

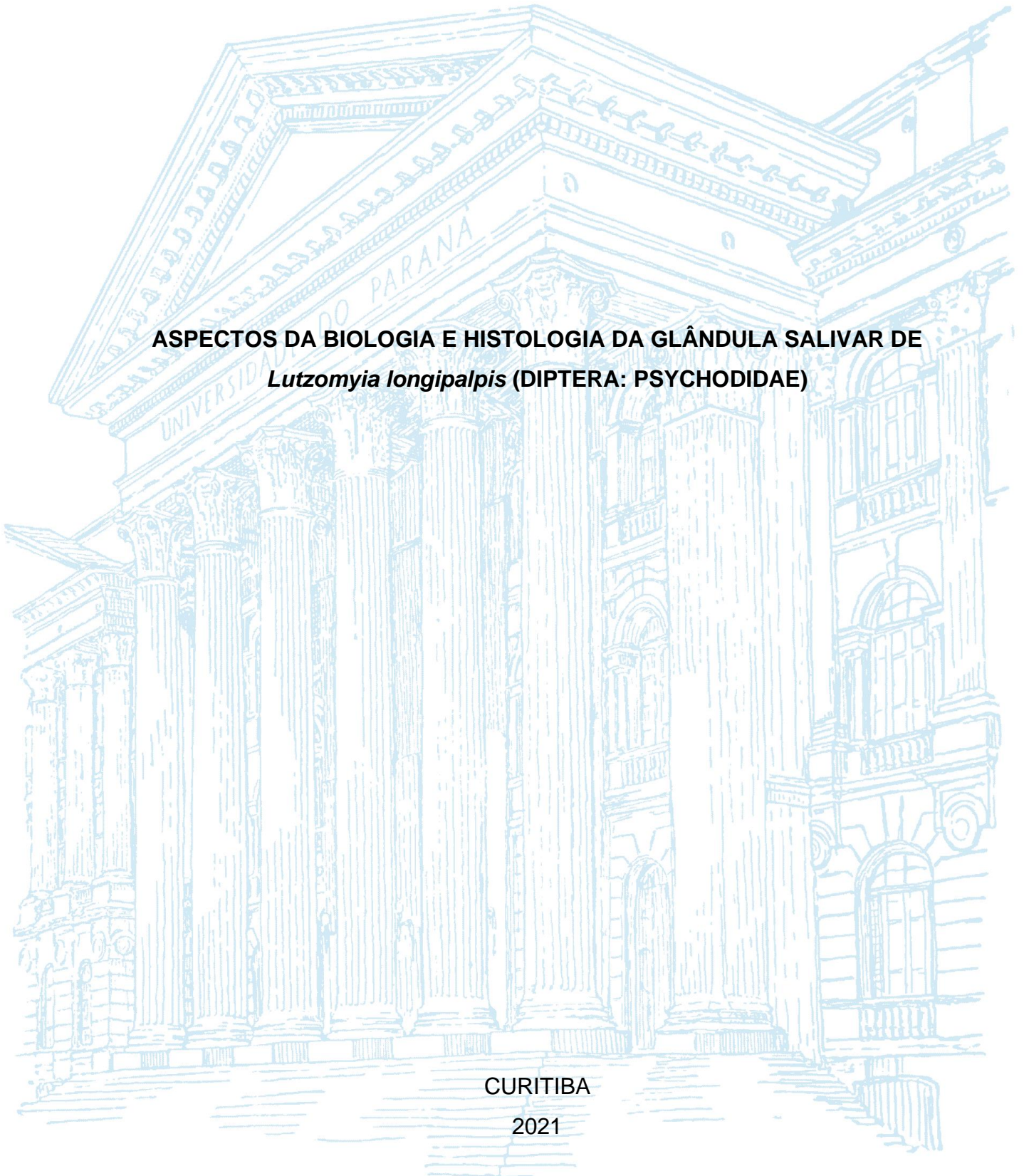
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SOFIA TOZZO BUENO DE LIMA

**ASPECTOS DA BIOLOGIA E HISTOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR DE
Lutzomyia longipalpis (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

CURITIBA

2021



SOFIA TOZZO BUENO DE LIMA

ASPECTOS DA BIOLOGIA E HISTOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR DE
Lutzomyia longipalpis (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro.

CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

SOFIA TOZZO BUENO DE LIMA

ASPECTOS DA BIOLOGIA E HISTOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR DE
Lutzomyia longipalpis (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Prof^a Dra. Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro
Orientadora - Departamento de Patologia, UFPR.

Prof^a Dra. Claudia Feijó Ortolani Machado
Avaliadora 2 - Departamento de Biologia Celular, UFPR.

Dra. Mariliza Cristine Vieira da Costa
Avaliadora 3 - Departamento de Biologia Celular, UFPR.

Cidade, 30 de dezembro de 2021.

A todo apoio e orientação recebidos ao longo do percurso.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Magda Clara Ribeiro, por suas importantes contribuições ao desenvolvimento do trabalho e por sua dedicação aos alunos.

Aos meus pais e família, que sempre me apoiaram e aconselharam.

Aos meus colegas e amigos pelo apoio e presença nessa caminhada de aprendizado.

Aos membros do Laboratório de Parasitologia e Biologia Celular, que me acolheram e concederam espaço, materiais e orientação.

À Universidade Federal do Paraná, que traz tanto conhecimento e tantas oportunidades, abrindo caminhos para o futuro.

O ser humano se diferencia dos outros animais por um cérebro altamente desenvolvido, um polegar opositor e por ser livre. Livre é o estado daquele que tem liberdade. Liberdade é uma palavra que o sonho humano alimenta que não há ninguém que explique e ninguém que não entenda.

Ilha das Flores, 1989.

RESUMO

Dada a importância da espécie *Lutzomyia longipalpis* na transmissão da Leishmaniose visceral, investigações a respeito de sua biologia e, em especial, da glândula salivar têm se mostrado de grande importância. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar fatores relacionados à biologia de *Lu. longipalpis* e ao perfil histológico da glândula salivar de fêmeas. Para a observação da quiescência, 20 ovos, em triplicata, foram individualizados em recipientes adaptados para criação de flebotômíneos e, mantidos nas condições: 1) três recipientes a 25°C e 80% de umidade relativa (UR) (N=60) (controle); 2) três recipientes a 12°C por 6 dias (N=60), 3) três recipientes a 12°C por 30 dias (N=60). Foram feitas observações diárias até a emergência dos adultos. As médias do tempo de desenvolvimento foram comparadas pelo teste ANOVA (R Studio versão 4.0.1). Para análise histológica das glândulas, as fêmeas foram alimentadas com sangue, açúcar e água. O abdômen foi retirado e, posteriormente, foram fixados em dois fixadores diferentes, para fins de comparação: 1) paraformaldeído (PFA) a 4% (12 horas) e, 2) ALFAC (16 horas). Em seguida, as amostras fixadas foram lavadas em concentrações crescentes de etanol, clarificadas em xilol e emblocadas em resina Paraplast®. As amostras fixadas em PFA foram cortadas em micrótomo (4µm), coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), *Alcian Blue* (AB) pH 1.0 e pH 2.5 e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Já as amostras fixadas em ALFAC, foram coradas somente com HE. Como resultado, não foi observada diferença significativa entre os ovos mantidos nas condições 1 e 2. Os ovos mantidos na condição 3, não se desenvolveram. A retomada do desenvolvimento indica que a quiescência pode ocorrer somente por um período curto de exposição a temperaturas adversas. A morfologia da glândula consiste em dois lobos envoltos por epitélio cúbico simples, que apresentou variação na espessura ao longo do desenvolvimento, embora não tenha sido mensurada. O conteúdo das glândulas apresentou mucinas neutras. A fixação com ALFAC permitiu a observação de detalhes do epitélio que não foram possíveis com PFA. Contudo, o uso do PFA possibilitou a visualização de estruturas presentes no lúmen da glândula que não foram observadas com ALFAC. Tratam-se de investigações inéditas na literatura e podem nortear estudos futuros nas linhas de pesquisa do laboratório.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*. Glândula salivar. Biologia. Histologia.

ABSTRACT

Given the importance of the species *Lutzomyia longipalpis* in the transmission of visceral leishmaniasis, investigations of its biology and, in particular, of the salivary gland have been of great importance. The objective of this study was to evaluate factors related to the biology of *Lu. longipalpis* and the histological profile of the salivary gland of females. For the observation of quiescence, 20 eggs, in triplicate, were placed in containers adapted for sand fly rearing and kept in the following conditions: 1) three containers at 25°C and 80% relative humidity (RH) (N=60) (control); 2) three containers at 12°C for 6 days (N=60), 3) three containers at 12°C for 30 days (N=60). Daily observations were made until emergence of adults. Development time means were compared by ANOVA test (R Studio version 4.0.1). For histological analysis of the glands, the females were fed blood, sugar and water. The abdomen was removed and then they were fixed in two different fixatives for comparison purposes: 1) 4% paraformaldehyde (PFA) (12 hours) and, 2) ALFAC (16 hours). The fixed samples were then washed in increasing concentrations of ethanol, clarified in xylene and embedded in Paraplast® resin. The samples fixed in PFA were cut in microtome (4µm), stained with Hematoxylin and Eosin (HE), Alcian Blue (AB) pH 1.0 and pH 2.5 and Periodic Schiff Acid (PAS). The ALFAC-fixed samples were stained only with HE. As a result, no significant difference was observed between eggs kept in conditions 1 and 2. The eggs kept in condition 3 did not develop. The resumption of development indicates that quiescence may occur only for a short period of exposure to adverse temperatures. The gland morphology consists of two lobes surrounded by simple cubic epithelium, which showed variation in thickness throughout development, although this was not measured. The content of the glands showed neutral mucins. Fixation with ALFAC allowed the observation of details of the epithelium that were not possible with PFA. However, the use of PFA allowed the visualization of structures present in the lumen of the gland that were not observed with ALFAC. These investigations are unprecedented in the literature and may guide future studies in the research lines of the laboratory.

Key words: *Lutzomyia longipalpis*. Salivary gland. Biology. Histology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO DE VIDA DOS FLEBOTOMÍNEOS	19
FIGURA 2: MATERIAIS UTILIZADOS PARA A CRIAÇÃO DA COLÔNIA DE FLEBOTOMÍNEOS	24
FIGURA 3: ORIENTAÇÃO DO INSETO PARA O CORTE	28
FIGURA 4: MORFOLOGIA GERAL DA GLÂNDULA SALIVAR	34
FIGURA 5 : VISÃO GERAL DA GLÂNDULA SALIVAR DAS FÊMEAS DE <i>Lu. longipalpis</i>	34
FIGURA 6: MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS SUBMETIDAS A DIFERENTES FONTES DE ALIMENTO.	35
FIGURA 7: PROJEÇÕES CELULARES DO EPITÉLIO DAS GLÂNDULAS	36
FIGURA 10: GLÂNDULAS PARCIALMENTE VAZIAS	39
FIGURA 11: DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES - FIXADAS EM PFA	40
FIGURA 12: GLÂNDULAS CORADAS COM AB E PAS	44

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Estádios larvais segundo Kendrick et al. (1977) comparadas à caracterização considerada neste trabalho.	25
QUADRO 2: TESTES COM SOLUÇÃO FIXADORA (PFA).....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Duração dos estádios de desenvolvimento de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sob as temperaturas de 25°C e 12°C.....	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ALFAC	- Etanol, Formaldeído e Ácido Acético Glacial
AB	- <i>Alcian Blue</i>
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
GOX	- Salivary Glucose Oxidase
HE	- Hematoxilina e Eosina
LV	- Leishmaniose Visceral
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PAS	- Ácido Periódico de Schiff
PBS	- Tampão fosfato-salino
PFA	- Paraformaldeído
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UR	- Umidade Relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

© - Copyright

® - Marca registrada

°C - Graus Celsius

µm - Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 JUSTIFICATIVA.....	17
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 Objetivos gerais	Erro! Indicador não definido.
1.2.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 VETOR	18
2.2 GLÂNDULA SALIVAR.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 OBTENÇÃO E CRIAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	22
3.2 AVALIAÇÃO DO CICLO DE VIDA.....	24
3.3 HISTOLOGIA	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 CICLO DE VIDA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2 HISTOLOGIA	33
4.2.1 Anatomia e morfologia	33
4.2.2 Histoquímica	43
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
5.1 CONCLUSÕES.....	46
5.2 PERSPECTIVAS.....	47
6 REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (ANVERSA et al., 2018). Esse gênero compreende parasitos digenéticos, que durante seu ciclo evolutivo necessitam de hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados, insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, responsáveis pela transmissão dos parasitos para os hospedeiros vertebrados. A transmissão se dá através da picada da fêmea de flebotomíneo positiva para *Leishmania* spp infectada (ESPÍRITO SANTO, 2015). Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de provocar a patologia (WHO,2020; DNDi América Latina, 2020), transmitidas por mais de 90 espécies de flebotomíneos em todo o mundo (WHO, 2020).

A Organização Mundial da Saúde – OMS – considera as leishmanioses como uma das sete doenças infecciosas mais importantes, devido ao alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades e levar a óbito (ARENAS et al., 2017; BRASIL, 2021). As leishmanioses podem apresentar características clínicas epidemiológicas diversas, de acordo com a região geográfica em que ocorre. Suas manifestações variam de lesões ulceradas simples na pele, à visceral, com manifestações graves (DNDi América Latina, 2020), que se não tratadas podem levar a óbito em até 90% dos casos (Portal FIOCRUZ, 2018; BRASIL, 2021).

Se tratando da forma visceral da doença na América, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) é a principal espécie de flebotomíneo responsável pela transmissão do agente etiológico *Leishmania infantum chagasi* (SOARES; TURCO, 2003). É uma espécie que se desenvolve bem em laboratório e sob temperaturas mais altas (até 32°C) apresenta o ciclo de vida mais rápido (FREIRE et al., 2006), com maior atividade noturna (RIVAS et al., 2014). No entanto, quando se trata de resistência térmica a baixas temperaturas, os estudos para essa espécie são escassos.

A transmissão da *Leishmania* do inseto para o hospedeiro ocorre durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do flebotomíneo regurgita promastigotas metacíclicas. Nesse momento, são secretados também proteofosfoglicanos e diversos componentes salivares da glândula do vetor (KAYE; SCOTT, 2011). Os componentes da saliva são responsáveis por garantir o sucesso na alimentação através da atividade

anti-hemostática, vasodilatadora e anti-inflamatória, entre outras. Além disso, a saliva tem mostrado um importante efeito imunomodulador, essencial para determinar o curso da infecção no hospedeiro (SOARES; TURCO, 2003).

Para alguns insetos, sabe-se que a dieta consumida influencia na composição da saliva: em *Aedes aegypti*, por exemplo, o fator de expressão salivar pode variar de acordo com a realização da alimentação sanguínea do inseto (GUERRERO et al., 2020). Em larvas de *Spodoptera exíqua* (Lepidoptera) a atividade da enzima Salivary Glucose Oxidase (GOX), que catalisa uma reação química que leva a formação de um carboidrato indisponível na dieta, varia de acordo com a nutrição fornecida (BABIC et al., 2008). Em flebotomíneos, a fonte de sangue fornecida pode alterar o tempo de desenvolvimento e eclosão dos ovos. Não foram encontrados estudos a respeito da influência das diferentes fontes de alimentação possíveis para as fêmeas de flebotomíneo ao longo da vida, quando se trata de suas glândulas salivares.

1.1 JUSTIFICATIVA

No que diz respeito à biologia e ao desenvolvimento do vetor, quando se trata do combate às leishmanioses, ações voltadas ao controle do inseto são fundamentais. As mudanças climáticas e fatores como desmatamento, têm contribuído para a expansão de *Lutzomyia longipalpis* para ambientes antropogênicos (PETERSON, 2017). Dessa maneira, conhecer a influência da temperatura na sobrevivência e manutenção da população desses insetos é de extrema importância.

Adicionalmente, a saliva apresenta um importante papel na transmissão da *Leishmania* spp e, conseqüentemente na epidemiologia da leishmaniose visceral (LV). Além disso, sabe-se que a dieta afeta o conteúdo presente na glândula salivar de outros insetos. Porém, até o momento, não há na literatura estudos acerca do desenvolvimento e morfologia de sua glândula salivar, frente a diferentes fontes de alimentação para *Lutzomyia longipalpis*.

1.2 OBJETIVOS

Investigar a influência da temperatura no ciclo de vida de *Lutzomyia longipalpis* e caracterizar morfologicamente sua glândula salivar.

1.2.1 Objetivos específicos

- I) Avaliar o desenvolvimento de ovo a adulto de espécimens de *Lu. longipalpis* sob temperatura de 12°C;
- II) Avaliar a morfologia da glândula salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis* expostas ao açúcar 30% e repasto sanguíneo em camundongos Balb/C, após 24h, 48h e 72h.
- I) Avaliar aspectos histoquímicos da do conteúdo da salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis* expostas ao açúcar 30% e repasto sanguíneo em camundongos Balb/C, após 24h, 48h e 72h.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VETOR

No Brasil, *Lu. longipalpis* é um complexo de espécies intimamente relacionadas morfologicamente, que diferem em características químicas, comportamentais, reprodutivas e moleculares. A existência desse complexo, auxilia a entender a variação da composição salivar, plasticidade térmica e, como relatado por LAINSON e RANGEL (2005), a existência dos diferentes tipos de manifestação clínica da leishmaniose visceral (LV) na América Latina. *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie envolvida na transmissão do agente etiológico *Leishmania infantum* responsável pela LV, e se distribui amplamente na América do Sul (PINTO, 2003). No Brasil, essa espécie é amplamente distribuída e apresenta alta capacidade vetorial, com altas taxas de infecção natural e antropofilia (LAINSON et al., 2005).

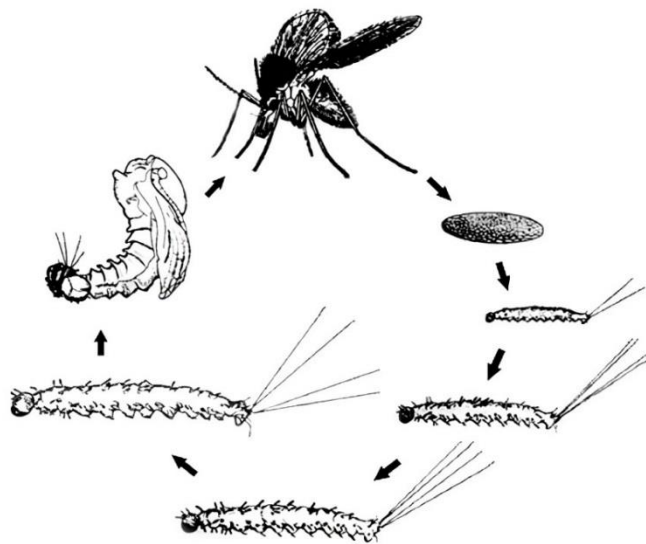
Entre os anos 1950 e 1980, a LV era prevalente em áreas rurais da região nordeste do país. No entanto, a partir daí a doença se apresentou em franca expansão, inclusive para áreas urbanas (SOCCOL et al., 2017). Na região sul, apesar de recente, a expansão é significativa. Em 2009, a presença do vetor foi registrada no Rio Grande do sul. Em 2010 foi reportado o primeiro caso de LV canina em Santa Catarina e, em 2017, o primeiro caso de LV humana (CALDART et al., 2018). No Paraná, o primeiro registro do vetor foi no ano de 2012, na cidade de Foz do Iguaçu (SANTOS et al., 2012; PARANÁ, 2020), e o primeiro caso da

doença em humanos foi registrado em 2015. Concomitantemente, a doença se expande na Argentina e no Paraguai (SOCCOL et al., 2017). Nesse sentido, dada a evidente expansão da doença, é essencial investigar fatores relacionados a expansão do vetor, principalmente no que concerne aos limites térmicos que restrinjam ou favoreçam a sua dispersão.

Lutzomyia longipalpis é extremamente adaptada às áreas urbanas e é facilmente encontrada em ambientes domiciliares. No peridomicílio, essa espécie é encontrada principalmente em proximidade das fontes de alimento, que podem ser diversificadas e incluem animais silvestres e domésticos (NASCIMENTO, 2013). Essa espécie se alimenta de carboidratos obtidos em seiva de plantas, néctar e secreções de afídeos (SALES, 2015), e o tipo de açúcar está associado a longevidade e sobrevivência do vetor (NWEZE et al., 2020).

As fêmeas apresentam hábito hematófago, em geral se alimentando de mamíferos (ARENAS et al., 2017). A exclusividade deste hábito em fêmeas está relacionada à necessidade do sangue para a maturação dos ovos (CABRERA, 1999; SILVA, 2009). Os flebotomíneos apresentam desenvolvimento holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adultos, com um ciclo de duração média de 30 a 45 dias, de acordo com a espécie e condições ambientais (NASCIMENTO, 2013).

FIGURA 1: CICLO DE VIDA DOS FLEBOTOMÍNEOS



Legenda: Partindo do adulto para a direita, se encontram os estágios de ovo, larva (L1, L2, L3 e L4) e pupa. Fonte: http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm (2021).

Fatores ambientais como temperatura, umidade relativa e precipitação, afetam de maneira direta ou indireta diversos aspectos das espécies ectotérmicas. Os insetos vetores são altamente sensíveis a temperatura, mas possuem uma plasticidade na resposta térmica que permite a sobrevivência fora do alcance de sua suposta curva climática (STERNBERG; THOMAS, 2014). Alguns fatores influenciados pela temperatura são reprodução, desenvolvimento, frequência de repasto sanguíneo, resposta imune, susceptibilidade à infecção e crescimento, dentre outros (HORTA et al., 2014; STERNBERG; THOMAS, 2014).

Diversas populações de insetos apresentam variação na resposta térmica, que pode estar associada, dentre outros fatores, às condições ambientais nas quais essas espécies vivem. Essa plasticidade na resposta já foi relatada em populações de *Drosophila melanogaster*, mosquitos *Anopheles*, *Glossina sp* (mosca tsé-tsé), *Anaphes victus* (Hymenoptera), *Papilio canadenses* (Lepidoptera) e *Aedes spp*, dentre outras. Quando existe uma variação espacial na seleção, devido fatores ambientais, como a temperatura, observa-se a adaptação local (HORTA et al., 2014; STERNBERG; THOMAS, 2014).

Sabe-se que as flutuações climáticas sazonais produzem um efeito na dinâmica das doenças vetoriais, como a maior incidência de determinadas doenças durante um período específico do ano. Por exemplo, a maior incidência da dengue é no verão e da malária na Amazônia, se dá em períodos de estiagem.

O aquecimento global, provocado principalmente pelo aumento da emissão de gases de efeito estufa, por ação humana, resultará em mudanças climáticas globais a médio e longo prazo (BARCELLOS et al., 2009). De acordo com o relatório mais recente publicado pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2021), a influência humana provocou o aumento da temperatura atmosférica, oceânica e terrestre. A temperatura da superfície global é 1.09°C maior no período de 2011-2020 do que era no período de 1850-1900. Além de alterações na temperatura global, observa-se e projeta-se um aumento no nível do mar e alterações importantes nos índices de precipitação (IPCC, 2021).

A tendência climática para o Estado do Paraná é de maior aumento da temperatura mínima em relação à temperatura máxima. Isso sugere uma diminuição na amplitude térmica. As temperaturas mínimas são mais intensas, mas menos frequentes (MINUZZI et al., 2011). Curitiba é um município que ao longo dos anos registra um importante número de ondas de frio rigorosas, ainda que

venha apresentando uma diminuição nos registros (SILVEIRA et al., 2017). De acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2021), as médias de temperatura nos meses iniciais do inverno ficaram em torno de 15°C nos últimos três anos, na região de Curitiba.

A resposta dos insetos às mudanças de temperatura varia também com relação à precipitação e cobertura vegetal. Vetores e parasitos que habitam microclimas estáveis apresentam, em geral, faixas operativas reduzidas em comparação com as populações que habitam ambientes térmicos altamente variáveis (STERNBERG; THOMAS, 2014). Para a espécie *Lu. longipalpis*, estudos apontam que sob temperaturas mais altas, o inseto se desenvolve mais rapidamente e é mais ativo (FREIRE et al., 2006; RIVAS et al., 2014).

Para a espécie do Velho Mundo, *P. papatasii*, os limites térmicos foram definidos por Theodor (1936). A temperatura máxima, letal após uma hora de exposição das fêmeas adultas e de larvas foi de 41°C. O limite mínimo de temperatura foi de -5°C por duas horas para adultos e de 30 minutos a -10°C para as larvas. De acordo com Benkova e Volf (2007), para a mesma espécie, temperaturas mais baixas tornam os processos metabólicos mais lentos, além de fazer com que a defecação, a oviposição e a eclosão dos ovos inicie mais tardiamente leve mais tempo para ser concluída. Contudo, inexistem estudos que avaliem o efeito da temperatura com espécies do Novo Mundo.

2.2 GLÂNDULA SALIVAR

A glândula salivar dos flebotomíneos é descrita por Nacif-Pimenta e colaboradores (2020) como um órgão pareado composto por duas estruturas saculares (lobos), unidas por um ducto salivar. Em relação à composição da saliva, muito tem-se estudado sobre o papel dos componentes da saliva dos flebotomíneos na determinação da reação local após a picada (ARENAS et al., 2017; SILVA, 2009). No momento do repasto sanguíneo, a fêmea deposita o conteúdo da glândula salivar no local da picada. Os componentes da saliva possuem ação vasodilatadora, anticoagulante e anti-agregação plaquetária, que desempenham um importante papel contra a hemostasia do hospedeiro e favorece a alimentação do inseto.

Além disso, as proteínas salivares têm capacidade de alterar a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro, o que pode exacerbar ou proteger da infecção pelo patógeno (TEIXEIRA et al., 2005; CARREGARO et al., 2015; SILVA, 2009). A saliva desses insetos é composta principalmente por nucleosídeos e proteínas que são, em sua maioria, solúveis e injetadas em baixas concentrações na pele do hospedeiro (ABDELADHIM et al., 2014). A quantidade e composição salivar varia de acordo com a idade do vetor, a sazonalidade ambiental e a presença do patógeno (COUTINHO-ABREU et al., 2015).

Sabe-se ainda que a alimentação do inseto (com açúcar ou sangue) influencia no conjunto de enzimas que estarão presentes na saliva (PRATES et al., 2008). O uso da saliva como biomarcador para exposição do vetor é uma abordagem recente e promissora, que se baseia nos anticorpos produzidos no hospedeiro, decorrentes da exposição às proteínas salivares (COUTINHO-ABREU et al., 2015). O estudo da composição e atividade dos componentes salivares das glândulas dos flebotomíneos é uma área de crescente interesse e, recentemente, muito se tem descoberto a respeito de novos compostos e funções (ABDELADHIM et al., 2014; LESTINOVA et al., 2017; ARCÀ ; RIBEIRO, 2018; MONDRAGON-SHEM et al., 2020).

Até o momento, não há na literatura, estudos sobre os efeitos das diferentes alimentações sobre as características morfológicas e histológicas da glândula salivar de *Lu. longipalpis*. Dada a importância epidemiológica deste vetor, conhecer a influência da temperatura na sobrevivência e manutenção da população desses insetos, bem como as características relativas às glândulas salivares é de grande importância para o desenvolvimento de estudos e estratégias para o controle da LV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CRIAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

Fêmeas e machos de insetos da espécie *Lu. longipalpis* provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram mantidos no insetário do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Os adultos foram mantidos em recipientes de polietileno com

altura de 5 centímetros e diâmetro de 7,5 centímetros, com gesso úmido na parte inferior, tampados com um pedaço de tecido (*voil*), preso a tampa do próprio recipiente.

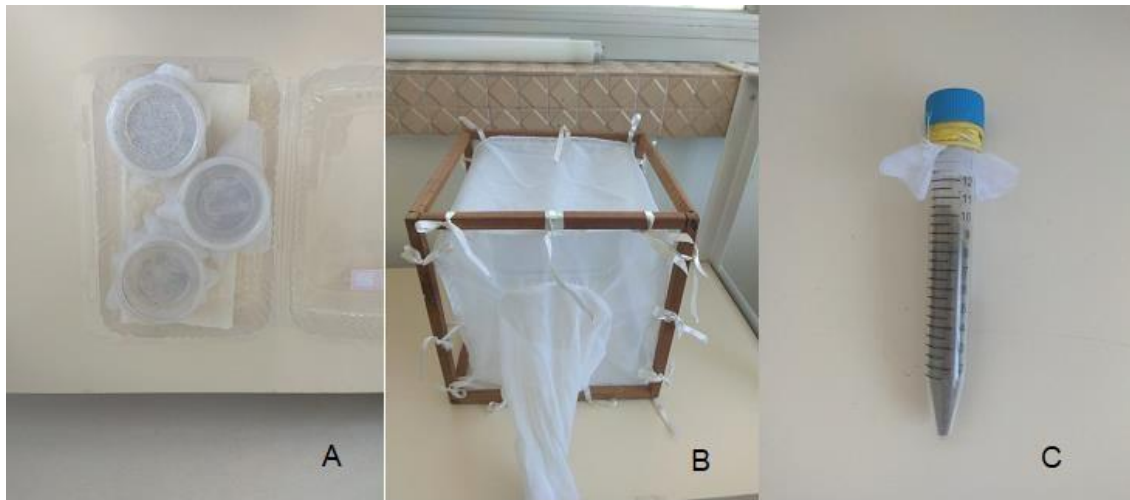
Como fonte de carboidratos, foi disponibilizado para os adultos (macho e fêmea) solução açucarada (30% melado de cana de açúcar, diluído em água destilada). Os recipientes foram mantidos em organizadores com papel toalha umedecido (Figura 2A) em estufa incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica) à 25°C e com aproximadamente 80% de UR.

Para a realização do repasto, foram utilizados camundongo Balb/C . Para este procedimento, o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o certificado de número 1334, Processo Sei nº23075.062623/2019-16, aprovado em 22/10/2019.

Para o repasto sanguíneo, foram utilizadas fêmeas de mesma idade fisiológica provenientes de diferentes posturas, a fim de garantir maior variabilidade genética nas gerações seguintes. As fêmeas ficavam em jejum por aproximadamente 48 horas e, depois disso, eram transferidas para uma gaiola de *voil* de dimensões de 25 cm x 25 cm x 25 cm (Figura 2B). O repasto sanguíneo das fêmeas foi realizado no interior das gaiolas de *voil*, pelo tempo aproximado de 20 a 30 minutos, em camundongos provenientes do biotério da UFPR. Em seguida, as fêmeas eram transferidas para o recipiente de gesso e mantidas com solução açucarada até a oviposição.

Após a oviposição, que leva em torno de 3 a 5 dias depois do repasto sanguíneo, à medida em que os adultos morriam, eram retirados dos recipientes, restando somente os ovos. Para os estádios larvais de L1 a L4, utilizou-se ração (Figura 2C), composta de ração para peixe, ração para coelho, fezes de coelho e terra (na proporção de 1:1:1:1). Essa ração foi seca em estufa e passada em peneira tamis, conforme a metodologia descrita por Goulart e colaboradores (2015). Ao atingirem o estágio de pupa, a ração era suspensa.

FIGURA 2: MATERIAIS UTILIZADOS PARA A COLÔNIA DE FLEBOTOMÍNEOS



Legenda: Materiais utilizados para a criação dos flebotomíneos. A) Organizador com os recipientes para criação. B) Gaiola para realização do repasto. C) Ração fornecida às larvas. Fonte: A autora (2021).

3.2 AVALIAÇÃO DO CICLO DE VIDA.

Para a observação do desenvolvimento do ciclo de vida de *Lu. longipalpis*, 20 ovos foram individualizados em três recipientes adaptados para a criação de flebotomíneos, em triplicata, para cada grupo experimental. Os bioensaios foram conduzidos sob as condições:

- 1) três recipientes com 20 ovos, sob temperatura constante de 25°C e UR 80%, durante todo o período de desenvolvimento do inseto, de ovo a adulto. Essa condição foi o grupo controle (N=60 ovos);
- 2) três recipientes com 20 ovos, sob temperatura constante de 12°C e UR de aproximadamente 70% durante cerca de 6 dias. A permanência dos ovos nessa condição decorreu até o momento da eclosão dos ovos do grupo controle. Depois desse período, os recipientes foram transferidos para a temperatura constante de 25°C e UR 80% (N=60 ovos);
- 3) três recipientes com 20 ovos, sob temperatura constante de 12°C e UR de aproximadamente 70%. A permanência dos ovos nessa condição foi de 30 dias. Após esse período, eles foram transferidos para a condição experimental do controle (25°C/UR 80%) pelo período de 30 dias. (N=60 ovos).

A respeito do período larval, vale ressaltar que existe divergência na literatura a respeito dos caracteres que marcam a diferença entre os estágios larvais, visto que

o aspecto geral dos demais estágios são bastante similares (SECUNDINO et al., 1999). Apesar de Kendrick e colaboradores (1977) descreverem a duração e características morfológicas dos diferentes estágios larvais de *Lu. longipalpis* em condições de laboratório, essas não foram as características mais evidentes observadas. Deste modo, foi elaborado um quadro (Quadro 1) com as características relevantes utilizadas nessa diferenciação.

QUADRO 1: Estádios larvais segundo Kendrick et al. (1977) comparadas à caracterização considerada neste trabalho.

Estádio larval	Duração (dias)	Morfologia (Kendrick et al., 1997)	Morfologia considerada
L1	3 a 6	Único par de cerdas caudais	Único par de cerdas caudais
L2	2 a 4	Duplo par de cerdas caudais	Duplo par de cerdas caudais
L3	1 a 5	Aumento do tamanho da cápsula cefálica	Pigmentação posterior do 9º tergito
L4	3 a 9	Pigmentação posterior do 9º tergito	Esvaziamento do tubo digestivo e aumento da massa corporal

FONTE: A autora (2021).

Foram realizadas observações diárias para a temperatura, UR e estágios imaturos (Larvas 1, 2, 3 e 4) até a emergência dos adultos. A distinção entre os estágios L3 e L4 foi baseada na maior espessura do corpo e esvaziamento do tubo digestivo em L4. Para a análise dos dados foram feitos os testes de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da distribuição dos dados e teste de Bartlett, para avaliar a homogeneidade das variâncias. As médias foram comparadas pelo teste de Análise de Variância de uma via (One-Way ANOVA), (R Studio versão 4.0.1). Os níveis de significância considerados para todos os testes foram de 5% ($p < 0,05$).

3.3 HISTOLOGIA

Para realização dos estudos morfológicos e histológicos, foi necessária a padronização da metodologia para *Lu. longipalpis*. O processo de padronização envolveu testes com diferentes tipos e concentrações de fixadores, tempos para desidratação e demais etapas do processamento, e treinamento para a orientação e corte adequados. Para a obtenção das glândulas, as fêmeas foram anestesiadas em freezer (-20°C) por aproximadamente cinco minutos e submetidas à dissecação do

abdômen sob um microscópio estereoscópio, com o auxílio de estiletes entomológicos de espessura 0,25 mm, sob lâmina escavada contendo uma gota de solução fixadora (PFA) ou de solução tampão (PBS).

I) Fixação

Ao longo do desenvolvimento do trabalho, os insetos foram submetidos a dois tipos de fixadores: ALFAC (etanol, formaldeído e ácido acético) e PFA (paraformaldeído).

Fixação em ALFAC

Para a observação de aspectos relacionados à morfologia e ao desenvolvimento da glândula salivar, fêmeas foram alimentadas com 24h de nascidas, e dissecadas 24h, 48h e 72h depois do fornecimento da alimentação. A utilização destes tempos de alimentação com as amostras fixadas em ALFAC foi possível devido ao número suficiente de fêmeas nascidas com a mesma idade fisiológica, que possibilitou que um maior número de fêmeas se alimentasse depois de 24h do nascimento. O abdômen foi retirado com auxílio de estiletes entomológicos sob microscópio, em uma lâmina contendo PBS 1X. Os insetos dissecados foram fixados em ALFAC durante 16 horas e mantidos em geladeira. A composição deste fixador seguiu as proporções:

- I- 85% de etanol absoluto
- II- 10% de formalina
- III- 5% de ácido acético glacial

Em seguida, as amostras foram mantidas em etanol 70% pelo período mínimo de 24h e máximo de sete dias.

Fixação em paraformaldeído (PFA)

Para a caracterização histoquímica das glândulas salivares, fêmeas com idade fisiológica de 48h, foram alimentadas com solução açucarada, sangue ou água (controle), e dissecadas após 24h, 48h e 72h, após a alimentação. O tempo de alimentação das fêmeas (48h após o nascimento) utilizado com este fixador se deu

pelo baixo número de fêmeas de mesma idade fisiológica obtidas. Isso fez com que um número insuficiente de fêmeas se alimentasse com 24h de nascimento, e como consequência, a alimentação foi adiada para 48h após o nascimento dos insetos.

Diferentes tempos e concentrações da solução fixadora (PFA) foram testados, para determinação da metodologia a ser empregada (Quadro 2). Os testes indicaram que, pela melhor preservação do tecido, o melhor resultado seria obtido com o tempo de fixação de 12h, na concentração de 4%. Então, para a observação da glândula salivar, fêmeas sem o abdômen foram fixadas em PFA 4%, durante 12 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foram mantidos em etanol 70% pelo período mínimo de 24h e máximo de sete dias.

QUADRO 2: TESTES COM SOLUÇÃO FIXADORA (PFA)

Tempo de fixação	12h	24h
Concentração da solução	2%	4%

Legenda: Diferentes tempos e concentrações de solução fixadora de paraformaldeído testados com amostras do inseto dissecado. Fonte: A autora (2021).

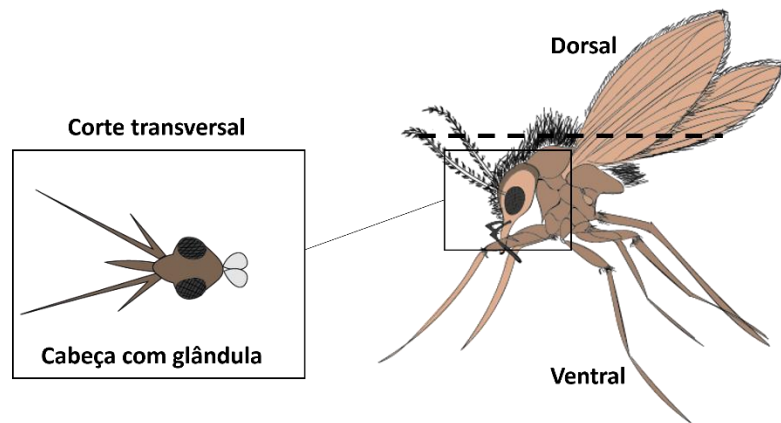
II) Desidratação e infiltração

Depois do período de imersão nos fixadores, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, nas concentrações 80, 90, 95 e duas vezes em 100% por dez minutos em cada. As amostras foram clarificadas duas vezes em xilol durante cinco minutos, e passadas para inclusão em três banhos de Paraplast®, por aproximadamente 15 minutos cada, em estufa a 60°C.

III) Orientação, inclusão e microtomia

Após a retirada da estufa, as amostras foram orientadas com o auxílio de pinças e estiletos, sob microscópio estereoscópio (Tecnival, SQF-F). Os insetos foram orientados de modo que os cortes fossem transversais, e se iniciassem da parte dorsal para a parte ventral, conforme demonstrado na Figura 2.

FIGURA 3: ORIENTAÇÃO DO INSETO PARA O CORTE



Legenda: Posicionamento para o corte da glândula de *Lutzomyia longipalpis*. A: recorte da região da cabeça do inseto, em orientação adequada para o corte. B: Inseto sem abdômen. O traçado indica o sentido dos cortes. Fonte: A autora (2021).

O processo de emblocagem foi realizado com o auxílio de cassetes histológicos e placa aquecida e o bloco com a amostra foi preenchido com Paraplast®. Após a polimerização do bloco, foram realizados cortes de 4µm em micrótomo (Leica® RM2145), retirados com uma pinça e colocados sobre gotas de água destilada em lâminas contendo albumina. Os cortes foram distendidos sobre placa aquecida (50-60°C) e as lâminas foram secas em estufa por aproximadamente 40 minutos a 60°C.

IV) Coloração

Para o processo de coloração, todas as lâminas foram imersas duas vezes durante três minutos em xilol. Em seguida, foram hidratadas em série decrescente de etanol (100%, 95%, 90%, 80% e 70%) por um minuto em cada concentração. As lâminas foram hidratadas em água destilada por um minuto, e coradas de acordo com o protocolo:

Para as amostras fixadas em ALFAC, foi realizada coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Já as fixadas em paraformaldeído, foram coradas com HE, *Alcian Blue* (AB) pH 1.0, AB pH 2.5 e PAS.

- **Hematoxilina e Eosina:** As lâminas foram submersas por 10 segundos (ALFAC) ou um minuto (PFA) em Hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente e água destilada (para amostras fixadas com PFA foi adicionada a água uma pequena

quantidade de hidróxido de amônia -10%). Em seguida, foram lavadas em água destilada e, então, imersas por 5 segundos (ALFAC) ou 30 segundos (PFA) em Eosina Floxina e lavadas novamente em água destilada. Na sequência passaram por etanol 95%, duas vezes em etanol 100% durante 30 segundos em cada imersão, em etanol+ xilol (1:1) por um minuto e, duas vezes em xilol durante três minutos.

- ***Alcian Blue (AB)***: As lâminas foram imersas por trinta minutos em AB (pH1.0 ou 2.5), lavadas em água corrente e coradas por um minuto e vinte segundos em Hematoxilina de Harris (contra coloração). Posteriormente, foram lavadas por dez minutos em água corrente. As lâminas foram secas em estufa e passadas duas vezes em xilol por três minutos cada banho.
- ***Ácido Periódico de Schiff (PAS)***: As lâminas foram imersas por quinze minutos em ácido periódico, lavadas em água corrente e, no escuro, imersas por quinze minutos em reativo de Schiff. Após a coloração foram lavadas em água corrente e contra coradas por dez segundos em Hematoxilina de Harris, lavadas novamente e desidratadas rapidamente em banhos crescentes de etanol 95%, duas vezes em etanol 100%, etanol com xilol (1:1) e diafanizadas por três minutos em xilol I e II.

V) Montagem das lâminas e análise

As lâminas foram montadas com meio de montagem (Entellan®) e lamínula. Inicialmente foi realizada a pré-seleção dos cortes íntegros em microscópio (Olympus® B202). As lâminas selecionadas foram fotografadas em câmera DP74 (Olympus®) acoplada ao microscópio (Olympus® DP72), utilizando *software* Cell-F, no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da UFPR. As imagens foram analisadas com o *software* Fiji (NIH – *National Institutes of Health*). Foi realizada análise qualitativa das estruturas, formato e conteúdo das glândulas salivares.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXIGÊNCIA TÉRMICA

A duração média do ciclo de vida de *Lu. longipalpis* foi de 37 dias para a temperatura controle, 43 dias para os insetos que alternaram de 12°C para 25°C, e para o grupo que permaneceu a 12°C, não houve desenvolvimento (Tabela 1). A diferença na duração do ciclo entre o grupo controle (1) e grupo (2) não foi significativa. De fato, a diferença observada na fase de pupa e de larva foi menor e, maior para a eclosão das larvas. O tempo de desenvolvimento do ciclo de ovo a adulto dos insetos expostos a diferentes temperaturas é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Duração dos estádios de desenvolvimento de *Lutzomyia longipalpis* sob as temperaturas de 25°C e 12°C.

Desenvolvimento (dias)

Grupo Experimental	Bioensaio	Ovo	L1	L2	L3	L4	Pupa	Total
1 (N=180)	25°C	5	5.4	7.1	7.3	1.2	11.2	37.3
2 (N=180)	12°C para 25°C	11.2	4.8	7.1	6.7	1.9	12.1	43.7
3 (N=180)	12°C	30	-	-	-	-	-	-

Legenda: L1 a L4: Estádios das larvas. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Fonte: A autora (2021).

De acordo com a literatura, o tempo de desenvolvimento completo de *Lu. longipalpis* é variável, contudo, em temperatura ideal (aproximadamente 25°C), ocorre entre 28 e 45 dias (NASCIMENTO, 2013; RANGEL et al., 1986; SOARES; TURCO, 2003). Em flebotomíneos, o tempo para a eclosão dos ovos é dependente da temperatura e varia de seis a treze dias, em temperatura ideal (MARTINS et al., 2021; RANGEL et al., 1986). Neste trabalho, a média do tempo de eclosão variou de cinco dias (temperatura ideal) a onze dias (baixa temperatura).

Jeffries e colaboradores (2018) constataram um período menor, de três a quatro dias, provavelmente devido a fonte de sangue utilizada (coelhos ou humanos) e, temperatura (26 a 28°C). É relatado que o substrato fornecido às larvas e a fonte de sangue para as fêmeas influencia na duração do ciclo de vida dos flebotomíneos (JEFFRIES et al., 2018; MARTINS et al., 2021; SOARES ; TURCO, 2003).

A duração do período larval não apresentou diferença significativa entre os grupos 1 e 2. A duração dos quatro estádios larvais de L1 a L4 foi de 21 dias para o

grupo controle, e 20 dias para o grupo 2. A duração do período de pupa também não apresentou diferença significativa, sendo de 11 dias para o grupo controle e 12 dias para o grupo 2, o que parece estar dentro de uma variação normal no tempo de duração dos estágios de vida observados em condições de rotina na manutenção da colônia do insetário do laboratório onde o presente trabalho foi desenvolvido. O fato de haver eclosão e desenvolvimento dos ovos do grupo 2 demonstra capacidade de dormência quando submetidos a um curto período em temperatura estressante, ainda não relatada para essa espécie.

O termo dormência define um estado de adaptações para a interrupção do desenvolvimento, e em geral é acompanhada por supressão metabólica (GILL et al., 2017). A dormência pode ser classificada em diapausa ou quiescência. A diapausa é definida como um período de desenvolvimento suspenso em insetos e outros invertebrados durante condições ambientais desfavoráveis, que envolve controle hormonal e genético para sua programação. É uma resposta sazonal do organismo a mudanças previsíveis de condições ambientais, e geralmente ocorre na fase do ciclo de vida que é mais adaptado a resistir a severidade do clima.

A quiescência, por sua vez, é uma resposta direta a mudanças imprevisíveis, não sazonais. Não é um evento antecipadamente programado, controlado geneticamente, ou por hormônios, e acontece em condições desfavoráveis para o crescimento e desenvolvimento do inseto. Além disso, diferente da diapausa, não apresenta um tempo definido para sua duração, e uma vez que há o cessamento do estímulo que a induz, as atividades fisiológicas tendem a ser retomadas (DINIZ, 2018; GILL, 2017).

Ambos os processos de dormência são controlados e influenciados por fatores como fotoperíodo, temperatura, umidade, alimentação e localização geográfica. A temperatura pode desempenhar um papel importante, tanto na indução quanto no retorno da diapausa (GILL et al.2017). No presente trabalho, foi observado que os ovos submetidos por 30 dias à temperatura mais baixa (12°C) não se desenvolveram de ovo a adulto, mesmo sendo conduzidos após 30 dias à temperatura de 25°C. Isso indica que, nessas circunstâncias, os ovos não são capazes de retomar o desenvolvimento e, tornam-se inviáveis.

Em contrapartida, os ovos submetidos a um período mais curto, em média seis dias à 12°C, foram capazes de retomar o desenvolvimento quando fornecido um ambiente ideal para seu desenvolvimento. Tendo em vista o fato de que as fêmeas que

deram origem aos ovos utilizados neste experimento não passaram por condições adversas de temperatura, umidade ou fotoperíodo, pode-se dizer que o evento de dormência observado nos ovos do grupo 2 é de quiescência embrionária.

Além disso, pode-se constatar que a condição que levou ao processo de dormência e de retomada do desenvolvimento foi a mudança de temperatura, visto que todos os recipientes receberam as mesmas condições relacionadas a umidade e fotoperíodo. Assim, pode-se sugerir que a temperatura mais baixa, por um curto período, é capaz de induzir a quiescência dos ovos competentes, que a retomada do desenvolvimento ocorre após a exposição à temperatura controle e que a viabilidade dos ovos é restrita a um curto período de exposição à temperatura adversa, já que a exposição prolongada inviabilizou o desenvolvimento dos ovos.

Quando se trata de flebotomíneos, trabalhos acerca da capacidade de permanecer em dormência durante qualquer estágio do ciclo de desenvolvimento são escassos. Diapausa reprodutiva e embrionária, assim como dormência larval e embrionária são registradas em regiões com sazonalidade marcada, e são mais frequentes no último instar larval (READY, 2013). O trabalho de Tesh (1992) com *Phlebotomus perniciosus* demonstrou que a 15°C, esses insetos apresentam desenvolvimento lento, que cessa ao atingir o quarto instar larval, quando entra em diapausa. Ao fornecer o aumento de temperatura nos níveis de criação da colônia (25°C), a diapausa pode ser terminada.

Phlebotomus papatasi também apresenta diapausa registrada no quarto instar larval, assim como *P. ariasi*, *P. perniciosus* (READY ; CROSET, 1980) e *Phlebotomus occidentalis* (CHANIOTIS, 1967). Para essas espécies, a diapausa foi estimulada pela mudança de temperatura e fotoperíodo, e o desenvolvimento após a diapausa se apresentou de maneira mais lenta do que o usual. Para flebotomíneos tropicais, de acordo com Ready (2013), a diapausa não ocorreu.

Diniz (2018) em seu trabalho relata a ocorrência da quiescência em três gêneros de mosquitos: *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. Diferente do que foi observado no presente trabalho, Diniz (2018) traz exemplos de longos períodos de quiescência em *Ae. Aegypti*, e *Ae. (finlaya) notoscriptus*, que permaneceram viáveis por mais de um ano com taxa de eclosão de aproximadamente 9-13%. Apesar de não ter sido mensurado estatisticamente, a taxa de eclosão observada para *Lu. longipalpis* neste trabalho foi grande, visto que a maioria dos ovos eclodiu e se desenvolveu sem atrasos. Em culicídeos, o processo de quiescência se dá quando o embrião recebe a

influência de um estímulo externo, como por exemplo, a diminuição brusca da umidade no meio ou variação na temperatura, os quais sinalizam condições desfavoráveis no ambiente, impedindo o processo de eclosão larvária (DINIZ, 2018).

O processo de diapausa, por sua vez, é relatado para um número maior de espécies, e ocorre em diferentes fases do ciclo de vida (DINIZ, 2018). Thomas et al. (2012) relataram que ovos de *Aedes albopictus* foram expostos a um tratamento em temperaturas de 0 a -15°C durante 1h a 24h. A temperatura mínima de sobrevivência tolerada pelos ovos de *Ae. albopictus* na Europa após uma diapausa foi de -10°C para exposições de longo prazo (12h e 24h). As linhagens tropicais resistiram a temperaturas menos extremas (-2°C) e os ovos diapausados tiveram maior taxa de sucesso na incubação depois do tratamento, em relação aos ovos não diapausados.

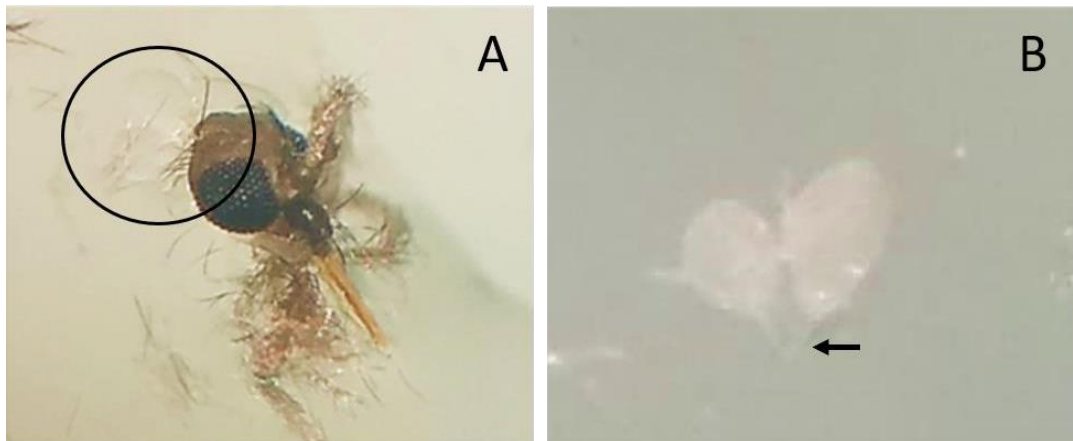
Neste trabalho, as temperaturas analisadas foram compatíveis com o clima do Paraná, e o tempo de exposição dos ovos ao frio foi consideravelmente maior (seis dias em média), o que pode fornecer um prospecto do padrão de resposta a longos prazos de exposição, demonstrando maior adaptação do inseto ao clima local. Isso porque as variações no tempo de quiescência dos ovos, bem como de suas taxas de eclosão, podem ser mecanismos que auxiliam na manutenção da população do inseto na natureza, mesmo frente a condições desfavoráveis (DINIZ, 2018). Os achados do presente trabalho, dentro do contexto de expansão e mudanças na distribuição do vetor e da LV são necessários e de extrema importância para a epidemiologia da LV.

4.2 HISTOLOGIA

4.2.1 Anatomia e morfologia

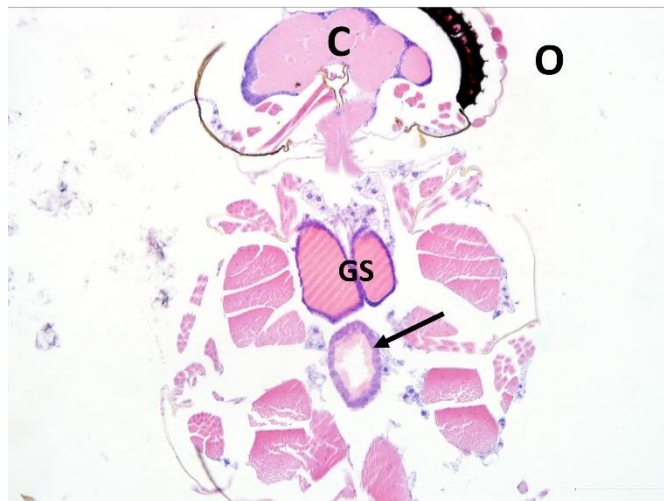
Para outros fins, não utilizados neste trabalho, as glândulas das fêmeas de *Lu. longipalpis*, foram dissecadas para posterior análise do conteúdo proteico. No momento de dissecção foi possível observar a anatomia geral da glândula salivar. Ela se encontra entre a cabeça e o tórax (Figura 4A) e é constituída por um par de lobos que se une formando um ducto salivar único (Figura 4B) que e, se estende até a probóscide.

FIGURA 4: MORFOLOGIA GERAL DA GLÂNDULA SALIVAR



Legenda: Glândula salivar dissecada. A) No centro do círculo, um par de glândula íntegra ainda anexada à cabeça de *Lu. longipalpis*. B) Par de lobos unidos por um ducto soltos da região da cabeça. Seta: Ducto salivar. Fonte: A autora (2021).

A análise da morfologia geral da glândula, possibilitada pela coloração com HE, revelou a presença de um par de lobos de tamanho diferentes, de formato alveolar, localizados entre a cabeça e a parte inicial do tórax (protórax). Como referência principal para localizar a glândula, foram utilizados os olhos compostos do inseto, visto que ficam bastante evidentes depois do processo de coloração.. Foi possível observar que o par de glândulas fica em contato direto, ou muito próximas de parte do intestino anterior do inseto (Figura 5). Nas lâminas histológicas, não foi possível observar o ducto salivar.

FIGURA 5 : VISÃO PANORÂMICA DA GLÂNDULA SALIVAR DAS FÊMEAS DE *Lu. longipalpis*

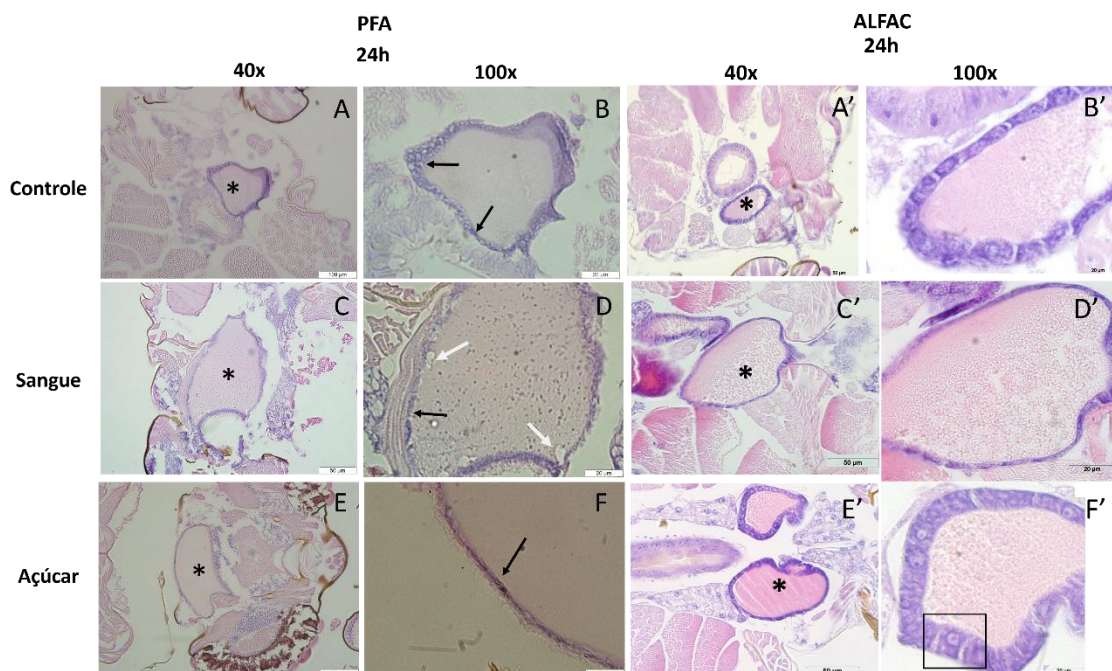
Legenda: Visão geral do corte transversal de *Lu. longipalpis*. C: Cabeça; O: Olho composto; GS: Glândula salivar; Seta: intestino. Aumento: 20x; Coloração: HE. Fixação: ALFAC.

A presença de ductos conectando o epitélio secretor à superfície é uma característica de células exócrinas, e auxilia na condução ou modificação da secreção

liberada, segundo Ovalle (2014). A observação da morfologia da glândula salivar por meio da coloração Hematoxilina e Eosina (HE), configura respectivamente a identificação de regiões celulares e teciduais de caráter ácido e básico. Uma coloração de áreas basófilas na célula corresponde a regiões ricas em ácidos nucleicos e, portanto, é de se esperar a coloração do núcleo celular e de regiões citoplasmáticas ricas em retículo endoplasmático granular.

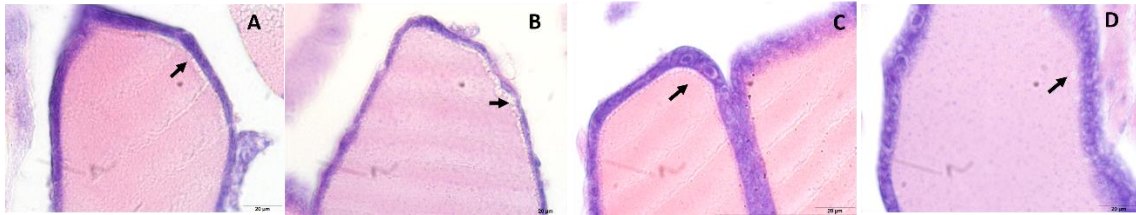
Foi possível distinguir o lúmen e o epitélio pelo caráter basófilo do primeiro em relação ao segundo. Os lobos são envoltos por células contíguas e altamente coesas, que constituem um epitélio simples. As células desse epitélio apresentam altura semelhante à largura, e núcleo esférico e central, características de células cúbicas (Figura 6B' e F'; Figura 7C) (Ovalle, 2014). Ainda, no lúmen glandular foi observada a presença projeções de algumas células e estruturas semelhantes a vesículas (Figura 6D), independente do tempo e tipo de alimentação ministrada (Figura 7). Essas características foram observadas tanto em insetos fixados em PFA quanto em ALFAC.

FIGURA 6: MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES SUBMETIDAS AO SANGUE E AÇUCAR.



Legenda: Cortes histológicos das glândulas de fêmeas de *Lu. longipalpis* submetidas a alimentação após 24h: A e B) água (controle), C e D) sangue, E e F) solução açucarada. *: Lúmen. Setas pretas: epitélio. D) Presença de grânulos no lúmen. Setas brancas: estruturas vesiculares. Quadrado: Célula cúbica com núcleo e nucléolo visíveis. Coloração HE. Fonte: A autora (2021).

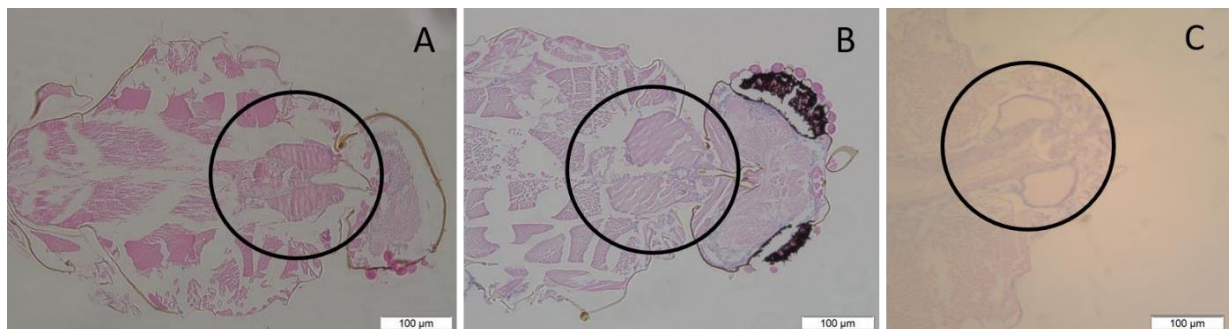
FIGURA 7: PROJEÇÕES CELULARES DO EPITÉLIO DAS GLÂNDULAS



Legenda: Vesículas e projeções observadas no lúmen. A: Sangue (48h após alimentação); B: Açúcar (48h após alimentação); C: Açúcar *24h após alimentação; D: Controle (24h após alimentação). Seta preta: vesículas e projeções de células epiteliais. Fixação em ALFAC. Coloração: HE. Fonte: A autora (2021).

Tanto durante a dissecação, quanto durante a observação das lâminas para o estudo da histologia percebeu-se que há diferença entre os lobos (Figura 8). Contudo, essa diferença não foi mensurada. Nieves e colaboradores (2010), observaram diferenças significativas no tamanho dos lobos da glândula de *Lu. ovallesi* e de *Lu. migonei*. Para algumas espécies do gênero *Phlebotomus*, vetor da LV no Velho Mundo, lobos de tamanho heterogêneo também foram descritos por Nacif-Pimenta et al. (2020). A espécie *Anopheles stephensi* possui três lobos, os quais apresentam clara distinção entre as regiões e tamanho do lobo (WRIGHT, 1969).

FIGURA 8: LOBOS DA GLÂNDULA SALIVAR



Legenda: Visão geral do par de lobos das glândulas salivares em objetiva de 20x. A) Inseto alimentado com sangue; B e C) insetos alimentados com água (controle). Coloração: HE. Fonte: A autora (2021).

No presente estudo, não se pode confirmar que as diferenças observadas entre o lobo esquerdo e direito sejam significativas, dado que a variação de tamanho pode ter relação com possíveis variações na altura e angulação dos cortes realizados, ou diferenças na orientação dos insetos no momento de emblocar. Além disso, a

quantidade de lâminas com o posicionamento desejado foi pequena, fato que impede análises quantitativas mais robustas. Porém, esses dados fornecem informações para estudos futuros. Nacif-Pimenta e colaboradores (2020), em contraponto, descreveram a presença de lobos de tamanho igual para *Lu. longipalpis*, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Apesar de essas técnicas fornecerem maior detalhamento de estruturas, apresentam custos mais elevados para sua execução.

A utilização dos diferentes fixadores possibilitou a marcação de diferentes aspectos da glândula salivar. O tipo de fixador pode afetar significativamente o resultado do trabalho, e para histologia de rotina, fixadores a base de formalina e ácido fornecem excelentes resultados para morfologia (BARBOSA et al., 2015). No presente estudo, os fixadores utilizados foram PFA e ALFAC. O número de amostras que permitiu uma visualização clara do formato das células epiteliais foi baixo, mas deve-se salientar que a posição do corte pode ter contribuído para esse resultado.

De acordo com Hopwood (1969), a fixação com etanol e ácido acético resulta na preservação de ácidos nucleicos. A adição de uma parte de ácido acético glacial ao volume total da solução fixadora evita que o etanol provoque contração do tecido. As vantagens da utilização do ALFAC são a penetração rápida e completa do formaldeído no tecido, possibilidade de armazenar a longo prazo e equilíbrio da retração do tecido, provocada pelo balanço entre etanol e ácido acético. A desvantagem principal é a toxicidade do formaldeído (PENNSTATE, 2021).

Já a utilização de formaldeído no processo de fixação, pode levar a retração do tecido em até 33% de seu volume inicial, dependendo da concentração utilizada (DEY, 2018). O formaldeído é capaz de inativar 80% das enzimas ribonucleases e reage com ácidos nucleicos, mais especificamente com o grupo amino dos nucleotídeos. A reação deste composto com as proteínas envolve a formação de uma ligação cruzada entre essas moléculas (HOPWOOD, 1969). Por isso, é considerado um bom fixador para manutenção da morfologia do tecido, manutenção da estrutura secundária e terciária das proteínas. (HOPWOOD, 1969; DEY, 2018).

Entre as vantagens de se utilizar o formaldeído como fixador estão a rápida taxa de penetração, a boa preservação da morfologia celular, o baixo custo, a estabilidade, a facilidade de fazer a solução fixadora, e a efetividade da fixação para colorações de rotina (DEY, 2018). As desvantagens estão no fato de apresentar fixação lenta, provocar artefatos em tecidos ricamente vascularizados, e alta toxicidade para a pele

e mucosas. Com relação ao uso para histoquímica, o formaldeído não é adequado para marcação de mucopolissacarídeos ácidos (DEY, 2018).

As amostras fixadas em ALFAC apresentaram melhor resultado em relação a fixação em PFA. Em uma visão geral, os músculos e tecido conjuntivo apresentaram mais nitidez. Foi possível observar grânulos de caráter basófilo e vesículas no lúmen da glândula, o formato e delimitação das células epiteliais, incluindo núcleo e nucléolo (Figura 6F' e 7C), em algumas amostras. Além disso, foi possível observar a presença de secreção em glândulas cheias e em glândulas com o lúmen parcialmente vazio (Figura 9). O epitélio íntegro dessas glândulas, evidente nas figuras 9B' e 9D' sugere que a presença de secreção em somente parte da glândula não seja um artefato de técnica.

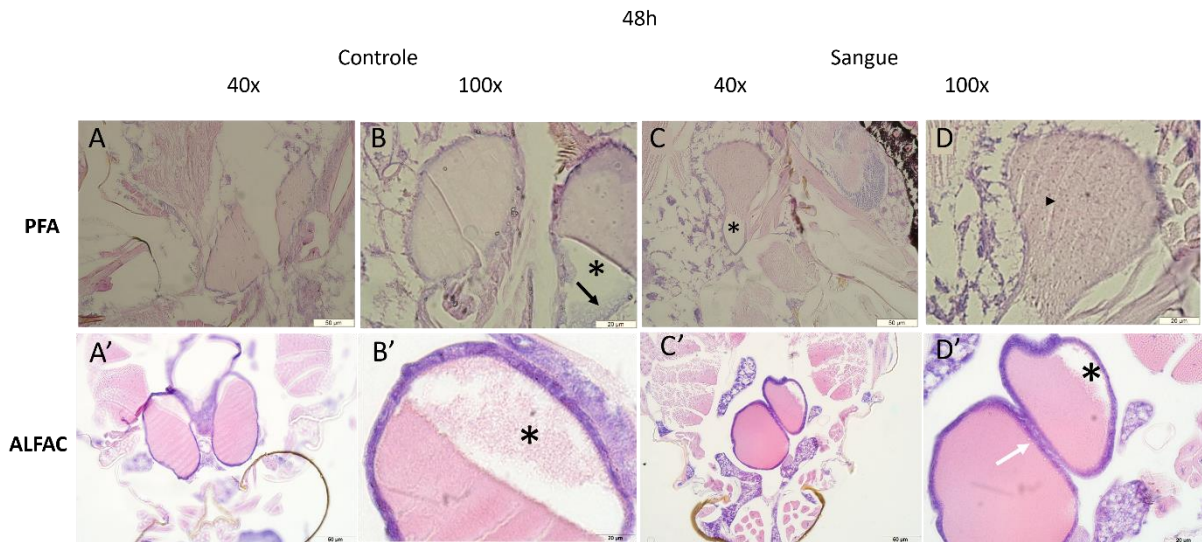
Em relação as observações de desenvolvimento e alimentação, independentemente do tempo (24h e 48h), foi observado que o grupo controle apresentou uma coloração basófila bastante acentuada das células do epitélio (Figura 6B'), o que caracteriza células em intensa atividade metabólica. Essa parte da glândula apresenta-se estreita no grupo experimental alimentado com sangue (Figura 6D').

Quando observado os indivíduos expostos a uma dieta de açúcar, 24 horas depois há um aparente espessamento da camada epitelial. Em um aumento maior, observa-se que o núcleo torna-se nitidamente mais claro pelo aumento de eucromatina e o nucléolo é evidente, enquanto o citoplasma continua corado intensamente pela eosina. Essas características morfológicas das células são uma evidência típica de células com alta atividade metabólica na síntese de proteínas. Tais informações podem ser relacionadas a um estímulo da dieta de açúcar na ativação da secreção dessas células. No entanto, curiosamente esse tipo de resposta celular não é mais observado nas glândulas após 48 horas de exposição a essa dieta exclusiva de açúcar. Observa-se nitidamente que a espessura da camada de células secretoras da glândula volta a apresentar aspectos morfológicos similares ao grupo controle.

Somente o lúmen das glândulas de insetos alimentados com açúcar foram observados completamente cheios. Os insetos alimentados com água e sangue apresentaram o lúmen parcialmente vazio com maior frequência (Figura 9). Com 24 horas, os insetos submetidos aos diferentes tipos de alimentação apresentaram um lúmen com aspecto mais granuloso (Figura 6), em relação aos insetos dissecados 48

horas depois da alimentação. Isso pode indicar que, antes de 48h a glândula não secretou quantidade suficiente de conteúdo para sua distensão completa. A maior frequência de glândulas parcialmente vazias 48h após a alimentação reforça essa possibilidade (Figura 9B').

FIGURA 8: CONTEÚDO DAS GLÂNDULAS SALIVARES



Legenda: *: Glândula parcialmente cheia. Seta preta: Aglomerado de células em aparente atividade secretora. Seta preta: grânulos corados observados no lúmen. Seta branca: estruturas semelhantes a vesículas. Coloração: HE.

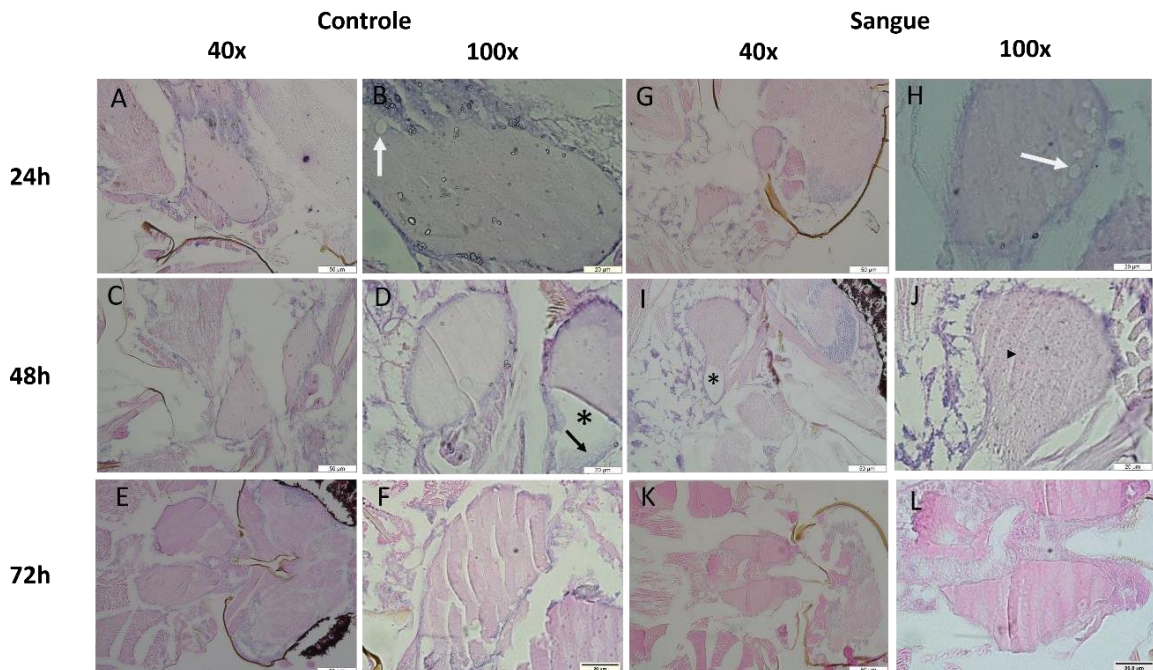
Os insetos provenientes do grupo alimentado com sangue não apresentaram alteração se comparados ao grupo controle, exceto pelo aparente estreitamento do epitélio glandular (Figura 6D' e 9). As células mantiveram as características basófilas como observado anteriormente. Em ambos os tempos, 24h e 48h, o formato das células epiteliais permaneceu o mesmo, e não foram observadas diferenças na morfologia da glândula. Vale ressaltar que, por ter sido empregada posteriormente, a fixação com ALFAC veio acompanhada de maior experiência em lidar com o material.

A fixação com PFA permitiu observações semelhantes às obtidas com o ALFAC. A secreção contida na saliva é rica em proteínas, e com as lâminas obtidas foi possível observar a presença de grânulos basófilos (Figura 9D e 10J) no lúmen da glândula. Também foi possível observar a presença de vesículas (Figura 6D e 10H), não coradas pela técnica utilizada. A presença de vesículas em glândulas salivares é relatada para outros insetos, como os triatomíneos (REIS et al., 2003).

Em uma observação de menor aumento, os tecidos musculares presentes no inseto ficaram pouco nítidos com a fixação em PFA. Se manteve a observação de

estruturas semelhantes a vesículas, com menor frequência, e de grânulos de caráter basófilo (Figura 10H e 10J).

FIGURA 9: DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES - FIXADAS EM PFA



Legenda: Cortes histológicos das glândulas mediante alimentação: A-F água (controle), G-L) sangue. Seta branca: estruturas vesiculares, mais evidentes 24 horas após alimentação. *: porção não preenchida no lúmen da glândula. Seta preta: aglomerado de células secretoras. Ponta de seta: grânulos mais evidentes. Coloração: HE. Fonte: A autora (2021).

As diferenças morfológicas e histológicas observadas em amostras fixadas em PFA, frente as diferentes fontes de alimentação consistem no estreitamento epitelial do grupo alimentado com sangue. Manteve-se a observação de insetos do grupo sangue e controle com a glândula parcialmente vazia, e epitélio íntegro (Figura 10D e J). Sugere-se a realização de um estudo histomorfométrico para verificar se existe diferença na espessura do epitélio mediante diferentes alimentações, visto que com o número de amostras obtido não foi possível aferir com certeza a existência de alguma diferença. De acordo com Borella et al., (2021), a alimentação sanguínea não modificou a histologia e histoquímica da glândula de triatomíneos.

Com relação ao desenvolvimento, poucas diferenças foram observadas ao longo do tempo. As glândulas analisadas 24h após a alimentação apresentaram epitélio com células com núcleo mais claro e presença de estruturas semelhantes a vesículas (Figura 10B e 10H). As características observadas no núcleo dessas células indica um núcleo metabolicamente mais ativo, no qual a cromatina se encontra menos

condensada para facilitar a transcrição do DNA. A presença de grânulos é mais evidente na imagem J, no entanto foi observada em todos os grupos, independente da alimentação e tempo de desenvolvimento.

Na figura 10D observa-se a presença de um aglomerado de células com citoplasma e núcleo mais claros que parecem estar se desintegrando do epitélio para o lúmen, o que caracterizaria secreção apócrina (OVALLE, 2014). Na figura 10J, o epitélio da porção não preenchida está íntegro, reforçando a ideia de que após 48h de alimentação, a glândula ainda está repondo ou produzindo o conteúdo a ser secretado. Com 72h, o epitélio parece estar menos espesso em relação aos tempos anteriores e o tamanho dos lobos parece maior.

De acordo com Pinto (2003), os tipos de secreção podem ser classificados como merócrina, quando há liberação de produtos através da membrana celular e, a célula permanecendo intacta; apócrina, quando envolve perda de parte do citoplasma apical juntamente com o material secretado; e holócrina, quando a secreção consiste na liberação da célula inteira dentro do ducto excretor ou descarga total do conteúdo da célula levando a sua completa destruição.

Em seu trabalho mais recente, Pinto e colaboradores (2020) explicitam a existência dos três tipos de células secretoras na glândula salivar de flebotomíneos, através do estudo da ultraestrutura deste órgão. A técnica utilizada neste trabalho possibilitou apenas a visualização das estruturas semelhantes a vesículas e projeções celulares que caracterizam a secreção apócrina. Para a visualização de outros mecanismos de secreção, é necessária a utilização de outros métodos.

Em *An. gambiae*, a secreção em insetos adultos se dá pela liberação de um compartimento subapical para a superfície apical das células que constituem a maquinaria de secreção da interface da célula com o lúmen. Um ducto salivar passa ao longo de cada lobo, e se combinam para formar um ducto secundário que se une para formação do ducto salivar comum. Em triatomíneos do gênero *Rhodnius*, a secreção das glândulas é controlada pela presença de um hilo (válvula) ou através de diminutos poros do epitélio para o hilo (LACOMBE, 1999). Para *Lu. longipalpis*, não foi observada, dentro da metodologia utilizada, nenhuma estrutura associada ao controle da secreção.

A respeito do desenvolvimento da glândula ao longo do tempo, no presente estudo, foi observado que com 24h, em ambos os fixadores, existe uma maior atividade nuclear do epitélio das glândulas. Com 48h, a frequência de glândulas com

lúmen parcialmente vazio foi maior. Não foi observado aumento aparente no tamanho celular conforme o desenvolvimento da glândula salivar, bem como no volume citoplasmático. Borella e colaboradores (2021) relatam que o aumento do tamanho da glândula salivar nos insetos acontece sem o aumento do número celular, e é decorrente do aumento do volume do citoplasma (BORELLA ET AL., 2021). Para *C. pipens*, no momento da emergência, as glândulas salivares não estão completamente desenvolvidas, e o desenvolvimento completo da glândula acontece do primeiro ao quinto dia da vida adulta (BARROW, 1975).

Em *An. gambiae*, insetos adultos apresentam crescimento celular uniforme, em relação ao crescimento desigual das células glandulares das larvas. O citoplasma das células secretoras varia de um tamanho mínimo, que não se estende muito além do núcleo, ao tamanho de 6 a 8 células típicas (CHIU et al., 2021). Ainda para *An. gambiae*, é relatada a mudança da forma das células de cubos para “cup-shaped” durante os primeiros 4 dias, e durante a alimentação sanguínea, o conteúdo é expelido e resposto dentro de 24 horas. Para *Lu. longipalpis*, foi descrita uma variação no diâmetro dos lobos e a espessura do epitélio de acordo com a idade e a alimentação do inseto (PINTO, 2003). Além disso, foi observado que a glândula só se encontrou completamente distendida e cheia de saliva após 48h da emergência do inseto. Abdel-Badej et al., (2012) descreveram um aumento do tamanho do lobo em *P. papatasii* e *P. langeroni* conforme o envelhecimento dos insetos alimentados com sangue.

Quanto a alimentação administrada, pouca diferença foi observada, destacando-se a aparente maior atividade celular mediante alimentação açucarada e o estreitamento do epitélio com alimentação sanguínea. Esse resultado não era esperado, visto que, conforme citado anteriormente neste trabalho, para diversos insetos a alimentação se relaciona com aspectos relativos à saliva. Além disso, pensando na espécie estudada, sabe-se que a composição é intimamente relacionada com a habilidade do inseto de realizar uma alimentação sanguínea (NACIF-PIMENTA, 2020). Ainda, segundo os resultados de Nacif-Pimenta (2020), machos de flebotomíneos apresentam concentração 30 vezes menor de proteína em sua saliva.

De acordo com Lacombe (1999), em triatomíneos famintos, as glândulas estão repletas de secreção, ocasionando a distensão da parede celular e conseqüentemente uma modificação morfológica. A maioria de suas células é binucleada, o que indica um acréscimo de massa nuclear em relação ao citoplasma. Para *Ae. aegypti*, as diferenças relacionadas a alimentação sanguínea se limitam a

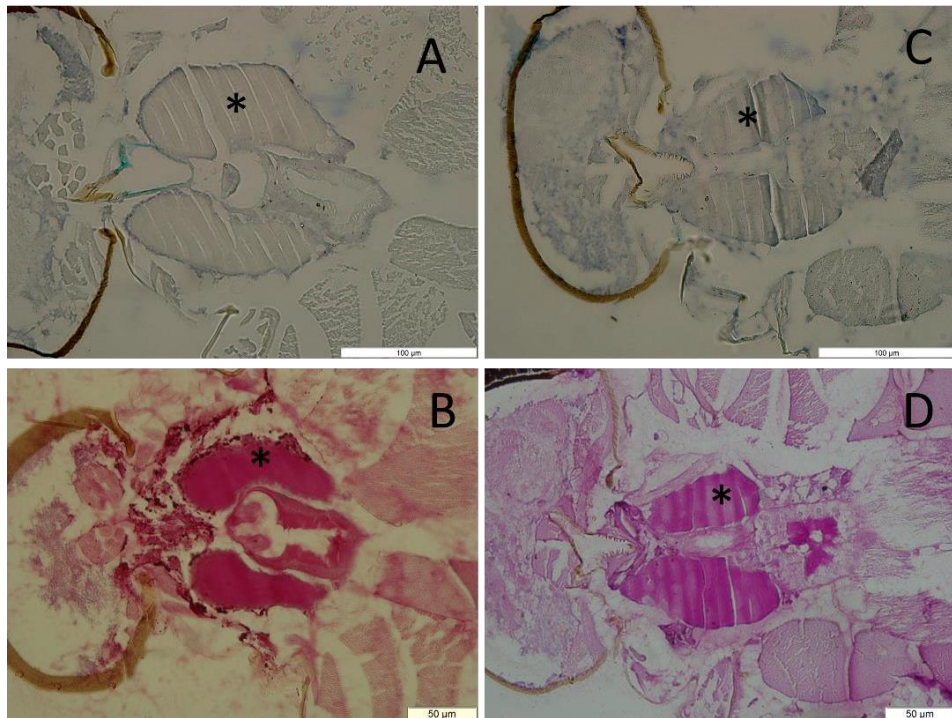
presença ou falta de material elétron-denso na parte apical do lúmen, mas mudanças no conteúdo dessa área não foram observadas (BARROW, 1975).

Ao longo do desenvolvimento das glândulas de *An. gambiae*, observou-se a presença de mucinas e enriquecimento lipídico, visível em vesículas perto da borda das células. A presença de mucinas e proteínas salivares adicionais com funções identificadas para a alimentação sanguínea foi observada em adultos. Além disso, observou-se variação em tamanho e formato celular, tamanho e formato do núcleo e porção ocupada pelo citoplasma (CHIU et al., 2021). Para *C. pipens*, nenhuma mudança na aparência da glândula das fêmeas foi observada no que diz respeito a alimentação sanguínea (BARROW, 1975).

4.2.2 Histoquímica

As colorações adicionais, feitas somente com insetos fixados em PFA, possibilitaram uma caracterização histoquímica da glândula. Foi observada a ausência de mucinas ácidas no lúmen da glândula salivar, visto que as colorações com *Alcian Blue* pH 1.0 e 2.5 foram negativas (Figura 11A-C). As mucinas são glicoproteínas que protegem e lubrificam superfícies epiteliais (OVALLE, 2014). Shem e colaboradores (2020) trazem em seu trabalho a importância do estudo da glicosilação nos componentes da saliva dos flebotômíneos, cuja natureza e o papel biológico são pouco estudados. Em insetos, assim como em humanos, as mucinas podem ser secretadas ou associadas a membrana. Sabe-se, ainda, que as mucinas desempenham importante papel na mediação da interação entre as células e o ambiente externo (ZHAO et al., 2020; OVALLE, 2014).

FIGURA 10: GLÂNDULAS SALIVARES DE *Lutzomyia longipalpis* CORADAS COM AB E PAS



Legenda: A e B) água (controle), C e D) sangue. Observa-se que o lúmen das glândulas (*) contém mucinas neutras. Coloração: Alcian Blue pH2.5 (A-C) e Periodic Acid Schiff (PAS) (B-D). Fonte: A autora (2021).

Foram identificadas mucinas neutras com a coloração PAS, uma vez que essa coloração foi positiva nos insetos, independentemente do tempo de desenvolvimento e alimentação (Figura 11B-D). Resultados semelhantes, indicando a composição da saliva com substâncias neutras, foi encontrado por Anhê e colaboradores (2021) em triatomíneos. Para *Ae. aegypti*, o conteúdo da glândula salivar foi PAS positivo e *Alcian Blue* negativo, quando os dois corantes foram conjugados (ORR et al., 1961). Isso foi importante para a identificação de elaboração diferenciada da secreção salivar na glândula desse inseto. Além disso, as mucinas neutras e polissacarídeos tem função de lubrificar e facilitar o movimento do aparato bucal, de acordo com Orr e colaboradores (1961). No presente estudo, não foram observadas alterações na composição do conteúdo da glândula salivar mediante as diferentes alimentações.

As mucinas mais estudadas em insetos são as intestinais, no entanto elas também podem estar presentes nas glândulas salivares (ZHAO et al., 2020). No inseto *Nilaparvata lugens*, foi identificada a presença de uma mucina na glândula salivar relacionada a respostas imunes em plantas (ZHAO et al., 2020) e em *Drosophila melanogaster* foi encontrada uma mucina expressa tanto na glândula salivar quanto em tecidos imunes, sugerindo uma função relacionada ao sistema de defesa contra

bactérias nesse inseto (KORAYEM et al., 2004). Os pHs utilizados no AB (1.0 e 2.5) marcam especialmente, sulfomucinas e sialomucinas, respectivamente. Neste trabalho, é demonstrada a ausência ou quantidades indetectáveis dessas substâncias por essa metodologia.

Estudos acerca da histologia da glândula salivar de flebotomíneos são escassos, fato que dificulta a comparação dos resultados obtidos. A presença de uma glândula pareada, encontrada em *Lu. longipalpis*, parece ser comum em insetos (PINTO, 2003). Borella e colaboradores (2021) descreveram a glândula salivar do vetor *Rhodnius prolixus*, vetor de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Essa espécie apresenta um par de lobos que incluem dois lóbulos (principal e acessório). Em *Ae. aegypti*, a glândula é uma estrutura trilobada pareada (ORR et al., 1961).

Com relação ao conteúdo secretado, não foi observada distinção entre os lobos. Diferente da espécie estudada, em *R. prolixus* existe diferença na secreção, sendo ela destinada a dois locais diferentes: bomba salivar e trato digestivo (BORELLA, 2021). Em *Ae. aegypti* também é encontrada diferenciação regional da secreção salivar das fêmeas. Em *Anopheles gambiae*, cada região da glândula salivar parece contribuir com diferentes moléculas (CHIU et al, 2021).

Por se tratar de uma espécie com literatura muito escassa em relação à histologia da glândula salivar, grande parte do trabalho envolveu o desenvolvimento de protocolos desde o processamento do material até a coloração. Sabe-se que a utilização de resinas de metacrilato (historesina) para infiltração do material, permite uma análise mais detalhada das células e tecidos, além de cortes mais finos. No entanto, pelo custo elevado deste material, optou-se pela utilização do Paraplast como resina, um material que apresenta mais restrições. A dificuldade em lidar com as dimensões do inseto estudado também se fez presente em diversos momentos, principalmente durante o processo de orientação e corte em micrótomo. Este fato levou a perda de parte do material, o que resultou em um N amostral menor do que o inicialmente proposto. Contudo, pode-se perceber uma melhora na produção do material histológico ao longo do trabalho, principalmente no que diz respeito à orientação dos insetos.

A fixação com ALFAC para o material estudado resultou em observações mais detalhadas sobre a morfologia da glândula salivar, permitindo a identificação da estrutura do epitélio com mais clareza. Contudo, mais aperfeiçoamento é necessário.

Ainda assim, as observações realizadas neste trabalho permitiram uma caracterização das células mediante diferentes alimentações e tempos de desenvolvimento dentro da metodologia desenvolvida.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

A avaliação do desenvolvimento de ovo a adulto de *Lu. longipalpis* sob temperatura de 12°C revelou quiescência embrionária pelo período de até aproximadamente 6 dias. Ao analisar os resultados obtidos no presente trabalho, são válidas algumas considerações importantes. A avaliação da quiescência dos ovos em resposta a queda de temperatura é um achado inédito para o vetor *L. longipalpis*. É importante considerar que os insetos analisados pertencem a uma linhagem de laboratório estabelecida ao longo de várias gerações, o que pode influenciar na resposta à temperatura. Ainda assim, o desenvolvimento dos ovos evidenciou que essa espécie é competente para o processo de quiescência e que isso não afeta de maneira drástica o desenvolvimento do ciclo de vida da espécie. Considerando o cenário de mudanças climáticas, que culminam em condições ambientais extremas, é essencial aprofundar estudos acerca da resistência térmica deste importante vetor e considerar a possibilidade de mudanças na distribuição dessa espécie e, conseqüentemente, da epidemiologia da LV.

I) A morfologia da glândula salivar das fêmeas de *Lu. longipalpis* consiste em dois lobos de formato alveolar, unidos por um ducto salivar, envoltos por epitélio simples cúbico, com lúmen basófilo. A exposição a dieta de sangue provocou o estreitamento do epitélio da glândula, enquanto a exposição à água e solução açucarada está associada a maior atividade celular no epitélio. Em especial, a alimentação açucarada parece promover maior atividade de secreção das células da glândula. Com relação ao desenvolvimento, as glândulas dissecadas 24h após a alimentação estão associadas à maior atividade, enquanto as dissecadas 48h após a alimentação apresentam atividade menos intensa. Mudanças de formato celular, aumento do tamanho dos lobos e alterações em seu formato não foram observadas. As amostras

dissecadas 72h após a alimentação representam um número muito baixo para inferir qualquer alteração.

II) Os aspectos histoquímicos do conteúdo da glândula salivar das fêmeas de *Lu. longipalpis* não sofreram alteração mediante a exposição a diferentes fontes alimentares, bem como a dissecação em diferentes tempos após a alimentação. As análises histoquímicas revelam a presença de um conteúdo rico em mucinas neutras (PAS positivo) e com ausência de mucinas ácidas (AB pH 1.0 e pH 2.5).

5.2 PERSPECTIVAS

Considerando a importância da descoberta de de quiescência em *Lu. longipalpis* sugere-se o estudo também da ocorrência do fenômeno da diapausa, em qualquer um dos estágios de desenvolvimento do inseto. Assim, como repetição dos bioensaios com a UR mais controlada. A respeito da histologia, recomenda-se a repetição das análises utilizando a historesina para infiltrar e emblocar o material. Incluir insetos machos nas análises também é interessante, considerando que inexistem trabalhos sobre a morfologia destes, e sobre possíveis dimorfismos. Além disso, a repetição com maior número de amostras é recomendada para que se possa inferir com mais certeza as modificações existentes ao longo do desenvolvimento da glândula salivar. Ainda, para compreender as mudanças com mais detalhes e maior robustez, seria interessante utilizar técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, além de microscopia confocal para marcação de compostos específicos. No campo da microscopia de luz, sugere-se a coloração com compostos que identifiquem diferentes elementos da composição e do epitélio da glândula salivar.

6 REFERÊNCIAS

ABDEL-BADEI, N. M., KHATER, E. I. M., DABA, S., ; SHEHATA, M. G. MORPHOMETRICS AND PROTEIN PROFILES OF THE SALIVARY GLANDS OF PHLEBOTOMUS PAPATASI AND PHLEBOTOMUS LANGERONI SAND FLIES. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 106(4), 235–242, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.01.006>

ABDELADHIM, M., KAMHAWI, S., ; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, 28, 691–703, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.028>

ANVERSA, L., TIBURCIO, M. G. S., RICHINI-PEREIRA, V. B., ; RAMIREZ, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista Da Associação Médica Brasileira**, 64(3), 281–289. doi:10.1590/1806-9282.64.03.281

ARCÀ, B., ; RIBEIRO, J. M. (2018). Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. **Current Opinion in Insect Science**, 29, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.07.012>

ARENAS, R., TORRES-GUERRERO, E., QUINTANILLA-CEDILLO, M. R., ; RUIZ-ESMENJAUD, J. (2017). Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, 6(May), 1–15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

BABIC, B., POISSON, A., DARWISH, S., LACASSE, J., MERKX-JACQUES, M., DESPLAND, E., ; BEDE, J. C. (2008). Influence of dietary nutritional composition on caterpillar salivary enzyme activity. **Journal of Insect Physiology**, 54(1), 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.09.010>

BARBOSA, P., BERRY, D. L.; KARY, C. **Insect histology** : practical laboratory techniques. Wiley Blackwell. UK. 2015.

BARCELLOS, C., MONTEIRO, A. M. V., CORVALÁN, C., GURGEL, H. C., CARVALHO, M. S., ARTAXO, P., HACON, S., ; RAGONI, V. (2009). Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 18(3), 285–304. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742009000300011>

BARROW, P. M., MCIVER, S. B., ; WRIGHT, K. A. (1975). Salivary glands of female culex pipiens: Morphological changes associated with maturation and blood-feeding. **The Canadian Entomologist**, 107(11), 1153–1160. <https://doi.org/10.4039/Ent1071153-11>

BENKOVA, I., ; VOLFF, P. Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, 44(1), 150–154, 2007. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[150:EOTOMO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[150:EOTOMO]2.0.CO;2)
Borella Marfil Anê AC, Maia Godoy RS, Nacif-Pimenta R, Barbosa WF, Lacerda MV, Monteiro WM, Costa Secundino NF, Paolucci Pimenta PF. Microanatomical and

secretory characterization of the salivary gland of the *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), a main vector of Chagas disease. **Open Biol.** 2021 Jun;11(6):210028. doi: 10.1098/rsob.210028. Epub 2021 Jun 16. PMID: 34129783; PMCID: PMC8205540.

BRASIL, Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral> . Acesso em 2021.

CABRERA, M. A. A.; **Ciclo enzoótico de transmissão da Leishmania (leishmania) chagasi (Cunha ; Chagas, 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro - RJ : estudo de possíveis variáveis preditoras.** Tese (Mestrado em 24 Saúde Pública). FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/4751/2/135.pdf>

CALDART, E. T., CAMILO, C. P., MOREIRA, J. R., DE MATOS, A. M. R. N., FERREIRA, F. P., PASCHOAL, A. T. P., SUHETT, W. G., VIDOTTO, O., MITSUKA-BREGANÓ, R., ; NAVARRO, I. T. (2018). Canine visceral leishmaniasis in Londrina, paraná - Investigation and case report. **Semina:Ciencias Agrarias**, 39(3), 1371–1375. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1371>

CARREGARO, V., RIBEIRO, J. M., VALENZUELA, J. G., SOUZA-JÚNIOR, D. L., COSTA, D. L., OLIVEIRA, C. J. F., SACRAMENTO, L. A., NASCIMENTO, M. S. L., MILANEZI, C. M., CUNHA, F. Q., ; SILVA, J. S. NUCLEOSIDES PRESENT ON PHLEBOTOMINE SALIVA INDUCE IMMUNOSUPPRESSION AND PROMOTE THE INFECTION ESTABLISHMENT. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 9(4), 1–21, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003600>

CHANIOTIS, B. N. (1967). The biology of california phlebotomus. **Journal of Medical Entomology**. 4(May), 221–233.

CHIU, M., TRIGG, B., TARACENA, M., ; WELLS, M. (2020). Diverse cellular morphologies during lumen maturation in *Anopheles gambiae* larval salivary glands. **Insect Molecular Biology**. 30(2): 210–230, 2021. doi:10.1111/imb.12689

COUTINHO-ABREU, I. V., GUIMARÃES-COSTA, A. B., ; VALENZUELA, J. G. Impact of insect salivary proteins in blood feeding, host immunity, disease, and in the development of biomarkers for vector exposure. **Current Opinion in Insect Science**, 10, 98–103, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.014>

DEY, P. **Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology**. Singapura. Springer. 2018.

DINIZ, D. F. A. **Avalia o da diapausa e quiescência em popula es naturais de Aedes aegypti e Aedes albopictus.** 2018. 115 f. Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde - Instituto Aggeu Magalhães, Funda o Oswaldo Cruz. Recife. 2018.

DNDIAL. Iniciativa para Medicamentos para Doenças Neglicenciadas. Leishmanioses. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>. Acesso em março de 2020.

ESPÍRITO SANTO. Secretaria da Saúde – Leishmanioses. Disponível em: <https://saude.es.gov.br/Media/sesa/NEVE/LLEISHMANIOSES.pdf>. Acesso em março de 2020.

FREIRE, T., XIMENES, D. E. M., CASTELLO, E. G., SOUZA, T. D. E., MENEZES, A. A. L., SILVA, L. M. E., ; JERO, S. M. B. Effect of Abiotic Factors on Seasonal Population Dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Northeastern Brazil. **Journal of medical entomology**, 43 (5), 990–995, 2006.

GUERRERO, D., CANTAERT, T., ; MISSÉ, D. (2020). Aedes Mosquito Salivary Components and Their Effect on the Immune Response to Arboviruses. **Frontiers of Cellular and infection microbiology**. 10(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00407>

GILL, H. K.; GOYAL, G.; CHAHIL, G. Insect Diapause: A Review. **Journal of Agricultural Science and Technology A**, 7(7), 454–473, 2017. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2017.07.002>

HOPWOOD, D. Fixatives and fixation: a review. **Histochem J** 1, 323–360 (1969). <https://doi.org/10.1007/BF01003278>

HORTA, M. A., BRUNIERA, R., KER, F., CATITA, C., ; FERREIRA, A. P. Temporal relationship between environmental factors and the occurrence of dengue fever. **International Journal of Environmental Health Research**, 24(5), 471–481, 2014. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.865713>

INSTITUTO Nacional de Meteorologia. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/>. Acesso em ago. 2021.

IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: **Climate Change 2021: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds

JEFFRIES, C. L., ROGERS, M. E., ; WALKER, T. Establishment of a method for *Lutzomyia longipalpis* sand fly embryo microinjection: The first step towards potential novel control strategies for leishmaniasis. **Wellcome Open Research**, 3(0), 55, 2018. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14555.1>

KAYE, P., ; SCOTT, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 9(8), 604–615, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>

KORAYEM AM, FABBRI M, TAKAHASHI K, SCHERFER C, LINDGREN M, SCHMIDT

O, UEDA R, DUSHAY MS, THEOPOLD U. A Drosophila salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. **Insect Biochem Mol Biol.** 2004 Dec;34(12):1297-304. doi: 10.1016/j.ibmb.2004.09.001. PMID: 15544943.

KILLICK KENDRICK, R., LEANEY, A. J., ; READY, P. D. (1977). The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, 13(4–5), 429–440. <https://doi.org/10.1093/jmedent/13.4-5.429>

LACOMBE, D. (1999). Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 94(4), 557–564. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000400023>

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 100(8), 811–827, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>

LESTINOVA T, ROHOUSOVA I, SIMA M, DE OLIVEIRA CI, VOLF P (2017) Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS Negl Trop Dis** 11(7): e0005600. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005600>

MARTINS, K. A., MEIRELLES, M. H. DE A., MOTA, T. F., ABBASI, I., DE QUEIROZ, A. T. L., BRODSKYN, C. I., VERAS, P. S. T., FRAGA, D. B. M., ; WARBURG, A. Effects of larval rearing substrates on some life-table parameters of *Lutzomyia longipalpis* sand flies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 15(1), 1–20, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009034>

MINUZZI, R. B., CARAMORI, P. H., ; BORROZINO, E. Tendências na variabilidade climática sazonal e anual das temperaturas máxima e mínima do ar no Estado do Paraná. **Agrometeorologia**. 70(2), 471–479, 2011.

MONDRAGON-SHEM, K., WONGTRAKUL-KISH, K., KOZAK, R. P., YAN, S., WILSON, I. B. H., PASCHINGER, K., ROGERS, M. E., SPENCER, D. I. R., ; ACOSTA-SERRANO, A. (2020). Insights into the salivary N-glycome of *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis. **Scientific Reports**, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69753-x>

NACIF-PIMENTA, R., PINTO, L. C., VOLFOVA, V., VOLF, P., PIMENTA, P. F. P., ; SECUNDINO, N. F. C. Conserved and distinct morphological aspects of the salivary glands of sand fly vectors of leishmaniasis: An anatomical and ultrastructural study. **Parasites and Vectors**, 13(1), 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04311-y>

NASCIMENTO, BRUNO WARLLEY LEANDRO. **Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. 2013.** 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Doenças Infecciosas e Parasitárias, Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte (MG). 2013. Disponível em:

http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_91.pdf.

NIEVES, E., BUELVAS, N., RONDÓN, M., ; GONZÁLEZ, N. The salivary glands of two sand fly vectors of Leishmania: *Lutzomyia migonei* (França) and *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera: Psychodidae). **Biomedica**, 30(3), 401–409, 2010. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i3.274>

NWEZE, J. A., NWEZE, E. I., ; ONOJA, U. S. Nutrition, malnutrition, and leishmaniasis. **Nutrition**, 73, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110712>

ORR, C. W. M., HUDSON, A.; WEST, A. S. the Salivary Glands of *Aedes Aegypti* Histological–Histochemical Studies. **Canadian Journal of Zoology**, 39(3), 265–272, 1961. <https://doi.org/10.1139/z61-029>

OVALLE, WILLIAM. **Netter Bases da Histologia**. Editora Elsevier. Grupo GEN, 2014. 9788595151901. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595151901/>.

PARANÁ, Secretaria da Saúde. 2018. **Nota Técnica Leishmaniose Visceral**. Disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/NotaTecVigLVH.pdf>>. Acesso em abril de 2020.

PENNSYLVANIA - College of Agricultural Sciences. **Tips on Preserving Tissue**. 2021. Disponível em: <https://plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/methods-info/root-anatomy/tips-on-preserving-tissue>.

PETERSON, ANDREW ; CAMPBELL, LINDSAY ; MOO-LLANES, DAVID ; TRAVI, BRUNO ; GONZÁLEZ ROSAS, CAMILA ; FERRO, MARÍA ; FERREIRA, GABRIEL ; BRANDÃO FILHO, SINVAL ; CUPOLILLO, ELISA ; RAMSEY, JANINE ; LEFFER, ANDREIA ; PECH MAY, ANGÉLICA ; SHAW, JEFFREY. (2017). Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Psychodidae: Phlebotominae). **International Journal for Parasitology**. 47. 667-674. [10.1016/j.ijpara.2017.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.04.007).

PINTO, LUCIANA DA CONCEIÇÃO. **Estudo Morfológico da Glândula Salivar do Flebotomíneo *Lutzomyia migonei* (França), Vetor de *Leishmania braziliensis* (Vianna)**. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Belo Horizonte (MG), 2003. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-933640>>.

PORTAL FIOCRUZ. Tudo sobre os flebotomíneos do Brasil. 2018. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/tudo-sobre-os-flebotomineos-do-brasil>.

PRATES, D. B., SANTOS, L. D., MIRANDA, J. C., SOUZA, A. P. A., PALMA, M. S., BARRAL-NETTO, M., ; BARRAL, A. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. **Journal of Medical Entomology**, 45(3), 409–413, 2008. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[409:CIAOTS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[409:CIAOTS]2.0.CO;2)

RANGEL, E. F., SOUZA, N. A., WERMELINGER, E. D., BARBOSA, A. F., ;

ANDRADE, C. A. (1986). Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz ; Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz ; Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 81(4), 431–438) 1986. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761986000400010>

READY, P. D., ; CROSET, H. (1980). Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera: Psychodidae) from southern France. **Bulletin of Entomological Research**, 70(3), 511–523. <https://doi.org/10.1017/S0007485300007793>

READY, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, 58, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>

REIS, M. M., MEIRELLES, R. M. S., ; SOARES, M. J. (2003). Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Tissue and Cell**, 35(5), 393–400. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(03\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(03)00059-4)

RIVAS, G. B., DE SOUZA, N. A., PEIXOTO, A. A., ; BRUNO, R. V. Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Parasites and Vectors**, 7(1), 1–9, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-278>

SALES, K. G. S. **PCR em tempo real para caracterização de fontes alimentares de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae)**. 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2015.

SANTOS, D. R. DOS, FERREIRA, A. C., ; BISETTO JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz ; Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 45(5), 643–645, 2012. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000500019>

SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P. Scanning Electron Microscopic Study of the egg and immature stages of the Sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Acta Microscopica**, 8 (2),33-38, 1999.

SOCOL, V. T., PASQUALI, A. K. S., POZZOLO, E. M., DE SOUZA LEANDRO, A., CHIYO, L., BAGGIO, R. A., MICHALISZYN, M. S., SILVA, C., CUBAS, P. H., PETERLLE, R., DE SOUZA PAZ, O. L., BELMONTE, I. L., ; BISETTO, A. (2017). More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLoS ONE**, 12(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189182>

SILVA, F. S. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, 3(3), 3–17, 2009.

SILVEIRA, R. B., ROCHA, G. S. DA, ; ALVES, M. P. A. Contabilização das ondas de frio em Curitiba - Paraná. **Os Desafios Da Geografia Física Na Fronteira Do Conhecimento**, c, 2162–2172, 2017. <https://doi.org/10.20396/sbgfa.v1i2017.2434>

SOARES, R. P. P., ; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias**, 75(3), 301–330, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000300005>

STERNBERG, E. D., ; THOMAS, M. B. Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases. **Trends in Parasitology**, 30(3), 115–122, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.010>

TEIXEIRA, C., GOMES, R., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., ; BRODSKYN, C. Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana. **Gazeta Médica da Bahia**, 75(1), 18-23, 2005.

THEODOR, O. On the Relation of *Phlebotomus papatasi* to the Temperature and Humidity of the Environment. **Bulletin of Entomological Research**, 27(4), 653–671, 1936. <https://doi.org/10.1017/S0007485300058739>

TESH RB, LUBROTH J, GUZMAN H. Simulation of arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) in its natural sand fly vector *Phlebotomus perniciosus*. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 1992.

THOMAS, S. M., OBERMAYR, U., FISCHER, D., KREYLING, J., ; BEIERKUHNLEIN, C. Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasites and vectors**. 5(100), 1–7, 2012.

WORD Health Organization, Leishmaniasis, Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: março/2020.

WRIGHT, K. A. The anatomy of salivary glands of *Anopheles stephensi* Liston. **Can. J. Zool.** 47: 579-587, 1969.

ZHAO, X., ZHANG, J., YANG, J., NIU, N., ZHANG, J., ; YANG, Q. Mucin family genes are essential for the growth and development of the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 123, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103404>