indies, Central and south America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst. 54: 1-81.

Zacharuk RY 1985. Antennae and sensilla. In Kerkut LI, Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, Pergamon Press, New York. p. 1-69

Zacharuk RS, Shields VD 1991. Sensilla of immature insects. Annu Rev Entomol. 36: 331-334.

Zayed AB, Hassan MI, Mohammed H, Fares A 2002. Antennal sensilla of the sand flies, *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus bergeroti* (Diptera: Psychodidae). Exp. Pathol. Parasitol. 5: 10-20.

Zimmerman JH, Newson HD, Hooper GR, Christensen HA 1977. A comparison of the egg surface structure of six anthropophilic phlebotomine sand flies (*Lutzomyia*) with the scanning electron microscope (Diptera:Psychodidae). J Med Entomol. 13: 574-79.

7. APÊNDICE

7.1 Manuscrito em fase final de preparação

BAHIA AC, SECUNDINO NFC, MIRANDA JC, FERNANDES FF, PIMENTA PFP 2006.
The microanatomy of antennae and sense organs of Old and New World sandflies species by Scanning Electron Microscopy. Manuscrito em preparação.

7.2 Artigo no prelo no “Journal of Medical Entomology”

BAHIA AC, SECUNDINO NFC, MIRANDA JC, PRATES, DB, SOUZA, APA, FERNANDES FF, BARRAL A, PIMENTA PFP 2006. Ultrastructural comparison of the external morphology of the developmental stages of *Lutzomyia (Nyssomia) intermedia* and *Lutzomyia (Nyssomia) whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy.

1 Ultrastructural comparison of the external morphology of the immature stages of *Lutzomyia*
2 (*Nyssomia*) *intermedia* and *Lutzomyia* (*Nyssomia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of
3 cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy.

4

5 ANA C. BAHIA¹; NÁGILA F. C. SECUNDINO¹; JOSÉ C. MIRANDA²; DEBORACI B.
6 PRATES²; ANA P. A. SOUZA²; FERNANDO F. FERNANDES³; ALDINA BARRAL²; PAULO
7 F. P. PIMENTA^{1*}

8

9 ¹Laboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG, Av.
10 Augusto de Lima 1715, CEP 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil ; ²Laboratory of
11 Imunoparasitology, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-BA;
12 Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40245-001 Salvador, BA, Brazil and ³Laboratory of
13 Medical and Veterinary Arthropodology, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,
14 Universidade Federal de Goiás, CEP 74605-050, Goiânia, GO, Brazil.

15

16

17

18

19

20

21 Corresponding author: Paulo F. P. Pimenta. Laboratory of Medical Entomology Centro de
22 Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ. Av. Augusto de Lima, 1715 CEP 30190-002. Belo
23 Horizonte, M.G. Brazil. Phone number: 55-31-3349-7700, Fax number: 55-31-3295-3115. E-
24 mail address: pimenta@cpqrr.fiocruz.br

25

26

27 **ABSTRACT**

28 *Lutzomyia* (Nyssomia) *intermedia* and *Lutzomyia* (Nyssomia) *whitmani* are vectors of
29 **American Cutaneous** Leishmaniasis in several endemic regions of Brazil. Here, we analyzed the
30 external morphological aspects of the immature stages of these two vectors using scanning electron
31 microscopy. In general, the larval stages of the two species were morphologically similar, although
32 some differences were also noted. Detailed examination of the eggs of both species revealed
33 similar exchorionic ornamentations of unconnected parallel ridges. The larval head capsules were
34 well defined, heavily sclerotized and beared prominent chewing mouthparts. The abdominal
35 segments were easily recognized by the presence of prolegs on their ventral surfaces. The
36 morphology of the anal lobe on the terminal abdominal segment differed on the two species. We
37 found the following three types of sensillae inserted on the antennae: 1) clavate basiconic; 2) small,
38 blunt coeloconic and 3) multiporous clavate coleoconic. In addition; five subtypes of trichoid
39 sensillae on the larval body were found: 1) long, 2) short, 3) curved long, 4) brush-like and 5)
40 weakly brush-like. The caudal filaments located on the last abdominal segment were recognized as
41 a long trichoid sensillum. We observed pores on the surface of the clavate coelonic sensillae and on
42 the caudal filaments, that presumably function as chemoreceptors. The larvae of the two species
43 showed similarities in the lobular-form antennae of L1 larvae, which changed to digitiform in L2,
44 L3, and L4. This study demonstrated that the external surface of the eggs and larvae of *Lu.*
45 *intermedia* and *Lu. whitmani* were morphologically similar, but could be distinguished by details in
46 the microanatomy observed by scanning electron microscopy.

47

48

49

50

51

52 **KEYWORDS:** *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, immature stages, scanning electron microscopy.

53

54 **INTRODUCTION**

55 *Lutzomyia (Nyssomia) intermedia* (Lutz and Neiva 1912) and *Lutzomyia. (Nyssomia)*
56 *whitmani* (Antunes and Coutinho 1939) are American phlebotomine sand flies and proven vectors
57 of *Leishmania braziliensis* (Vianna 1911), the causative agent of American Cutaneous
58 Leishmaniasis in Brazil and other South American countries (Vexenat et al. 1986, Jones et al. 1987,
59 Rangel et al. 1990, Hashiguchi et al. 1992, Salomón et al. 1995, 2001a, 2001b, Brito et al. 2002,
60 Souza et al. 2002). In some endemic areas, these two species are sympatric (Santos et al. 1993,
61 Miranda et al. 2002).

62 Sand flies are holometabolous insects with four life cycle developmental stages: egg, larva,
63 pupa and adult. Pioneer taxonomic studies of immature stages of phlebotomines used optical
64 microscopy as a common tool (Barreto 1941, Guitton and Sherlock 1969, Ward 1972). Further on,
65 Ward and Ready (1975) introduced scanning electron microscopy (SEM) to describe details of the
66 exchorionic ornamentation of the eggs of thirteen species of Brazilian phlebotomines. Thereafter,
67 other studies used SEM to reveal ultrastructural details of various immature stages of *Phlebotomus*
68 *tobbi* (Adler and Theodor 1930) (Killick-Kendrick et al. 1989), and of pupae, and first and fourth
69 instars of larvae of *Lu. longipalpis* (Lutz and Neiva 1912) ((Leite et al. 1991, Leite and William
70 1996, 1997). Recently, Secundino and Pimenta (1999) revealed morphological characteristics of all
71 developmental stages of *Lutzomyia longipalpis* through SEM. Until now, only optical microscopic
72 observations have been made on the external morphology of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani*
73 (Barreto 1941). This is the first time SEM has been used to compare ultrastructural features on the
74 surfaces of their immature stages. Therefore, here we used SEM to analyze comparatively the
75 structural aspects of the external surface of the immature stages of these two sand fly vectors from
76 the same endemic area.

77

78 **MATERIALS AND METHODS**

79 **Sand flies:** Sand flies were captured at Corte de Pedra (13° 32' South latitude and 39° 25' West
80 longitude) in the State of Bahia, Brazil. They were then blood fed on hamsters and kept on a 50%

81 sugar solution *ad libitum*. Flies were held in colony cages and maintained at 26°C with 60%
82 humidity to allow breeding. Three to four days after the blood meal, females were allowed to lay
83 eggs, which hatched after 3 to 4 days. The larvae were fed with the appropriate diet (Secundino and
84 Pimenta, 1999) in order to complete their life cycle. Twenty specimens of each developmental
85 stage, except pupae, were collected (eggs and the four larval instars), washed in phosphate buffered
86 saline (PBS) and immediately fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer
87 (pH 7.2) at room temperature.

88 **Scanning Electron Microscopy (SEM):** Fixed samples were processed for SEM as described
89 elsewhere (Secundino and Pimenta 1999). Briefly, they were post-fixed in 1% osmium tetroxide
90 (OsO₄) plus 0.8% potassium ferricyanide in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2) and dehydrated in a
91 series of crescent ethanol concentrations. After that, the samples were critical-point dried under
92 CO₂. They were then coated with a 20 nm layer of gold particles and examined under SEM (JEOL
93 JSM5600).

94

95 **RESULTS AND DISCUSSION**

96 Several ultrastructural details of the external surface of the immature stages of *Lu.*
97 *intermedia* and *Lu. whitmani* were revealed by SEM allowing us to compare the microanatomy of
98 these two important vectors.

99 The eggs of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* are about the same size (length =
100 0.308 ± 0.016 mm and width = 0.074 ± 0.003 mm for *Lu. intermedia*; length = 0.307 ± 0.010 mm and
101 width = 0.077 ± 0.002 mm for *Lu. whitmani*), having a long oval shape and ornamentations that
102 consist of parallel ridges covering the entire exchorion (Figs. 1-4). Barreto (1941) described these
103 ridges as “connected ridges” in these same species, using optical microscopy. However, our SEM
104 observations revealed that most of these ridges are unconnected and have small tubercles between
105 them (Figs. 1 and 2). Similar observations of unconnected ridges were seen by Almeida and
106 collaborators on *Lu. intermedia* eggs (2004). Here, high SEM magnification revealed that these
107 ridges are formed by single lines of rounded palisade units (diameter = 0.576 ± 0.074 μ m for *Lu.*
108 *intermedia* and 0.775 ± 0.095 μ m for *Lu. whitmani*) that project themselves from the eggshell (high =
109 0.454 ± 0.040 μ m for *Lu. intermedia* and 0.597 ± 0.043 μ m for *Lu. whitmani*) (Figs. 3 and 4). In

110 contrast, *Lu. longipalpis* eggs present unconnected ridges formed by lines of double-rounded
111 palisade units without tubercles between them (Secundino and Pimenta 1999).

112 Some authors have speculated that exchorionic ornamentations are adaptive structures that
113 facilitate oviposition in distinct environments (Ward and Ready 1975, Perez and Ogusuku 1997). In
114 the present work, observations of the egg surfaces showed no differences in the exchorion
115 ornamentation of the two sympatric sand flies. In another study, Rogo and collaborators (1992)
116 showed intraspecific differences in the exchorions of *Phlebotomus aculeatus* (Lewis, Minter and
117 Ashford 1974) and *Phlebotomus martini* (Parrot 1936). Yet another report showed that the egg
118 exchorions of *Phlebotomus pedifer* (Lewis, Mutinga and Ashford), *Lu. longipalpis* and *Lu.*
119 *diabolica* (Hall 1936) have similar patterns of unconnected ridges (Endris et al. 1987, Rogo et al.
120 1992, Secundino and Pimenta 1999), even though these species occur in widely separated
121 geographic areas. Others suggest, based on SEM examination of twenty-three sand fly species, that
122 exchorionic ornamentations reflect phylogenetic relationship between the species (Endris et al.
123 1987, Feliciangeli et al. 1993, Perez and Ogusuku 1997, Fausto et al. 2001). Because the exchorion
124 ornamentation is not necessarily species-specific, it seems like it cannot be used reliably as a
125 taxonomic tool.

126 Sand fly larvae escape from the egg by breaking the shell in a manner similar to other
127 Diptera. The egg hatching of first instar larvae of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* causes irregular
128 oblique fractures in the eggshells (Figs. 5-7 and 10). The first sign of egg hatching is an opening as
129 a door-like flap at the anterior end of the eggshell where the larva head appears (Figs. 5 and 6).
130 Following this initial event, the entire head is exposed (Figs. 6 and 7) revealing the egg buster (Fig.
131 8). It appears that the head movements, along with the friction of the egg buster, are responsible for
132 breaking the eggshell. At the same time, the distal ends of the larva caudal filaments also appear
133 outside (Figs. 7-9). These sequential events allow the larva to escape (Figs. 9 and 10). A similar
134 mechanism of egg breaking and larval escape was described for *Lu. longipalpis* (Leite and
135 Williams 1997, Secundino and Pimenta 1999).

136 The egg breaking in several Diptera is due to the action of a structure called egg buster
137 (synonyms: hatching spine, egg-breaker or busting teeth). Here, SEM showed the egg buster on the
138 apex of the head of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani*. The egg buster only exists on the dorsal
139 surface of the first instar larva head and has been used to differentiate the first instar from the

140 second instar larvae in Diptera, along with other taxonomic characters (Breland 1959, Alvan-
 141 Aguilar and Hamada 2003). Details of the microanatomy of the sand fly egg buster can be seen on
 142 the dorsal region when the larva head is completely out of the eggshell (Fig. 19). The egg busters of
 143 these two sand flies are similar structures with small differences in their dimensions (length =
 144 $0.027\pm 0.003\text{mm}$ and width = $0.018\pm 0.001\text{mm}$ for *Lu. intermedia*; length = $0.023\pm 0.002\text{mm}$ and
 145 width = $0.019\pm 0.001\text{mm}$ for *Lu. whitmani*). The egg buster is a cuticular formation that rises from
 146 the top of the larva's head like a miniature volcanic cone (Fig. 19). Leite et al. (1997) and
 147 Secundino and Pimenta (1999) observed a similar egg buster in *Lu. longipalpis*.

148 We found *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* immatures to be very similar in aspects such
 149 egg exchorionic ornamentations and egg busters, but we found some differences. For example, the
 150 larva sizes differ slightly between the two species. The first instar larvae of the *L. intermedia* are
 151 sized length = $0.467\pm 0.09\text{mm}$ and width = $0.085\pm 0.002\text{mm}$; while the dimensions of the first instar
 152 of *Lu. whitmani* are length = $0.491\pm 0.089\text{mm}$ and width = $0.078\pm 0.021\text{mm}$. The fourth instar larva,
 153 which represents the last larval stage, has the following dimensions for *Lu. intermedia*: length =
 154 $2.116\pm 0.392\text{mm}$ and width = $0.262\pm 0.052\text{mm}$; as for dimensions of fourth instar of *L. whitmani* are
 155 length = $2.032\pm 0.420\text{mm}$ and width = $0.349\pm 0.093\text{mm}$. These size differences may not be
 156 significant and probably cannot be relied upon to differentiate the two species. Moreover, larva
 157 sizes are determined in part by diet, thus in the wild, the larvae of the two species may have
 158 entirely different diets and sizes may vary accordingly. Differences in sizes of laboratory-reared
 159 larvae kept on the same diet may not reflect what is observed in nature.

160 The general microanatomy revealed by SEM of the larvae of both sand fly species also
 161 shows similarities between them. The bodies of both larvae are long and divided into twelve
 162 segments: three thoracic and nine abdominal segments (Figs. 11-14). In both species, the larval
 163 tegument is adorned dorsally and laterally with numerous setae (Figs. 11-14), which are absent on
 164 the anal lobe (Figs. 15 and 16), on the head bases and on the mouthparts (Figs. 17-19). The
 165 abdominal segments have prolegs (protruding elliptical structures) on its ventral side, that are used
 166 for locomotion and are not present on the first three segments nor on the anal lobe (Figs. 13, 14
 167 and insets). These anatomical aspects are similar in *Lu. longipalpis* and *Lu. bahiensis* (Mangabeira
 168 and Sherlock 1964) larvae (Sherlock and Carneiro 1963, Leite and William 1996, 1997, Secundino
 169 and Pimenta 1999). *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* prolegs have small differences in size (length

170 = 0.068 ± 0.001 mm and width = 0.030 ± 0.004 mm for *Lu. intermedia*; length = 0.108 ± 0.005 mm and
171 width = 0.057 ± 0.006 mm for *Lu. whitmani*). In addition, the morphology of the anal lobe is
172 different between the species (Figs. 15 and 16). The anal lobe of *Lu. whitmani* is more wrinkled
173 and shorter than that of *Lu. intermedia* (length = 0.114 ± 0.002 mm and width = 0.123 ± 0.003 mm for
174 *Lu. intermedia*; length = 0.067 ± 0.006 mm and width = 0.076 ± 0.006 mm for *Lu. whitmani*). These
175 characteristics may comprise distinguishing features that might be useful in the *bona fide*
176 identification of these species under SEM, further supporting ordinary adult taxonomy.

177 The larvae have well-defined, round and sclerotized head capsules in both sandfly species
178 (Figs. 11-14 and 17-19). The mouth apparatus, consisting of clypeus, labrum, mandibles, maxillas
179 and mentum, is located in the ventral part of the head (length = 0.147 ± 0.025 mm and width =
180 0.135 ± 0.025 mm for *Lu. intermedia*; length = 0.092 ± 0.032 mm and width = 0.091 ± 0.027 mm for *Lu.*
181 *whitmani*) (Figs. 17-18). This type of mouth apparatus is considered as a “masticator”, as described
182 by Leite and Willians (1996, 1997) and Mukhopadway and Gosh (2000).

183 Antennal morphology is similar in *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* and changes between
184 L1 and subsequent larval instars (L2 to L4). In L1, the antennae are two-segmented with a basal
185 conical segment fused with a short ovoid distal segment that is almost as long as the basal segment
186 (Figs. 19-21). In L2 through L4, the antennae are also two-segmented but the distal segment is
187 greatly elongated (digitiform) to about three times the length of the conical basal segment (Figs. 22
188 and 23). This observation differs from the initial findings of Barreto (1941), who observed
189 digitiform antennae on all larval instars of both species using optical microscopy. Recently, Pessoa
190 and collaborators (2001) described the same digitiform antennae on L4 of several sand flies. Here,
191 details of the antennae of all larval instars revealed they have three types of sensillae on the ventral
192 part and on the apex of the distal segment, independent of the change in antennal morphology from
193 L1 to L2-L4 instars (Figs. 24-30). These sensillae are important sensory organs that function as
194 hygrometers, contact chemoreceptors, tactile receptors, olfactory receptors and temperature
195 receptors, which enable the insects to detect changes in the surrounding environment (Keil, 1997).

196 We analyzed in detail all the sensilla types present on the immature stages of *Lu. intermedia*
197 and *Lu. whitmani*. The classification of sensillae was made according to Hallberg and Hasson,
198 (1999) and Mitchell and collaborators (1999). There are five subtypes of trichoid sensillae which
199 were classified as: 1) long, 2) short, 3) curved long, 4) brush-like and 5) weakly brush-like. The

200 brush-like trichoid sensillae are localized along the dorsal and lateral parts of the larvae, but are
 201 absent in the ventral parts, and behind the antennae on the top of the head (Figs. 11-14, 19, 24-25).
 202 The weakly brush-like trichoid sensillae are found in the middle of the head in front of the antennae
 203 (Figs. 19 and 26). The curved long trichoid sensillae are located in the lateral sides of the prolegs in
 204 both species, however, they present different degrees of bending (Figs. 13, 14 and insets, and 27-
 205 28). The presence of curved long trichoid sensillae on the prolegs of the two studied sand flies
 206 differs from what was observed in *Lu. bahiensis* (Sherlock and Carneiro, 1963) and in *Lu.*
 207 *longipalpis* (Leite and William 1996, 1997, Secundino and Pimenta, 1999). The short trichoid
 208 sensillae (0.021 ± 0.010 mm for *Lu. intermedia* and 0.028 ± 0.012 mm for *Lu. whitmani*) are observed
 209 on the mouthparts (Figs. 17, 18 and 28). The long trichoid sensillae (0.066 ± 0.011 mm long for *Lu.*
 210 *intermedia* and 0.068 ± 0.022 mm long for *Lu. whitmani*) are located in the forehead, forming a line
 211 in front of the weakly brush-like trichoid sensillae (Figs. 17-19 and 28). Short trichoid sensillae and
 212 long trichoid sensillae are around of the anal lobe of *Lu. whitmani* and in *Lu. intermedia* (Figs. 15
 213 and 16). This type of sensillum was not found in *Lu. longipalpis* and *Lu. bahiensis* (Sherlock and
 214 Carneiro, 1963, Leite and William 1996, 1997, Secundino and Pimenta 1999). Straight and curved
 215 forms of long trichoid sensillae and short trichoid sensillae were previously observed by Fernandes
 216 and Linardi (2002) in segment II of the mouthparts of *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr. 1781)
 217 (Diptera: Oestridae). Mechanosensory sensillae with similar morphology have been found in the
 218 maxillary palps of *Drosophila melanogaster* by Riesgo-Escovar et al (1997).

219 Other sensillae are found on the antennae of *Lu. whitmani* and *Lu. intermedia* larvae. One
 220 clavate basiconic sensillum is located in the apex of the larval antenna (Fig. 30). On the proximal
 221 part of the antenna, three short blunt coeloconic sensillae are observed on the insertion of one large
 222 sensillae of type multiporous clavate coeloconic sensillum (Figs. 30 and 31). Olfactory sensillae
 223 with a bulbous apical dilation with pores in its wall (clavate sensillae), similar to the multiporous
 224 clavate coeloconic sensillum described here, have been observed on the antennal clava of
 225 *Trichogramma galloi* (Zucchi 1988) and *T. pretiosum* (Riley 1879) (Hymenoptera:
 226 Trichogrammatidae), on the maxillary palps of *Culicoides hollensis* (Melander and Brues 1903)
 227 and *C. melleus* (Coquillett 1901) (Diptera: Ceratopogonidae), and on the antennal funiculus of
 228 *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858) (Diptera: Calliphoridae) (Consoli et al. 1999, Kline and
 229 Axtell 1999, Fernandes et al. 2004).

230 Another long type of trichoid sensillae with wall pores are located on the last larval
231 segments (Fig. 32). In sand flies, these sensillae are known as caudal filaments. There are two
232 caudal filaments on L1 and four on L2 to L4. Different patterns of pores exist on the caudal
233 filaments of the two species studied. *Lu. whitmani* has pores situated inside the wall grooves (Fig.
234 34). In *Lu. Intermedia*, the grooves are not as deep as in *Lu. whitmani*, and the pores appear to be
235 on the surface (Fig. 33). Pessoa et al (2001) found pores on caudal filaments of larvae of *Lu.*
236 *intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. lenti* (Mangabeira 1938), *Lu. longipalpis* and *Lu. evandroi* (Costa
237 Lima and Antunes 1936), but did not find any differences in the pattern of pores between the first
238 two species. Zacharuk (1985) believes that the absence of pores on the sensorial cuticle does not
239 allow chemical sensitivity, and that the presence of one single pore limits the sensitivity to taste,
240 while several pores allow the sense of olfaction. According to this author, the caudal filaments and
241 the multiporous clavate coeloconic sensillae of the first instar larvae of *Lu. intermedia* and *Lu.*
242 *whitmani* respond to olfactory molecules, thus are considered chemoreceptors.

243 In this study, we found mainly trichoid sensillae on the larva segments of both sandfly
244 species. Green and Hartenstein (1997) analyzed the sensillar patterns on the thoracic and abdominal
245 segments of several insect orders and described hairs and bristles (trichoid and chaetica sensillae)
246 of varied sizes and number in primitive insects and peg-like sensillae (basiconica, styloconica and
247 coeloconica) and papilla sensillae in Diptera. These authors suggested that the trichoid sensillae
248 represent mechanoreceptors that are stimulated by hair deflection. However, Zacharuk (1985)
249 claims that trichoid sensillae can have various functions including mechanical, chemical and
250 thermal reception that enable the larvae to discern changes in their environment. Future
251 ultrastructural and electrophysiological studies will be necessary to determine the exact function of
252 these sensillae in sand flies. Added to the results of the present work, these studies may supply
253 information about the behavior and physiology of these important vectors that might be useful for
254 the development of vector control strategies.

255 In summary, our comparative study showed that the external morphology of the eggs and
256 larvae of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* have similar features but are distinguishable by details in
257 their microanatomy observed by SEM. The similarities shared between these two sympatric
258 species may reflect their adaptation to similar environmental conditions.

259

260

261

262 **Acknowledgments.** The authors thank Marion Kusel and Dr. Tereza Magalhães for the critical
263 reading of the manuscript. We also thank the following Brazilian agencies for financial support:
264 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a
265 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - PRONEX) and Fundação Oswaldo Cruz
266 (FIOCRUZ). This study is part of the MsC dissertation of Ana Cristina Bahia Nascimento, graduate
267 fellow student of the Course Science of Health of the Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz-
268 MG.

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284 **REFERENCES:**

285 Almeida, D. N., O. R. Da Silva, B. G. Brazil, and M. J. Soares. 2004. Patterns of exchorion
286 ornaments on eggs of seven South American species of *Lutzomyia* sand flies (Diptera:
287 Psychodidae). J. Med. Entomol. 41: 819-25.

288 Alvan-Aguilar, M. A., and N. Hamada. 2003. Larval biometry of *Simulium rubrithorax* (Diptera:
289 Simuliidae) and size comparison between populations in the states of Minas Gerais and Roraima,
290 Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 507-11.

291 Barreto, M. 1941. Morfologia dos ovos, larvas e pupas de alguns flebótomos de São Paulo. Ann.
292 Fac. Med. Univ. São Paulo. 17: 357-427.

293 Breland, O. P. 1959. The first instar of *Orthopomyia alba beker* and *Orthopomyia singifera*
294 (Coquillet) with comparative notes (Diptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 137-141.

295 Brito, M., C. Casanova, L. M. Mascarini, D. M. V. Wanderlei, and F. M. A. Corrêa. 2002.
296 Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose tegumentar
297 americana no litoral norte do estado de São Paulo, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 35: 431-437.

298 Consoli, L. F., E. W. Kitagima, and J. R. P. Parra. 1999. Sensillae on the antenna and ovipositor of
299 the parasitic *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). Microsc.
300 Res. Tech. 45: 313-324.

301 Endris, R. G., D. G. Young, and P. V. Perkins. 1987. Ultrastructural comparison of egg surface
302 morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 24: 412-415.

303 Fausto, A. M., M. D. Feliciangeli, M. Maroli, and M. Mazzini. 2001. Ootaxonomic investigation of
304 five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae) from Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95:
305 197-204.

306 Feliciangeli, M. D., O. C. Castejon, and J. Limongi. 1993. Egg surface ultrastructure of eight New
307 World phlebotomine sand fly species (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 30: 651-656.

- 308 Fernandes, F. F., and P. M. Linardi. 2002. Observations on mouthparts of *Dermatobia hominis*
309 (Linneaus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) by scanning electron microscopy. *J. Parasitol.* 88:191-
310 194.
- 311 Fernandes, F. F., P. F. P. Pimenta, and P. M. Linardi. 2004. Antennal sensillae of the new world
312 screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 4: 545-551.
- 313 Green, P., and V. Hartenstein. 1997. Structure and spatial pattern of the sensillae of the body
314 segments of insect larvae. *Microsc. Res. Techniq.* 39: 470-478.
- 315 Guitton, N., and I. A. Sherlock. 1969. Descrição das fases imaturas do “*Phlebotomus longipalpis*”
316 Lutz e Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). *Rev. Brasil. Biol.* 29: 383-389.
- 317 Hallberg, E., and B. S. Hasson. 1999. Arthropod sensillae: Morphology and Phylogenetic
318 considerations. *Microsc. Res. Tech.* 47: 428-439.
- 319 Hashiguchi, Y., T. Chiller, A. Inchausti, A. Arias, M. kawabata, and J. B. Alexander. 1992.
320 Phlebotomine sand fly species in Paraguay and their infection with *Leishmania*. *An. Trop. Med.*
321 *Parasitol.* 86: 175-180.
- 322 Jones, T. C., W. D. Johanson, A. C. Barreto, E. Lago, R. Badaró, B. Cerf, S. G. Reed, E. Martins-
323 Netto, M. S. Tada, F. Franca, K. Wiese, L. Golightly, E. Frikrig, J. M. L. Costa, C., A. C. Cuba,
324 and P. D. Marsden. 1987. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania*
325 *braziliensis braziliensis*. *J. Infec. Dis.* 156:73-83.
- 326 Killick-Kendrick, R., M. Killick-Kendrick, N. Leger, B. Pesson, and Madulo-Leblond. 1989.
327 Absence of outer caudal setae on all larval instar of *Phlebotomus tobii* from Ionion Greek island.
328 *Med. Vet. Entomol.* 3: 131-135.
- 329 Kline, D. L., and R. C. Axtell. 1999. Sensillae of the antennae and maxillary palps of *Culicoides*
330 *hollensis* and *C. melleus* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.*, 36:493-502.
- 331 Leite, A. C. R., and P. William. 1996. Description of the fourth larva of *Lutzomyia longipalpis* ,
332 under scanning electron microcopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 91: 571-578.

- 333 Leite, A. C. R., and P. William. 1997. The first instar larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
334 Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 91: 571-578.
- 335 Leite, A. C. R., P. William, and M. C. Santos. 1991. The pupa of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera :
336 Psychodidae -Phebotominae). Parassitologia. 33: 477-484.
- 337 Mitchell, B. K., and H. Itagaki, M. P. Rivet. 1999. Peripheral and central structures involved in
338 insect gestation. Microsc. Res. Tec. 47: 401-415.
- 339 Miranda, J. C., E. Reis, A. Schriefer, M. Goncalves, M. G. Reis, L. Carvalho, O. Fernandes, M.
340 Barral-Netto, and A. Barral. 2002. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with
341 *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and
342 polymerase chain reaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97: 185-188.
- 343 Mukhopadhyay, J, and K. Ghosh. 2000. Morphology of larval and mouthparts of four Indian sand
344 flies (Diptera: Psychodidae) by Scanning Electron Microscopy. J. Med. Entomol. 37: 575-580.
- 345 Perez, E. J., and E. Ogasuku. 1997. Chorion patterns on eggs of Lu. sand flies from the Peruvian
346 Andes. Med. Veter. Entomol. 11: 127-133.
- 347 Pessoa, F. A. C., G. Queiroz, and R. D. Ward. 2001. External morphology of sensory structures of
348 fourth instar larvae of neotropical species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) under
349 scanning electron microscopy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96: 1103-1108.
- 350 Rangel, E. F., A. C. Azevedo, C. A. Andrade, N. A. Souza, and E. D. Wermelinger. 1990. Studies
351 on sand fly fauna (Diptera: Pychodidae) in a foci of cutaneous *Leishmaniasis* in Mesquita, Rio de
352 Janeiro State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85: 39-45.
- 353 Riesgo-Escovar, J. R., W. B. Piekos, and J. R. Carlson. 1997. The maxillary palp of *Drosophila*:
354 ultrastructure and physiology depends on the lozenge gene. J. Comp. Physiol. 180: 143-150.
- 355 Rodriguez, M. H., A. Orozco, B. Chavez, and A. Martinez-Palomo. 1992. Scanning electron
356 microscopy of egg hatching of *Anopheles albinamus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 29:
357 887-890.

- 358 Rogo, L. M., E. D. Kokwaro, M. J. Mutinga, and C. P. M. Khamala. 1992. Differentiation of vector
359 species of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Kenya by chorionic sculpturing of their eggs.
360 J. Med. Entomol. 29: 1042-1044.
- 361 Salomón, O. D., B. L. Travi, and E. L. Segura. 1995. Note on sand flies associated with a
362 tegumentary *Leishmaniasis* focus in Salta, Argentina. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 31: 91-92.
- 363 Salomón, O. D., M. B. Pascual, M. L. Molinari, and V. Verri. 2001. Study of a cutaneous
364 *Leishmaniasis* outbreak in general Vedia, province of Chaco, 1996. Rev. Inst. Med. Trop. São
365 Paulo. 43: 99-104.
- 366 Salomón, O. D., S. S. Estani, A. S. Monzani, and C. Studer. 2001. Brote epidemico de
367 Leishmaniosis tegumentaria en Puerto Esperanza, provincia de Misiones. Medicina. 61: 385-390.
- 368 Santos, A. J. O., E. G. Nascimento, M. P. Silva, and L. C. P. Carvalho. 1993. Report of visceral and
369 cutaneous focus in the town of Jequié, state of Bahia, Brazil. Rev. Inst. Bras. Med. Trop. 35: 583-
370 284.
- 371 Secundino, N. F. C., and P. F. P. Pimenta. 1999. Scanning Electron Microscopy study of the egg
372 and immature stages of the sand fly *Lu. longipalpis*. Acta Microsc. 8: 33-38.
- 373 Sherlock, I. A., and M. Carneiro. 1963. Descrição das fases imaturas do Ph. bahiensis Mangabeira
374 & Sherlock, 1961(Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz.
375 61: 491-494.
- 376 Souza, N. A., C. A. Andrade-Coelho, M. L. Vilela, A. A. Peixoto, and E. F. Rangel. 2002.
377 Seasonality of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring
378 sympatrically in area of cutaneous *Leishmaniasis* in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst.
379 Oswaldo Cruz. 97: 759-765.
- 380 Vexenat, J. A., A. C. Barretto, C. C. Cuba, and P. D. Mardse. 1986. Características
381 epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da
382 Bahia. III. Fauna flebotomínica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 81: 293-301.

383 Ward, R. D. 1972. Some observation on the biology and morphology of the immature stages of
384 *Psychodopygus Wellcomei* Fraiha, Shaw and Laison, 1971. (Diptera: Psychodidae). Mem. Inst.
385 Oswaldo Cruz, 70: 15-28.

386 Ward, R. D., and P. A. Ready. 1975. Chorionic sculpturing in some sand flies from Brazil (Diptera:
387 Psychodidae). J. Entomol. 50: 127-134.

388 Zacharuk, R. Y. 1985. Antennae and sensillae, pp. 1-69. In L. I. Kerkut, Comprehensive insect
389 physiology, biochemistry and pharmacology. Pergamon Press, New York.

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406 **LEGENDS**

407 **Figs. 1-4.** Egg surfaces of *Lu. intermedia* (Figs. 1 and 3) and *Lu. whitmani* (Figs. 2 and 4) show
 408 exchorions of unconnected parallel ridges (arrowheads). High magnification images show that
 409 these ridges are formed by single lines of round palisade units (asterisks). Magnifications: Fig. 1 =
 410 300x, Fig. 2 = 300x, Fig. 3 = 4000x, Fig. 4 = 3000x.

411 **Figs. 5-10.** Sequential events of egg hatching of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani*. Figures 5 and 6
 412 show a door-like flap at the anterior end of the eggshell (arrow), where the larva head appears. The
 413 entire heads (h) are exposed outside the eggshells in figures 7 and 8. In figure 8 it is possible to
 414 visualize the egg buster (arrowhead) on larva's head and on the distal ends of the caudal filaments
 415 (cf). Figures 9 and 10 show, respectively, two larvae with half and almost the entire bodies outside
 416 the eggshells. Note the egg buster (arrowhead) on the larva's head. Magnifications: Fig. 5 = 270x,
 417 Fig. 6 = 330x, Fig. 7 = 230x, Fig. 8 = 550x, Fig. 9 = 230x, Fig. 10 = 190x.

418 **Figs. 11-14.** External morphology of *Lu. intermedia* (Figs. 11 and 13) and *Lu. whitmani* larvae
 419 (Figs. 12 and 14). Lateral views of sand fly larvae (Figs. 11 and 12) show the heads (h) and the
 420 caudal filaments (arrowheads). Ventral views (Figs. 13 and 14) show the larvae bodies divided into
 421 twelve parts: three thorax and nine abdominal segments (white asterisks) between the head and the
 422 anal lobule (black asterisks). Note the prolegs (white asterisks in figures 13 and 14) are only
 423 present on the abdominal segments. Details of the prolegs and curved long trichoid sensillae
 424 (circle) are seen in the two insets. The brush-like trichoid sensillae (arrows) are located in dorsal
 425 and lateral parts of larva's segments. Magnification: Fig. 11= 220x, Fig. 12 = 60x, Fig. 13 = 160x
 426 and inset = 500x, Fig. 14 = 35x and inset = 250x.

427 **Figs. 15 and 16.** Details of the larvae's anal lobe. In *Lu. whitmani* (Fig. 15) this structure is more
 428 wrinkled and shorter than in *Lu. intermedia* (Fig. 16). Observe the crowns of short and long
 429 trichoid sensillae (arrows) surrounding the base of the anal lobes. Some sensillae were accidentally
 430 removed during sampling process and it is possible to see their insertions sites (arrowheads).
 431 Magnifications: Fig. 15 = 500x, Fig. 16 = 400x.

432 **Figs. 17-19.** External morphology of the larvae heads of *Lu. intermedia* (Figs. 17 and 19) and *Lu.*
 433 *whitmani* (Figs. 18). Ventral views of the heads show the mouth apparatus consisting of clypeus
 434 (c), labrum (asterisks), mandibles (ma), maxillas (mx) and mentum (me). Note trichoid sensillae
 435 on the apex of the head (arrowheads) and the short trichoid sensillae on the mouth apparatus
 436 (arrows). Dorsal view of the head (Fig. 19) shows the egg buster (asterisk) as a “volcanic cone”
 437 structure. A line set of brush-like trichoid sensillae (arrowheads) is located in front of the egg
 438 buster (asterisk). In the forehead, weakly brush-like trichoid sensillae (small arrows) are in front of
 439 the antennae (ant) and long trichoid sensillae (large arrows) in the forehead. Magnifications: Fig.
 440 17 = 350x, Fig. 18 = 300x and Fig. 19 = 1000x.

441 **Figs. 20-23.** Antennal morphology in larvae of *Lu. intermedia* (Figs. 20 and 22) and *Lu. whitmani*
 442 (Figs. 21 and 23). The antenna in L1 larvae is two-segmented with a basal conical segment fused
 443 with a short ovoid distal segment (asterisks) (Figs. 20 and 21). The antennae in L2 larvae, which
 444 remains until L4 larvae, are also two-segmented but the distal segment is greatly elongated
 445 (digitiform) (c) (Figs. 22 and 23). Observe the sensillae inserted on the superior portion of the
 446 antennae (arrows). Magnifications: Fig. 20 = 2000x, Fig. 21 = 2000x, Fig. 22 = 1000x, Fig. 23 =
 447 1000x.

448 **Figs. 24-29.** Microanatomy of the sensillae of *Lu. intermedia* and *Lu. whitmani* larvae showing: a)
 449 brush-like trichoid sensillum present on the head (Fig. 24) and on the lateral-dorsal body segments
 450 (Fig. 25); b) weakly brush-like trichoid sensillum on the middle of the head (Fig. 26); c) curved
 451 long trichoid sensillae with different degrees of bending on the lateral sites of the prolegs (Figs. 27
 452 and 28); and d) short trichoid sensillum (arrowhead) and long trichoid sensillum (arrow) on the top
 453 of the larva’s head (Fig. 29). Magnifications: Fig. 24 = 1000x, Fig. 25 = 1000x, Fig. 26 = 2000x,
 454 Fig. 27 = 2000x, Fig. 28 = 3000x and Fig. 29 = 2000x.

455 **Figs. 30-34.** Microanatomy of the antennae and caudal filaments of *Lu. intermedia* (Figs. 30, 31, 32
 456 e 33) and *Lu. whitmani* (Figs. 30, 31 e 34) larvae. Figure 30 shows a general view of the antenna of
 457 *Lu. intermedia* L1 larva (similar to *Lu. whitmani*). Note five sensillae: one clavate basiconic
 458 sensillum (cb) on the apex, one multiporous clavate coeloconic sensillum (asterisk) on the base,
 459 and three short blunt coeloconic sensillae (bc) on the proximal region. Observe the pores on the
 460 clavate coeloconic sensillum at a higher magnification (Fig. 31).

461 **Figure 32.** shows the general view of the caudal filaments (cf) (i.e. long type of trichoid sensillae)
462 of *Lu intermedia* L1 larvae, similar to *Lu. whitmani* (not shown) at low magnification. Pores in the
463 caudal filaments are only seen at high magnifications. In *Lu. whitmani*, the pores are inside wall
464 grooves (Fig. 34), while in *Lu. intermedia* (Fig. 33) the pores are revealed in the surface because
465 the grooves are not so deep. Magnifications: Fig. 30 = 9.000x, Fig. 31 = 21.600x, Fig. 32 = 150x,
466 Fig. 33 = 6.000x, Fig.34 = 8.000x.

