

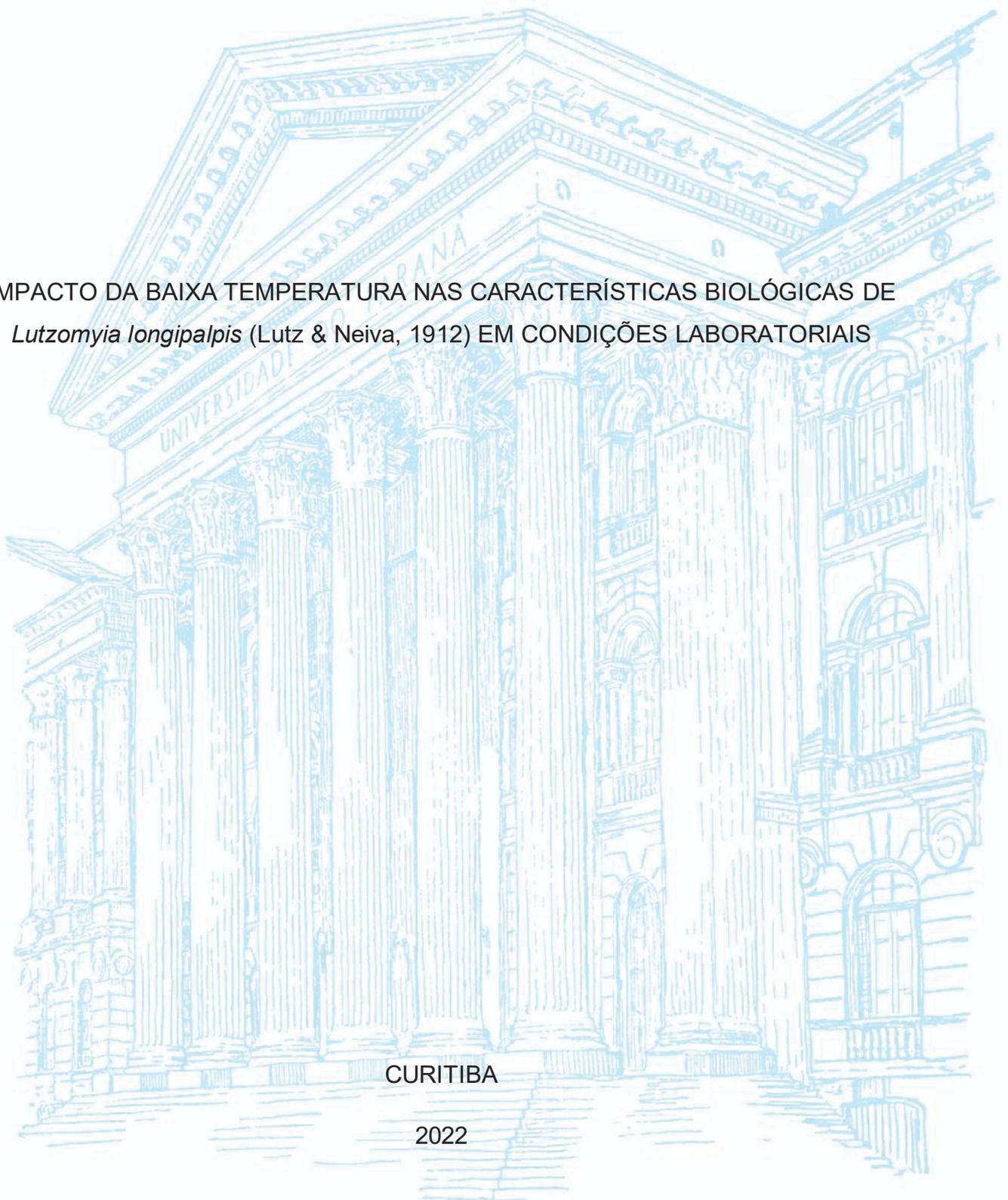
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS ALEXANDRE FARIAS DE SOUZA

IMPACTO DA BAIXA TEMPERATURA NAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE  
*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

CURITIBA

2022



LUCAS ALEXANDRE FARIAS DE SOUZA

IMPACTO DA BAIXA TEMPERATURA NAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE  
*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro

Coorientadora: Dra. Daniela de Pita-Pereira

CURITIBA, 2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Souza, Lucas Alexandre Farias de.

Impacto da baixa temperatura nas características biológicas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em condições laboratoriais. / Lucas Alexandre Farias de Souza. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro.

Coorientadora: Dra. Daniela de Pita-Pereira.

1. Psychodidae. 2. Controle de Vetores de Doenças. 3. Flebotomíneo. 4. Controle de temperatura. 5. Leishmaniose. 6. Dispersão. I. Costa-Ribeiro, Magda Clara Vieira da, 1969-. II. Pita-Pereira, Daniela de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUCAS ALEXANDRE FARIAS DE SOUZA** intitulada: **Impacto da baixa temperatura nas características biológicas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em condições laboratoriais**, sob orientação da Profa. Dra. MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 09 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

20/04/2023 16:37:14.0

MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/02/2023 15:04:31.0

SAMARA GRACIANE DA COSTA LATGÉ

Avaliador Externo (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ)

Assinatura Eletrônica

28/02/2023 08:59:03.0

MARIA APARECIDA CASSILHA ZAWADNEAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/02/2023 09:38:50.0

MAURÍCIO LUIZ VILELA

Avaliador Externo (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ)

*Dedico aos meus pais, José Isidoro e Solange, que sempre acreditaram no meu potencial e nunca mediram esforços para me ajudar a conquistar meus sonhos. E à minha avó e irmão, Eronita e Rodrigo, que sempre me apoiaram.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, professora Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro. Sua dedicação ao ensino, à pesquisa e à ciência são encorajadores e motivam todos os alunos que estão sob sua orientação a seguir em frente, mesmo com o precário cenário pelo qual tem passado a ciência brasileira nos últimos anos.

À Dra. Daniela de Pita-Pereira, a qual tive o prazer de ter como coorientadora. Minha admiração pelo seu trabalho vem desde a graduação e aumentou ainda mais durante o período de realização do mestrado.

À professora Camila Marconi, pela disposição e ajuda com as análises estatísticas.

Aos pesquisadores do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da FIOCRUZ, coordenado pelo Dr. Fernando Ariel Genta, pela doação dos ovos de *Lutzomyia longipalpis*.

Aos membros da banca pela disponibilidade e interesse em avaliar este trabalho.

Ao professor Ciro Oliveira Ribeiro pelas aulas e treinamento em técnicas de microscopia.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, à Universidade Federal do Paraná. À agência de fomento CAPES, pela bolsa de estudo.

Aos colegas e demais professores do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR, em especial à Kelly Germano, a qual tenho o prazer de chamar de amiga, que sempre esteve ao meu lado em todas as atividades realizadas durante esses dois anos. Também estendo meus agradecimentos de maneira especial ao professor Andrey Andrade e à colega e amiga Letícia Morelli, que estão sempre a disposição para ajudar e apoiar.

E por último, mas não menos importante, ao Presidente Luiz Inácio Lula da Silva, que durante seus mandatos implementou programas e políticas públicas que permitiram que jovens à margem da sociedade como eu, tivessem acesso ao ensino superior de alta qualidade em universidades públicas.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

*Lutzomyia longipalpis lato sensu* é o flebotomíneo com maior relevância para a saúde pública nas Américas, devido a sua capacidade de transmissão do agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana, *Leishmania infantum*. Tendo em vista a grande importância epidemiológica de *L. longipalpis* e a sua ascendente expansão geográfica para o Sul o Brasil, este estudo teve como objetivo analisar a exigência térmica de diferentes formas evolutivas de *L. longipalpis* sob a temperatura de 8°C. Para isso foram realizados três experimentos: 1) resistência térmica de ovos; 2) resistência térmica de larvas; 3) resistência térmica de fêmeas. Os ovos, larvas L1 e L4, fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas com sangue foram incubadas por 24, 48, 72, 96, 120, 148 e 168 horas sob 8°C. Após o término dos tempos de incubação, as amostras foram mantidas à 26°C até seu completo desenvolvimento. Durante e após o tratamento térmico, foram realizadas leituras diárias para avaliar a taxa de eclosão das larvas, seu desenvolvimento, sobrevivência, digestão do sangue pelas fêmeas e taxa de oviposição. Foi observado que a temperatura à 8°C de 24h a 168h impede a eclosão das larvas, a formação das pupas, a digestão do sangue e a oviposição. Contudo, essas atividades são retomadas após a elevação da temperatura à 26°C. Não houve desenvolvimento de nenhuma fase evolutiva sob a temperatura de 8°C. A incubação dos ovos sob essa temperatura influenciou no tempo de eclosão das larvas L1, prolongando o estágio de ovo e alterou o tempo de desenvolvimento das larvas e pupas provenientes dos ovos submetidos ao tratamento. As larvas L1 foram pouco resistentes ao tratamento. Entretanto, sobreviveram por até quatro dias. As larvas L4 foram resistentes à temperatura de 8°C, provavelmente por ser um estágio com maiores reservas energéticas. Com relação aos insetos adultos, verificamos que o estresse térmico sofrido pelas fêmeas de *L. longipalpis* não afetou sua sobrevivência e prolongou a longevidade. Observamos diferenças significativas na quantidade de ovos postos pelas fêmeas dos diferentes grupos tratados. Nos grupos de fêmeas ingurgitadas antes do tratamento, a diferença foi maior, o que sugere que o atraso na digestão sanguínea afetou a quantidade de ovos produzidos. Foi observado que exposições prolongadas à temperatura de 8°C causam danos ao desenvolvimento e sobrevivência do inseto. No entanto, é importante destacar que na natureza as oscilações na temperatura são frequentes e não se limitam às duas temperaturas testadas nos experimentos. É possível concluir que *L. longipalpis* é capaz de colonizar regiões com as condições térmicas testadas.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*; temperatura; resistência; dispersão.

## ABSTRACT

*Lutzomyia longipalpis* sensu lato is the most relevant sand fly for public health in the Americas, due to its ability to transmit the etiologic agent of American Visceral Leishmaniasis, *Leishmania infantum*. In view of the great epidemiological importance of *L. longipalpis* and its upward geographic expansion towards the south of Brazil, this study aimed to analyze the thermal requirement of different evolutionary forms of *L. longipalpis* under a temperature of 8°C. For this, three experiments were carried out: 1) thermal resistance of eggs; 2) thermal resistance of larvae; 3) thermal resistance of females. The eggs, larvae L1 and L4, females engorged and not engorged with blood were incubated for 24, 48, 72, 96, 120, 148 and 168 hours at 8°C. After the end of the incubation times, the samples were kept at 26°C until their complete development. During and after the heat treatment, daily readings were taken to evaluate the hatching rate of the larvae, their development, survival, blood digestion by females and oviposition rate. It was observed that the temperature at 8°C from 24h to 168h prevents the hatching of the larvae, the formation of the pupae, the digestion of the blood and the oviposition. However, these activities are reactivated after raising the temperature to 26°C. There was no development of any evolutionary phase under the temperature of 8°C. The incubation of the eggs under this temperature influenced the hatching time of the L1 larvae, prolonging the egg stage and altering the development time of the larvae and pupae from the eggs submitted to the treatment. The L1 larvae were not very resistant to the treatment. However, they survived for up to four days. L4 larvae were resistant to a temperature of 8°C, probably because it is a stage with greater energy reserves. With regard to adult insects, we verified that the thermal stress suffered by *L. longipalpis* females did not affect their survival and prolonged longevity. We observed significant differences in the number of eggs laid by females in the different treated groups. In groups of females engorged before treatment, the difference was greater, suggesting that the delay in blood digestion affected the amount of eggs produced. It was observed that prolonged exposure to a temperature of 8°C damages the development and survival of the insect. However, it is important to highlight that in nature temperature oscillations are frequent and are not limited to the two temperatures tested in the experiments. It is possible to conclude that *L. longipalpis* is able to colonize regions with the tested thermal conditions.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*; temperature; resistance; dispersal.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ovos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	8
FIGURA 2 - Larvas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	9
FIGURA 3 - Pupa de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	9
FIGURA 4 - Adultos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	10
FIGURA 5 - Recipiente de criação de flebotomíneos .....	16
FIGURA 6 - Sequência dos experimentos de resistência térmica .....	18
FIGURA 7 - Recipientes contendo os ovos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> que foram submetidos ao tratamento térmico .....	19
FIGURA 8 - Larva L4 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	20
FIGURA 9 - Tubo de vidro com fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	21
FIGURA 10 - Gráficos do tempo de desenvolvimento de cada estágio de <i>L. longipalpis</i> após a incubação em temperatura a 8°C e umidade relativa do ar de 80% .....	23

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Eclosão de larvas (L1) de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	21
TABELA 2 - Tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	23
TABELA 3 - Porcentagem de larvas L1 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobreviventes aos tratamentos e tempo médio para realização da ecdise do estágio L1 para L2 .....	24
TABELA 4 - Porcentagem de larvas L4 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobreviventes aos tratamentos e tempo médio para pupação .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BOD - Demanda biológica de oxigênio

L1 - Larva de primeiro estágio

L2 - Larva de segundo estágio

L3 - Larva de terceiro estágio

L4 - Larva de quarto estágio

SIMEPAR - Sistema de Tecnologia e Monitoramento Ambiental do Paraná

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	4
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	5
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
4.1 Complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i> e a transmissão de <i>Leishmania</i> .....	6
4.2 Ciclo de vida de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	7
4.3 Distribuição geográfica de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e da LVA no Brasil .....	10
4.4 Influência de fatores abióticos sobre flebotomíneos .....	13
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
5.1 Estabelecimento da Colônia de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	15
5.2 Determinação da temperatura e dos grupos experimentais .....	17
5.3 Experimento 1: Resistência térmica dos ovos de <i>L. longipalpis</i> .....	18
5.4 Experimento 2: Resistência térmica de larvas L1 e L4 de <i>L. longipalpis</i> .....	19
5.5 Experimento 3: Resistência térmica de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	20
5.6 Análise estatística .....	21
<b>6 RESULTADOS</b> .....	22
6.1 Resistência térmica dos ovos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	22
6.2 Resistência térmica das larvas L1 e L4 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	24
6.3 Resistência térmica de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	26
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33

## 1 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) estão entre os grupos de insetos vetores mais importantes da atualidade devido a sua capacidade de transmitir vários agentes patogênicos aos animais e seres humanos (READY, 2013). Os principais deles são os protozoários do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das Leishmanioses. Essas enfermidades afetam principalmente as populações de países pobres nas regiões tropicais e subtropicais e por isso fazem parte de um grupo chamado Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) (CECÍLIO, 2022). Nas Américas, existem duas manifestações principais desta doença: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (LAINSON & SHAW et al., 1987). A LTA tem o decurso benigno, já a LVA, também conhecida como calazar, é mais grave, podendo levar o indivíduo a óbito. Esta enfermidade afeta principalmente as crianças e os adultos imunocomprometidos e pode ser fatal se não tratada em mais de 95% dos casos (OMS, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A transmissão das espécies de *Leishmania* para o homem e outros mamíferos ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, que têm seu esôfago obstruído pelas formas flageladas do parasito (promastigotas) e ao tentar ingerir sangue, acabam regurgitando-as na epiderme do mamífero hospedeiro (SERAFIM *et al.*, 2018). Atualmente, existem cerca de 1047 espécies de flebotomíneos descritas no mundo, sendo que 549 são encontradas no continente americano (GALATI, 2021; SHIMABUKURO et al., 2017). Entretanto, apenas um décimo (10%) delas são vetores comprovados ou suspeitos de veicularem *Leishmania* (MAROLI *et al.*, 2013). O Brasil abriga aproximadamente um terço da fauna de flebotomíneos conhecida no mundo, com cerca de 292 espécies registradas em seu território (GALATI, 2021).

Nas Américas, a espécie de flebotomíneo com maior relevância para a saúde pública é *Lutzomyia longipalpis lato sensu*, devido a sua capacidade de transmissão do agente etiológico da LVA, *Leishmania infantum*. A compreensão de quais variáveis ambientais são condicionantes para o desenvolvimento e estabelecimento de *L. longipalpis*, é de suma importância para ecoepidemiologia da LVA. O vetor vem sendo relacionado a esta enfermidade desde o início do século XX, quando os casos ocorriam em focos silvestres. Contudo, em decorrência da construção de rodovias, do desmatamento e do intenso fluxo migratório entre cidades próximas, iniciou-se um processo de adaptação do vetor ao ambiente urbano (OLIVEIRA et al, 2018). Este cenário configura um grave problema de saúde pública para a América do Sul, pois a ocupação do ambiente urbano e periurbano pelo vetor contribui para a acentuada expansão geográfica da LVA (SOLOMÓN, 2015).

Atualmente, *L. longipalpis* é encontrada em áreas em que não havia registros prévios de sua presença (PAULA et al., 2008; ACOSTA et al., 2013). A distribuição geográfica do vetor nas Américas é extensa, abrangendo o México, à norte, e a Argentina, ao sul (MOOLLANES et al., 2013). Atualmente sua distribuição ocorre de forma descontínua, sendo fragmentada por barreiras geográficas que limitam a sua ocorrência em algumas áreas (ARRIVILLAGA et al., 2002).

Os principais fatores abióticos que determinam o desenvolvimento e a capacidade de dispersão dos flebotomíneos são a temperatura e a umidade (BENKOVA, et al., 2007). Entretanto, sabe-se que algumas espécies de flebotomíneos apresentam estratégias de sobrevivência para resistir às condições desfavoráveis, como as baixas temperaturas (VOLF & VOLFOVA, 2011). Essas estratégias são fenômenos fisiológicos chamados de dormência, a que é definida como um estado de interrupção do desenvolvimento ou supressão da atividade metabólica em um organismo (MARTINS et al., 2000).

Desde o ano de 2009, há três registros da presença do vetor no Sul do país, dois no estado do Rio Grande do Sul (SOUZA et al., 2009; OSMARI et al., 2022), e um no estado do Paraná (SANTOS et al., 2012). Sendo que este último foi relatado para a área urbana do município de Foz do Iguaçu. Esses registros reforçam a discussão a respeito da capacidade de adaptação de *L. longipalpis* e levantam questões importantes sobre sua biologia. Tendo em vista que o clima da região Sul do Brasil é caracterizado por invernos rigorosos, com temperaturas baixas, conhecer a exigência térmica dessa espécie é de fundamental importância para a ecoepidemiologia da LVA.

## 2 JUSTIFICATIVA

O aumento da incidência dos casos de LVA ocorrido nas últimas décadas despertou o interesse da comunidade científica a respeito da biologia de *L. longipalpis*. Atualmente, o vetor está entre os flebotomíneos mais estudados do mundo (SALOMÓN, 2021). Sua colonização em laboratório permitiu a realização de estudos sobre genômica, microbiota, interação parasito-vetor, saliva, feromônios e pesquisas comportamentais (SALOMÓN, 2021). Entretanto, ainda há aspectos biológicos do vetor pouco explorados ou desconhecidos, que podem ser avaliados em condições laboratoriais, como por exemplo, a sua resistência térmica frente às baixas temperaturas.

Pesquisas sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento biológico de insetos vetores são importantes para analisar suas demandas biológicas, previsibilidade de dispersão

e a sua influência na dinâmica da epidemiologia das doenças relacionadas (THOMAS et al, 2012). Esses estudos são mais frequentes com mosquitos, principalmente os do gênero *Aedes* (ALTO et al., 2001; CALADO et al., 2002; GARZÓN et al., 2021). Em relação aos flebotomíneos, pesquisas sobre avaliação de resistência térmica são escassas (BYRON et al., 1967; WARD & KILLICK-KENDRICK, 1974; BENKOVA, et al., 2007).

Tendo em vista a grande importância epidemiológica de *L. longipalpis* e a sua ascendente expansão geográfica, este estudo tem como objetivo analisar a exigência térmica das formas evolutivas de ovo a adulto de *L. longipalpis* sob a temperatura de 8°C. Essa condição foi testada como forma de avaliar a capacidade de adaptação e dispersão dessa espécie para regiões mais frias do Sul do Brasil. Este é o primeiro trabalho a avaliar em laboratório, os efeitos da temperatura de 8°C no desenvolvimento, digestão e oviposição desse vetor.

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral:**

Avaliar a resistência das formas evolutivas de *Lutzomyia longipalpis* à temperatura de 8°C em condições laboratoriais.

#### **Objetivos específicos:**

- Avaliar a taxa de eclosão de larvas L1 após a exposição de ovos à temperatura de 8°C;
- Avaliar o tempo de desenvolvimento das fases de larva (L1 a L4) e de pupa após a exposição de ovos à temperatura de 8°C;
- Avaliar a resistência térmica de larvas L1 e L4 à temperatura de 8°C;
- Avaliar a resistência térmica de fêmeas à temperatura de 8°C sem e com repasto sanguíneo;
- Avaliar a taxa de oviposição de fêmeas expostas à temperatura de 8°C;
- Avaliar a digestão sanguínea de fêmeas expostas à temperatura de 8°C.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Complexo *Lutzomyia longipalpis* e a transmissão de *Leishmania*

*Lutzomyia longipalpis* pertence a Ordem Diptera, Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Essa espécie foi descrita por Lutz & Neiva (1912) a partir de espécimes capturados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Algumas das estruturas morfológicas que caracterizam o inseto são: gonocoxito da genitália masculina apresentando cerdas persistentes simples ou modificadas na base e cerdas dorsais inseridas diretamente no parâmetro dos machos. No caso das fêmeas, as espermatecas são curtas, com comprimento 4x maior que a largura (YOUNG & DUNCAN, 1994).

Quando foi descrita, o interesse por *L. longipalpis* manteve-se restrito à área entomológica. Apenas após a confirmação de casos humanos de LVA (PENNA, 1934) e da presença de espécimes do vetor nas proximidades das habitações de pacientes com a doença no estado de Sergipe (CHAGAS, 1936) é que recebeu atenção das autoridades sanitárias brasileiras.

Deane e Deane (1954) relataram o primeiro encontro de fêmeas de *L. longipalpis* naturalmente infectadas por *L. infantum* durante um grave surto de LVA em Sobral, Ceará, que levou ao óbito mais de 100 pessoas. Na década de 1950, mais de 1000 casos de LVA foram registrados na região Nordeste. Na ocasião, foi observado que os casos ocorriam em vales úmidos e arborizados, e não em áreas de planícies secas ou nas encostas expostas das colinas, onde o clima árido os e ventos fortes eram desfavoráveis para o desenvolvimento de *L. longipalpis* (LAINSON & RANGEL, 2005). A incriminação do inseto como vetor de *L. infantum* foi concluída quando Lainson e colaboradores (1977) demonstraram a transmissão do parasito para hamsters por meio da picada de fêmeas infectadas.

Com o avanço das pesquisas de vigilância entomológica na América Latina foi constatado que *L. longipalpis* apresenta uma ampla distribuição geográfica no continente americano. Porém, existem barreiras naturais que acabam isolando as populações, favorecendo o surgimento de variações morfológicas e comportamentais entre elas (SOARES *et al.*, 2003). Atualmente, *L. longipalpis* é considerado um complexo de espécies com estruturas populacionais distintas e populações reprodutivamente isoladas (RÊGO *et al.*, 2021).

De acordo com Pech-May e colaboradores (2018), há dois clados de *L. longipalpis* nas Américas: o primeiro é composto por grupos presentes no Brasil e na Argentina e o segundo clado inclui populações da América Central e norte da América do Sul (Guatemala,

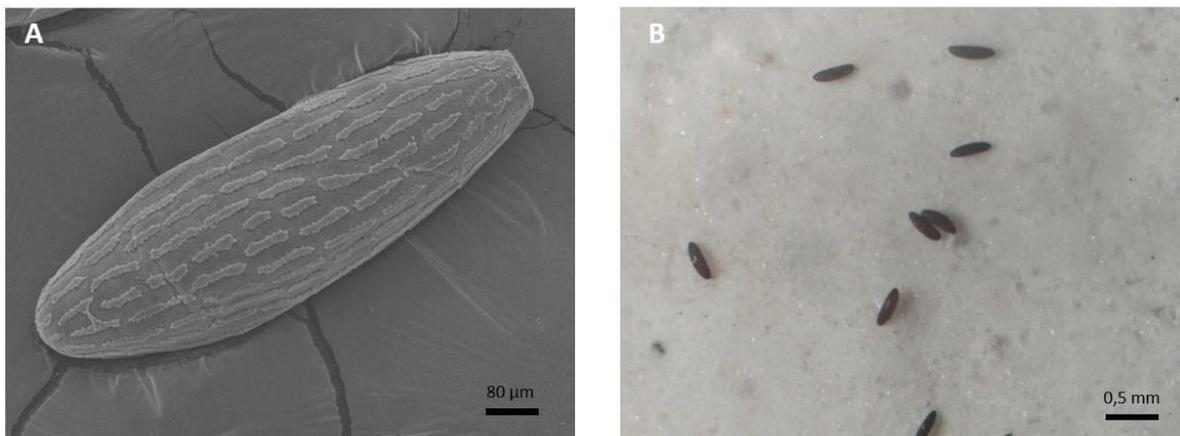
Honduras, Costa Rica, Colômbia e Venezuela). Contudo, mesmo pertencendo ao mesmo clado, as populações argentinas e brasileiras apresentam diferenças observadas em vários níveis, incluindo genético, morfológico, molecular e bioquímico (URIBE, 1999; ARAKI et al., 2009). Esses dados indicam que devido ao isolamento geográfico, essas populações podem estar em processo de especiação.

A divergência genética causada pelo isolamento geográfico pode afetar a capacidade vetorial de *L. longipalpis*, resultando em algumas populações sendo vetores mais eficientes do que outras (LANZARO et al, 1993; MAINGON et al., 2008). Além de ser o principal vetor de *L. infantum*, *L. longipalpis* é considerado um vetor permissivo (VOLF & MYSKOVA, 2007). Estudos mostram que populações do vetor criadas em laboratório são capazes de permitir o desenvolvimento e transmitir outras espécies de *Leishmania*, como *L. braziliensis* (ALEXANDRE et al, 2020) e *L. amazonensis* (SILVA et al., 2021), sendo esses os principais agentes etiológicos da LTA no Brasil. Além disso, populações de *L. longipalpis* já foram capturadas em focos de LTA no Brasil (DIAS et al, 2007; CARVALHO et al., 2010), o que sugere a participação do vetor na epidemiologia da doença.

#### 4.2 Ciclo de vida de *Lutzomyia longipalpis*

Os flebotomíneos apresentam desenvolvimento do tipo holometábolo, com ciclo de vida composto por quatro fases evolutivas: ovo, larva, pupa e adulto (WARD, 1990, KILLICK-KENDRICK 1999). De acordo com observações realizadas em laboratório, o ciclo biológico de ovo a adulto para *L. longipalpis* pode variar de 28 a 36 dias, dependendo da fonte de sangue. A oviposição geralmente inicia no quinto dia após o repasto sanguíneo e varia de 24 a 52 ovos por fêmea, podendo variar de acordo com a espécie, fonte de repasto sanguíneo e dieta das larvas (RANGEL et al., 1986; VOLF & VOLFOVA, 2011).

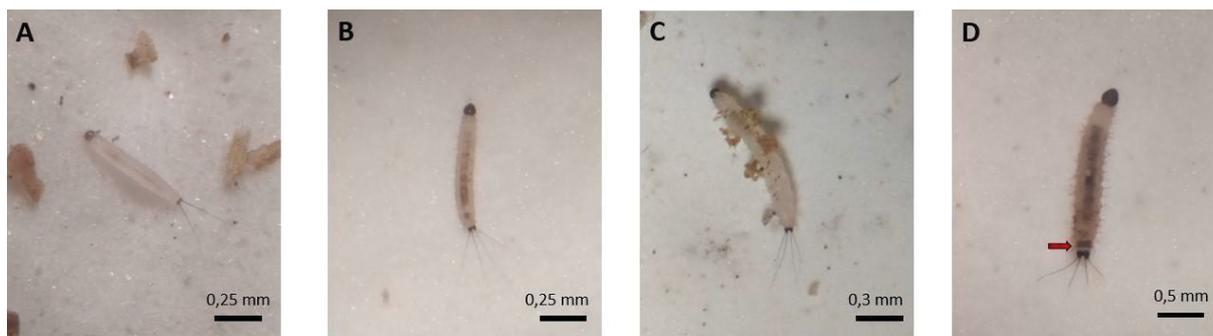
Os ovos dos flebotomíneos possuem forma elipsóide ou ovóide, medem cerca de 0,3 a 0,5 mm de comprimento e de 0,1 a 0,15 mm de largura (Fig. 1). Logo após a oviposição, apresentam coloração esbranquiçada, mas depois de algumas horas em contato com o ambiente tornam-se castanho-escuro (RANGEL et al., 2003). O exocório, camada externa da casca do ovo, possui ornamentações que podem variar de acordo com a espécie e gênero (PESSOA et al., 2008), porém essas variações não são suficientes para taxonomia de flebotomíneos (ALENCAR & SCARPASSA, 2018).



**Figura 1:** Ovos de *Lutzomyia longipalpis*. A) Imagem de ovo obtida por microscopia eletrônica de varredura. B) Ovos observados em um estereomicroscópio. Fonte: O autor.

O ciclo biológico dos flebotomíneos ocorre no ambiente terrestre, as fêmeas realizam a postura de seus ovos em substratos ricos em umidade, como abrigos de animais, frestas em troncos e rochas, solo contendo matéria orgânica em decomposição e folhas (ALENCAR et al., 2011; VIVERO et al., 2015).

As larvas geralmente eclodem entre seis e nove dias após a oviposição (RANGEL et al., 1986). Possuem corpo alongado, com coloração branca ou amarelada e cabeça marrom-escuro. São formadas por doze segmentos, sendo três segmentos do tórax e nove segmentos do abdômen. O aparelho bucal é do tipo triturador, adaptado para uma alimentação baseada em matéria orgânica presente no solo (BRAZIL & BRAZIL, 2018). O período larval dura em torno de quatorze a 19 dias e é dividido em quatro instares (RANGEL et al., 1986). O primeiro instar, chamado de L1, é de difícil visualização a olho nu devido ao tamanho minúsculo. As larvas de L1 possuem duas cerdas caudais proeminentes (Fig. 2A). No segundo instar, L2, as larvas apresentam um tamanho maior do que as do primeiro, e possuem quatro cerdas caudais, sendo essa uma característica fundamental para diferenciar as larvas L1 de L2 (Fig. 2B). Larvas de segundo e terceiro instar, chamadas de L2 e L3, respectivamente, podem ser facilmente confundidas, pois geralmente possuem tamanhos aproximados. Entretanto, a larva L3 costuma ser mais robusta e apresenta o último segmento com as boras mais escuras (Fig. 2C). As larvas de quarto estágio (L4), medem em torno de 4 mm e exibem uma característica placa anal dorsal esclerotizada (Fig. 2D). Próximo à muda para a fase de pupa, as larvas L4 param de se alimentar, e eliminam todo o alimento contido em seu intestino, ficando com o abdômen esbranquiçado (LAWYER et al., 2017).



**Figura 2:** Larvas de *Lutzomyia longipalpis*. A) Larva de primeiro estágio (L1); B) Larva de segundo estágio (L2); C) Larva de terceiro estágio (L3); D) Larva de quarto estágio (L4), a seta vermelha está apontando para a placa anal no último segmento. Fonte: O autor.

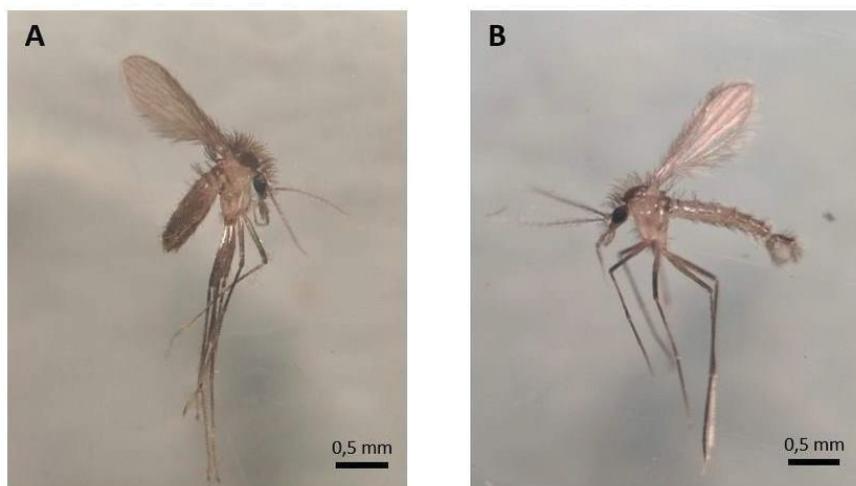
As pupas dos flebotomíneos possuem coloração branco-amarelada no início do empupamento e escurecem conforme se aproxima a emergência do adulto (BRAZIL & BRAZIL, 2018). O período pupal dura em torno de seis a dez dias (VOLF & VOLFOVA, 2011), durante esse período não se movimentam e ficam presas ao substrato pela exúvia larval, que cobre a sua porção caudal (Fig. 3). As pupas não se movem, executam apenas rápidos movimentos de flexão e extensão até a formação do inseto adulto (BRAZIL & BRAZIL, 2018; RANGEL et al., 2003).



**Figura 3:** Pupa de *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: O autor.

Os flebotomíneos adultos medem cerca de 3 mm de comprimento, são caracterizados pelo corpo densamente coberto por cerdas, pernas longas e apresentam voos curtos e saltitantes, além disso mantém as asas eretas mesmo quando em repouso (KILLICK-KENDRICK, 1999). Os machos e as fêmeas apresentam dimorfismo sexual, a diferenciação pode ser realizada, principalmente, através dos últimos segmentos abdominais (BRAZIL & BRAZIL, 2018) (Fig. 4). Enquanto a genitália das fêmeas é internalizada, os machos possuem a genitália externalizada, nas primeiras horas após a saída da pupa, a genitália dos machos

está dobrada junta ao corpo, aproximadamente 24 horas depois, a genitália rotaciona-se 180°, indicando maturidade sexual (BRAZIL & BRAZIL, 2018).



**Figura 4:** Adultos de *Lutzomyia longipalpis*. A) Fêmea; B) Macho. Fonte: O autor.

Outra característica morfológica que difere entre machos e fêmeas é o aparelho bucal. Os machos possuem peças bucais mais curtas, já o aparelho bucal das fêmeas é longo, adaptado para a hematofagia. O hábito hematófago é exclusivo das fêmeas, e necessária para a maturação dos ovos (MAGNARELLI & MODI, 1988). Tanto os machos quanto as fêmeas de flebotomíneos necessitam de uma dieta baseada em carboidratos para a obtenção de energia (LIMA et al, 2016), geralmente as fontes de carboidratos encontradas na natureza são seiva de plantas, néctar (ALEXANDER & USMA, 1994), secreção de afídeos e frutas (CAMERON et al., 1995). Além disso, a ingestão de carboidratos é importante para o desenvolvimento da *Leishmania* no intestino das fêmeas (SCHLEIN & JACOBSON, 1994).

#### 4. 3 Distribuição geográfica de *Lutzomyia longipalpis* e da LVA no Brasil

Os primeiros casos de LVA no Brasil foram registrados em áreas de poucas florestas ou desmatadas. Por conta disso, acreditou-se que a epidemiologia da doença, em ambiente doméstico, envolvesse restritamente o cão e *L. longipalpis* (LAINSON & RANGEL, 2005). Entretanto, estudos realizados na região amazônica do Brasil (CHAGAS et al. 1938; LAINSON et al. 1986), indicaram que *L. longipalpis* é uma espécie de origem silvestre. Na região norte do país, o vetor ainda é capturado em florestas primárias remotas e distantes de povoadamentos humanos. Quando são abertas estradas em meio a mata e habitações são construídas, a presença de *L. longipalpis* é rapidamente detectada (LAINSON & RANGEL, 2005).

Contudo, de acordo com BRAZIL (2013), a origem de *L. longipalpis* pode não estar relacionada a Floresta Amazônica ou a Mata Atlântica da América do Sul, mas sim ao Cerrado brasileiro e sua vegetação aberta. Durante o Pleistoceno, o Cerrado era mais úmido, o que possibilitaria a ocorrência do flebotomíneo. Se assim for, isso pode evidenciar que a capacidade de *L. longipalpis* se adaptar a diferentes ambientes não é recente.

Evidentemente, a dispersão e a colonização de novos ambientes pelos flebotomíneos não são processos condicionados apenas aos fatores naturais. Com o avanço das ações humanas sobre o meio ambiente para expansão de cidades e da fronteira agrícola, eventos destrutivos como desmatamento e queimadas, modificaram a ecologia de espécies de flebotomíneos e influenciaram seus padrões de dispersão (RANGEL & VILELA, 2008). Esses eventos reduziram a disponibilidade de oferta de fonte de alimentação natural de *L. longipalpis*, por exemplo, fazendo com o que o vetor passasse a colonizar gradativamente o meio rural. Assim, o cão e o ser humano se tornam as opções mais acessíveis como fonte de alimentação sanguínea, o que contribuiu para a dispersão de LVA pelo Brasil e na América do Sul (LAINSON & RANGEL, 2005).

Na década de 1980, *L. longipalpis* passou a invadir o meio urbano, principalmente a periferia das grandes cidades, sendo capturado nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar (LAINSON & RANGEL, 2005). Essa dispersão é atribuída principalmente a fatores como a modificação de ambientes naturais, grandes construções e fluxo migratório (MESTRE, et al., 2005; SALOMÓN, et al., 2015). Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, por exemplo, a construção de rodovias foi considerada um fator fundamental para a expansão geográfica do vetor e, conseqüentemente, da LVA. Acredita-se que a construção da rota Leste-Oeste do gasoduto Bolívia-Brasil e das rodovias BR 262 e Marechal Rondon, que ligam o estado de São Paulo à Bolívia, passando por Mato Grosso do Sul, tenham exercido um papel crucial na dispersão do vetor e da doença (ANTONIALLI, et al., 2007)

Estudos sobre a fauna flebotomínica em cidades brasileiras mostram que *L. longipalpis* é a espécie mais abundante em áreas urbanas (RANGEL & VILELA, 2008). O vetor tem sido reportado nas cinco regiões geográficas do Brasil e em quase todos os estados brasileiros, com exceção dos estados do Amazonas, na região norte, e de Santa Catarina, na região sul do país (BORGES *et al.*, 2017). A ocupação do vetor alcançou grandes centros urbanos brasileiros, o que levou à dispersão de casos de LVA em cidades como Rio de Janeiro (BRAZIL, 2013), Belo Horizonte (REZENDE *et al.*, 2006), Campo Grande (Oliveira *et al.*, 2006), Teresina (DUTRA, et al., 2007), Fortaleza (RODRIGUES et al., 2017), Natal (XIMENES et al., 2007) e a capital do país, Brasília (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010).

A mudança de perfil epidemiológico da LVA no Brasil, do ambiente rural para o urbano é observada desde a década de 1970 (GUALANDI, 2013). Os primeiros casos urbanos da doença foram registrados na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, na década de 1970 (MARZOCHI et al., 1985), e em Teresina, capital do estado do Piauí, entre os anos de 1980 e 1986 (COSTA et al., 1990).

De acordo com Brazil (2013), o padrão epidemiológico da LVA nos ambientes urbanos parece ser altamente heterogêneo. Fatores relacionados à biologia do vetor, como adaptação às diferentes temperaturas, ao intra e peridomicílio, hábitos ecléticos de alimentação e antropofilia são apontados como fundamentais para a difusão dos casos de LVA nas cidades (LOPES, 2009), além da dispersão ativa ou passiva de *L. longipalpis*. Contudo, com relação à dispersão ativa, estudos de recaptura de flebotomíneos adultos mostraram que no ambiente rural a distância de dispersão desses insetos pode chegar a 700 m (DYE et al., 1991). Já no ambiente urbano, a dispersão máxima de flebotomíneos adultos é de 243 m (OLIVEIRA et al., 2013). Esses dados sugerem que os flebotomíneos apresentam pouca atividade de dispersão em áreas urbanas, permanecendo no mesmo local devido à presença de abrigo e fonte alimentar. Portanto, a dispersão ativa não parece ser o principal mecanismo de invasão urbana. Provavelmente, as condições ideais para a proliferação de flebotomíneos no ambiente urbano estão sendo proporcionadas pelo próprio ser humano (BRAZIL, 2013). Com relação a dispersão passiva dos flebotomíneos, pouco se sabe. No entanto, a transferência de solo, frequentemente realizada para o desenvolvimento das cidades, tem sido apontada como importante fator para esse tipo de dispersão (BRAZIL, 2013). O transporte do solo de áreas rurais para a cidade durante a construção de praças e jardins, pode representar um problema devido à introdução de organismos que usam o solo como local de reprodução, como os flebotomíneos. Um exemplo deste tipo de dispersão passiva ocorreu na cidade do Rio de Janeiro, onde casos de LVA em cães foram registrados em um cemitério, no centro da cidade. A chegada de *L. longipalpis* até a área ocorreu pela transferência de solo usado em vasos de flores, que é proveniente de áreas de ocorrência de *L. longipalpis* fora do Rio de Janeiro (BRAZIL, 2013; SOLOMON, 2021). No município de Presidente Prudente, São Paulo, a dispersão de *L. longipalpis* ocorreu de forma semelhante. Inicialmente, o vetor foi localizado em um viveiro de flores com abundante adubação orgânica, e então passou a ocupar progressivamente quintais com galinheiros (PRESTES-CARNEIRO et al 2019).

Após ocupar a região Sudeste, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* chegou ao Sul do Brasil. Atualmente, são três os registros da presença do vetor na região, sendo dois no estado do Rio Grande do Sul (SOUZA et al., 2009; OSMARI et al., 2022) e um no estado do Paraná (SANTOS et al., 2012), este último ocorrido na área urbana do município de Foz

do Iguaçu. Até o presente momento, nenhuma capital dos estados da região Sul registrou a presença de *L. longipalpis*. No entanto, há registros de casos autóctones de LVA em Porto Alegre, capital do Rio Grande do Sul (MAHMUD et al., 2019), e em Florianópolis, capital de Santa Catarina (DIAS et al., 2013), atribuídos até então a transmissão do agente etiológico por outras espécies de flebotomíneos vetores que ali se encontram. A capital paranaense, Curitiba é considerada área indene para LVA. Entretanto, municípios da região metropolitana de Curitiba, como Adrianópolis, Cerro Azul e Itaperuçu são regiões endêmicas de LTA, possuem altos índices de degradação ambiental e abundância de diferentes espécies de flebotomíneos (CASTRO et al. 2005; CURTI et al, 2009).

#### 4.4 Influência de fatores abióticos sobre flebotomíneos

Temperatura e umidade são consideradas os principais fatores abióticos para a dispersão e estabelecimento dos flebotomíneos (BENKOVA et al., 2007). Entretanto, existem poucos estudos em laboratório documentando o impacto desses fatores na biologia e fisiologia desse grupo.

Na natureza, os flebotomíneos são muito sensíveis ao ressecamento e costumam procurar abrigos que os mantenham em uma mínima variação de temperatura e umidade. Por isso, costumam se abrigar em ambientes como caules e copas de árvores, tocas de animais, arbustos, fendas em rochas, ou mesmo em abrigos de animais domésticos ou domicílios de seres humanos (AGUIAR et al., 1985; AZEVEDO et al., 1993; XIMENES et al., 1999). O habitat natural desses insetos está diretamente relacionado aos fatores abióticos. Contudo, alguns grupos podem se adaptar às diferentes condições ambientais. *Lutzomyia longipalpis*, por exemplo, tem como principal habitat natural as áreas secas no centro e norte da América do Sul, entretanto, sabe-se que sua ocorrência também está associada à floresta úmida na bacia do rio Amazonas (LAINSON et al. 1985, LANZARO et al. 1993), o que evidencia a plasticidade de suas populações.

Em laboratório, as colônias de flebotomíneos estabelecidas para estudos e realização de experimentos são mantidas a uma temperatura de 25 a 28°C e umidade relativa do ar entre 70 e 95%, sendo essas as condições consideradas ideais para o desenvolvimento dos espécimes e que garantem maior longevidade (KILLICK-KENDRICK et al., 1977; VOLF & VOLFOVA, 2011). Observações em laboratório, mostram que as colônias de flebotomíneos mantidas nessas condições padrão de temperatura e umidade por muitas gerações, tendem a apresentar o tempo de ciclo de vida bastante estável.

No entanto, quando os insetos são submetidos às condições ambientais adversas, como baixas temperaturas, algumas espécies podem entrar dormência, que é uma estratégia de sobrevivência que prolonga seu tempo de desenvolvimento, podendo se manifestar na fase embrionária, em imaturos (larvas e pupas) e no estágio adulto (GORDON; HEADRICK, 2001). A dormência é dividida em duas categorias: a diapausa e a quiescência (DANKS, 1987). Esses termos foram, por muito tempo, reportados como sinônimos na literatura, contudo, são estratégias de sobrevivência que provêm de vias de sinalização diferentes, embora tenham a mesma finalidade: garantir a sobrevivência durante e após a adversidade do meio (DINIZ et al, 2017).

A diapausa consiste em um estado de baixa atividade metabólica que é determinado geneticamente e mediado por neuro-hormônios que afetam fenotipicamente os indivíduos, aumentando a tolerância a condições ambientais extremas (TAUBER et al., 1986; SMITH, 1987). Este processo é pouco estudado em flebotomíneos, mas já foi relatado em larvas (KILLICK-KENDRICK & KILLICK-KENDRICK 1987; KUMAR & KISHORE 1991; VOLF & VOLFOVA, 2011) e ovos (TROUILLET & VATTIER-BERNARD, 1979).

A quiescência é um tipo de dormência caracterizada pelo retardo do metabolismo, resultante da ação direta de condições ambientais desfavoráveis ao inseto, como por exemplo, alterações de umidade e temperatura (CHRISTOPHERS, 1960). Este processo difere da diapausa por não ser um evento geneticamente programado, nem controlado por hormônios, e uma vez cessado o estímulo que induz o processo, as atividades fisiológicas tendem a ser retomadas (DENLINGER, et al, 2014). Estudos sobre este fenômeno em flebotomíneos são escassos (LAWYER & YOUNG, 1991), provavelmente por ser confundido com a diapausa, sobretudo quando se refere à dormência embrionária.

Tanto a diapausa quanto a quiescência podem representar estratégias fundamentais para a ecologia dos flebotomíneos na natureza, pois permitem a sobrevivência desses insetos em seu habitat durante condições adversas, como nos períodos de baixas temperaturas e de seca (RYAN et al, 1986; LAWYER & YOUNG, 1991).

Além de afetar o desenvolvimento dos flebotomíneos, a temperatura também pode interferir significativamente nos processos fisiológicos e metabólicos dos flebotomíneos adultos, como por exemplo na digestão (BENKOVA & VOLF, 2007). Temperaturas mais baixas tendem a atrasar o processo de digestão do sangue nas fêmeas e conseqüentemente retardam a defecação. Considerando que as espécies de *Leishmania* precisa se aderir a parede do intestino das fêmeas de flebotomíneos para se reproduzir, a defecação retardada

pode proporcionar mais tempo para que os parasitas se estabeleçam no intestino do vetor (HLAVACOVA et al., 2013).

As condições climáticas também exercem grande influência na distribuição geográfica de flebotomíneos e, conseqüentemente, na ocorrência das leishmanioses em cães e humanos (PETERSON & SHAW, 2003; ALMEIDA et al., 2013; DEL CARRO et al, 2020). Estudos indicam que o aumento da temperatura provocado pelo aquecimento global levará a uma extensão das áreas de distribuição desses insetos (ASPÖCK et al, 2008; PETERSON et al, 2017). Na América do Sul, de acordo com Peterson e colaboradores (2017), *L. longipalpis* tende a expandir sua distribuição na Amazônia Oriental e na região Sul, como vem ocorrendo nos estados do norte e sul brasileiro.

Em um estudo de predição da distribuição geográfica de *L. longipalpis* e de LVA no estado do Mato Grosso do Sul, Almeida e colaboradores (2013), concluíram que a temperatura e a precipitação média anual foram as variáveis que mais influenciaram na ocorrência do vetor e da doença no estado. Do mesmo modo, estudos de modelagem, apontaram a temperatura como uma das principais contribuintes para a dispersão do vetor nos estados de São Paulo (OLIVEIRA, 2018) e Espírito Santo (DEL CARRO et al, 2020). Entretanto, os dados obtidos por modelagem nem sempre coincidem com a real distribuição do vetor. O modelo adotado na previsão realizada por Peterson e colaboradores (2017), por exemplo, aponta para uma não inserção de *L. longipalpis* no Uruguai, contudo, o vetor já é registrado no país desde 2011 (SALOMÓN et al., 2011). Isso mostra que o conhecimento sobre a resistência e susceptibilidade do vetor aos fatores abióticos, como a temperatura, ainda precisa ser aprimorado e mais estudos laboratoriais a este respeito deste tema, realizados.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5. 1 Estabelecimento da Colônia de *Lutzomyia longipalpis***

Os espécimes utilizados nos experimentos são provenientes de ovos da colônia de *L. longipalpis* de Jacobina, Bahia, cedidos pelo Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz, coordenado pelo Dr. Fernando Ariel Genta. No insetário Professor Ênio Luz da Universidade Federal do Paraná (Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica), a colônia foi estabelecida de acordo com os protocolos adotados por (VOLF & VOLFOVA, 2011).

Os flebotomíneos foram criados em recipientes de plástico com o fundo perfurado e preenchidos com uma camada de 2 cm de gesso branco. O gesso garante a umidade no recipiente e fornece uma superfície de descanso para os insetos sem condensação de água. Os recipientes foram fechados com um pedaço de tecido *voil* na tampa de encaixe, cujo centro foi recortado com diâmetro de 3 cm para retirada e introdução de adultos, bem como para a alimentação dos adultos, por meio de algodão embebido com sacarose 70%. Os insetos adultos eram introduzidos por meio de um aspirador entomológico e o orifício fechado com algodão (Figura 5).



**Figura 5:** Recipiente de criação de flebotomíneos. Fonte: O autor.

Os recipientes de criação foram colocados em bandejas plásticas revestidas com toalhas de papel umedecidas com água destilada para manter o gesso úmido. As bandejas com os insetos foram alocadas em uma estufa do tipo BOD (Demanda Biológica de Oxigênio), sob temperatura de 26°C e umidade relativa do ar (URA) de 80%. Às fêmeas foram ofertados os camundongos previamente anestesiados com Xilazina (10 mg/kg) e Cetamina (100 mg/kg) por via intraperitoneal, como fonte sanguínea, de acordo com o protocolo aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná sob o número 075.062623/2019-16. Os repastos ocorreram em uma gaiola de *voil* sob ausência de luz.

Após o repasto, as fêmeas foram colocadas nos recipientes de criação novamente para a oviposição. Após a postura dos ovos e eclosão, as larvas foram alimentadas com uma mistura de ração para peixe, ração para coelho, fezes de coelho e terra, na proporção de 1:1:1:1. Os recipientes contendo larvas foram vistoriados periodicamente para o controle de ácaros e fungos.

## 5. 2 Determinação da temperatura e dos grupos experimentais

Devido ao fato de que *L. longipalpis* tem sido relatado no Sul do País, onde segundo a classificação de Köppen predominam os climas subtropical e temperado (WREGE, et al., 2012), foram avaliadas as médias das temperaturas mínimas nos últimos cinco anos, de 2018 a 2022 da cidade de Curitiba, capital do estado do Paraná. Tal escolha se deve ao fato de Curitiba ser a capital de estado mais fria do Brasil, com o maior perímetro urbano da região Sul do país (RABINOVITCH, 1996). De acordo com a classificação de Köppen, o clima predominante no município é do tipo subtropical úmido, mesotérmico, sem estação seca, com verões frescos e invernos com geadas frequentes. A região está inserida no Bioma Mata Atlântica (IPPUC, 2014). Possui 1.090 de área verde, cerca de 300 mil árvores de rua (CURITIBA, 2014) e floresta urbana que corresponde a 43,69% da área do município (GRISE, 2017).

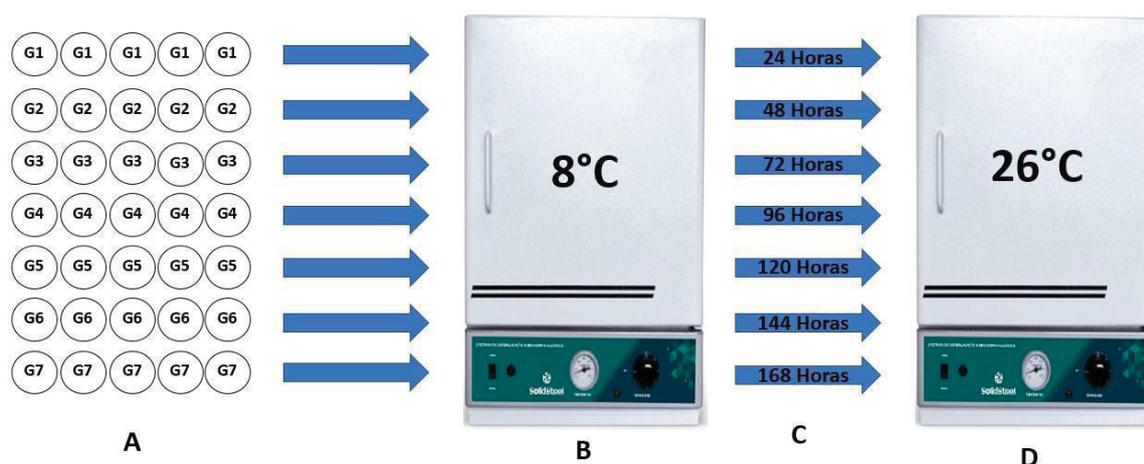
As médias das temperaturas mínimas mensais da cidade de Curitiba foram solicitadas ao Sistema de Tecnologia e Monitoramento Ambiental do Paraná (SIMEPAR). A partir dos dados obtidos, foi calculada a média aritmética das temperaturas, chegando-se ao resultado de 8°C.

Foram realizados três experimentos para avaliar a resistência térmica de *L. longipalpis*:

- Experimento 1: Resistência térmica de ovos de *Lutzomyia longipalpis*.
- Experimento 2: Resistência térmica de larvas de *Lutzomyia longipalpis*.
- Experimento 3: Resistência térmica de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*.

Para cada experimento foram formados sete grupos (temperatura de 8°C e URA de 80%), e um grupo controle (temperatura 26°C e URA de 80%). Todos os grupos experimentais foram expostos, após cada período determinado, às condições do controle até o término do desenvolvimento (Fig. 6).

- Grupo 1: Exposição à 8°C/URA 80% por 24h, na sequência, 26°C/URA 80%;
- Grupo 2: permaneceu à 8°C/URA 80% por 48h, na sequência, 26°C/URA 80%;
- Grupo 3: permaneceu à 8°C/URA 80% por 72h, na sequência, 26°C/URA 80%;
- Grupo 4: permaneceu à 8°C/URA 80% por 96h, na sequência, 26°C/URA 80%;
- Grupo 5: permaneceu à 8°C/URA 80% por 120, na sequência, 26°C/URA 80%;
- Grupo 6: permaneceu à 8°C/URA 80% por 144, na sequência, 26°C/URA 80%;
- Grupo 7: permaneceu à 8°C/URA 80% por 168h, na sequência, 26°C/URA 80%.



**Figura 6:** Sequência dos experimentos de resistência térmica. A) Sete grupos (tratamento e controle), replicados 5 vezes; B) Estufa à temperatura de 8°C (Tratamento); C) Tempo de exposição de cada grupo à temperatura de 8°C; D) Estufa à temperatura de 26°C para grupos pós tratamento e para os grupos controle.

### 5. 3 Experimento 1: Resistência térmica dos ovos de *Lutzomyia longipalpis*

Para a obtenção dos ovos, 110 fêmeas de *L. longipalpis* foram colocadas em gaiolas de tecido *voil* junto a camundongos Swiss previamente anestesiados com Xilazina (10 mg/kg) e Cetamina (100 mg/kg) para a realização do repasto sanguíneo. Após todas as fêmeas se ingurgitarem, as mesmas foram colocadas em um recipiente plástico contendo gesso e alocados em uma estufa BOD.

A oviposição teve início no terceiro dia pós-repasto sanguíneo. Oito horas após a visualização dos primeiros ovos, as fêmeas grávidas foram transferidas para outro recipiente. Quando os ovos completaram quatro dias, cerca de 96 horas, tempo necessário para a formação das principais estruturas do embrião no interior dos ovos dos flebotomíneos, de acordo com Abbassy e colaboradores (1995), os mesmos foram divididos nos grupos experimentais em recipientes plásticos contendo gesso e submetidos ao tratamento térmico (Figura 7). Cada grupo experimental foi composto por 15 ovos, totalizando 75 ovos por grupo e 600 ovos para realização de todo o experimento.



**Figura 7:** Recipientes plásticos contendo os ovos de *Lutzomyia longipalpis* que foram submetidos ao tratamento térmico.

Durante e após o tempo de exposição dos ovos à temperatura de 8°C, foram realizadas leituras diárias para acompanhar o tempo de eclosão das larvas, a transição dos estágios larvários, a pupação e a emergência dos adultos. Os dados das leituras foram registrados em uma planilha Excel.

Os critérios para diferenciação dos estádios larvários foram:

- Larva L1: presença de duas cerdas caudais;
- Larva L2: presença de 4 cerdas caudais;
- Larva L3: escurecimento das bordas do dorso do último segmento;
- Larva L4: Formação da placa anal dorsal esclerotizada.

#### 5. 4 Experimento 2: Resistência térmica de larvas L1 e L4 de *Lutzomyia longipalpis*

Para avaliar a resistência térmica das larvas L1 de *L. longipalpis* à temperatura de 8°C, foram separados 600 ovos provenientes de colônia com 120 fêmeas, após 8h de oviposição. Os ovos foram divididos em sete grupos experimentais mais o controle (Ver 5.2) e mantidos à 26°C até a eclosão das larvas. Em cada recipiente foi adicionado 1g da mistura da alimentação larval, a qual é composta por ração de peixe, ração de coelho, fezes de coelho e terra.

Para avaliar a resistência térmica das larvas L4, foram selecionadas 600 larvas com a placa anal dorsal esclerotizada totalmente formada e com o abdômen esbranquiçado (Fig. 8), indicando a liberação do material estomacal.

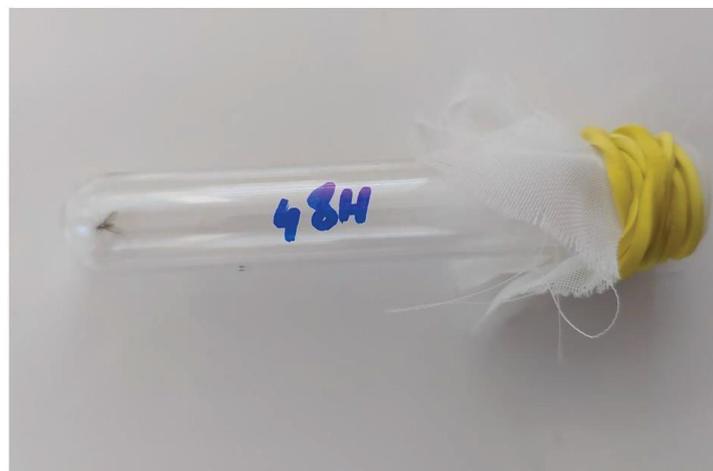


**Figura 8:** Larva L4 de *Lutzomyia longipalpis* com o abdômen esbranquiçado. Fonte: O autor.

Cada grupo foi composto por 15 larvas. Os experimentos com os dois estádios larvais foram replicados cinco vezes. Durante e após a incubação à 8°C, foram realizadas leituras diariamente para avaliar o desenvolvimento, assim como, a mortalidade das larvas.

### 5.5 Experimento 3: Resistência térmica de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

Para avaliação da resistência térmica de fêmeas de *L. longipalpis*, foram utilizadas 600 fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo antes da exposição à temperatura de 8°C e 600 fêmeas alimentadas apenas com açúcar e que realizaram o repasto sanguíneo após exposição à temperatura de 8°C. Ambos os grupos de fêmeas foram alimentados com solução de sacarose 70% até completarem 72h de idade. Posteriormente, os insetos foram divididos em sete grupos experimentais mais o controle (Ver 5.2), sendo 15 espécimes/grupo. Após o tempo de exposição de cada grupo (de 24h a 168h), as fêmeas foram alimentadas com solução de sacarose e individualizadas em tubos de vidro transparentes (medindo 1,2 cm de diâmetro por 12 cm de altura) para realização da oviposição (Fig.9).



**Figura 9:** Tubo de vidro com fêmea de *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: O autor.

Na abertura dos tubos foram colocados pedaços de *voil* amarrados com elásticos para permitir a entrada de ar e umidade. Os tubos foram colocados em bandejas com toalhas de papel umedecidas e armazenados em estufa, à 26°C. Foram realizadas leituras diárias para avaliar a digestão do sangue, a defecação, a longevidade das fêmeas e para contabilizar o número de ovos postos por cada fêmea.

## 5.6 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados por meio de teste-t no programa estatístico Stata. Foi aplicado o teste de Tukey no software BioStat 5.3 para a realização de comparações par-a-par dos efeitos dos tratamentos sobre cada amostra, com correção de Bonferroni dos p-valores, sendo adotados um valor de significância igual ou menor a 0,05.

Foram estabelecidas duas hipóteses:

- Hipótese H0: a temperatura de 8°C pode influenciar no tempo para eclosão das larvas L1 de *L. longipalpis*, alterar a sobrevivência de larvas L1, L4, influenciar na longevidade de fêmeas e influenciar na quantidade de ovos depositados.
- Hipótese H1: a temperatura de 8°C não interfere no desenvolvimento e nas atividades metabólicas de *L. longipalpis*.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resistência térmica dos ovos de *Lutzomyia longipalpis*

Nenhuma larva eclodiu sob a temperatura de 8°C nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas (Fig. 13 A). Contudo, todos os grupos apresentaram taxas de eclosão de larvas L1 superiores a 25% após retornarem à temperatura de 26°C. No grupo controle, o percentual de eclosão de larvas L1 foi de 90,6%. As taxas de eclosão dos grupos de tratamento foram inversamente proporcionais ao tempo de incubação à 8°C, ou seja, quanto maior o tempo de incubação, menor foi a taxa de eclosão. Sendo assim, o menor percentual de eclosão foi registrado no grupo G7 (26,6%), o qual foi incubado à 8°C por 168h e o maior no grupo G1 (70,6%), o qual foi incubado por 24h (Tabela 1).

Tabela 1. Ecloração de larvas (L1) de *Lutzomyia longipalpis* em temperatura de 8°C

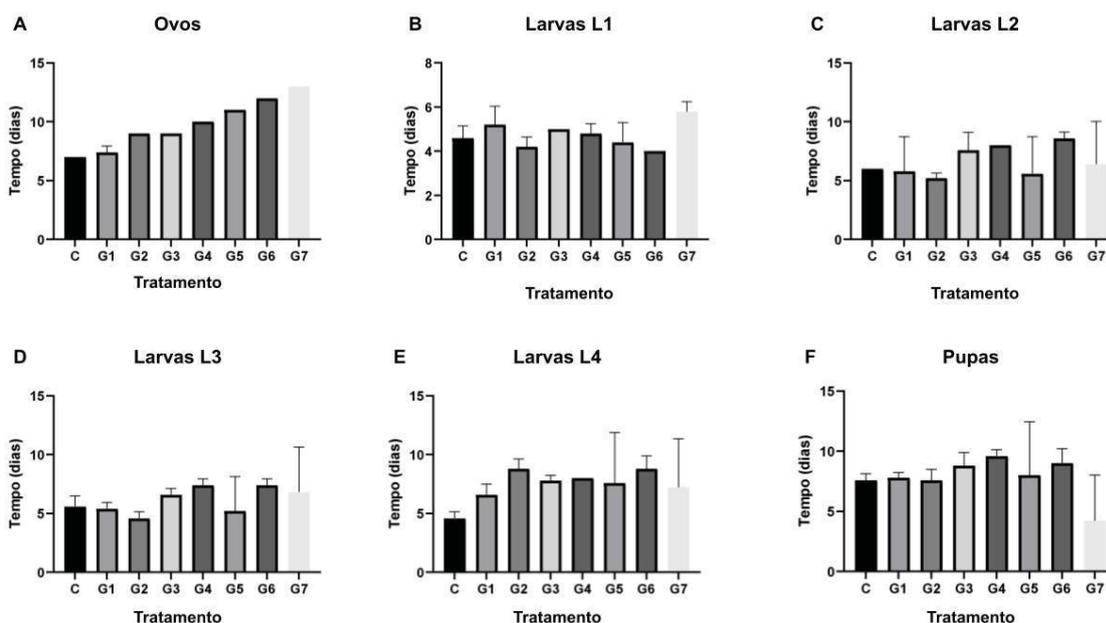
Tratamento	Taxa de ecloração (%)	Desvio padrão
Controle	90,6	8,94
G1	70,6	14,8
G2	67,9	9,9
G3	62,6	10,11
G4	58,6	8,69
G5	38,6	16,59
G6	29,3	7,6
G7	26,6	14,14

**Legenda:** G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 equivalem aos grupos que permaneceram 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144h e 168h, respectivamente, sob temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%, e posteriormente, sob temperatura 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80%; O grupo controle permaneceu sob a temperatura de 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80% durante todo o período do experimento.

A ecloração das larvas so teve início após um período mínimo de 48h sob temperatura de 26°C para todos os tempos testados. Os períodos de duraoo do estádio de ovo não variaram significativamente entre as réplicas dos grupos. Porém, quando comparados ao grupo controle, os ovos dos grupos G2, G3, G4, G5 G6 e G7 apresentaram um tempo para ecloração das larvas respectivamente maior. A média do tempo de duraoo dos ovos do grupo controle, ou seja, tempo para ecloração das larvas L1, foi de sete dias. Entre os grupos testados, o grupo G1 apresentou a menor média, que foi de 7,4 dias. O tempo médio para ecloração das larvas do grupo G7 foi de treze dias (Figura 10A).

Na comparaoo entre o tempo de desenvolvimento do estádio de larva L1 houve diferença significativa apenas entre o controle e o grupo G7, as demais comparaoes apresentaram valor de p não significativo ( $p > 0,01$ ) (Fig. 10 B). Em relaoo ao estádio de larva L2, houve diferença significativa entre o controle e os grupos G3, G6 e G7 (Fig. 10 C). Para o tempo de desenvolvimento do estádio de larva L3, houve significância para os grupos de G3 a G7 (Fig. 10 D). O tempo de permanência para o estádio larval L4 foi maior do que observado no controle em todos os grupos experimentais. Enquanto no controle as larvas permaneceram nesse estádio em torno de cinco dias, nos grupos experimentais a

permanência foi de seis a dez dias. Todas as comparações realizadas para o estágio larval L4 foram significativas ( $p < 0,05$ ) (Fig. 10 E). Para pupa, os grupos G3 ao G6 apresentaram resultados significativos ( $p < 0,05$ ). A maioria das pupas do grupo G7 não completaram seu desenvolvimento, por isso a média do tempo de duração do estágio de pupa nesse grupo foi 4 dias (Fig. 10 F).



**Figura 10:** Tempo de desenvolvimento de cada estágio de *Lutzomyia longipalpis* após a incubação em temperatura a 8°C e umidade relativa do ar de 80%. G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 equivalem aos grupos que permaneceram 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144h e 168h, respectivamente, sob temperatura de 8°C e Umidade Relativa do ar de 80%, e posteriormente, sob temperatura 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80%; O grupo controle permaneceu sob a temperatura de 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80% durante todo o período do experimento.

A temperatura de 8°C prolongou o tempo de desenvolvimento total (de ovo a adulto) de todos os grupos experimentais (Tabela 2). Todas as comparações com o controle foram significativas. O grupo controle levou um tempo médio de 35,4 dias para chegar até o estágio adulto. Os grupos incubados à 8°C apresentaram o desenvolvimento tempo-dependente, de modo que os grupos com maior tempo de incubação demoraram mais a se desenvolver.

Tabela 2. Tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) de *Lutzomyia longipalpis* em temperatura de 8°C

Treatmento	Tempo (dias)	Desvio padrão
------------	--------------	---------------

Controle	35,4	1,14
G1	38,2	3,42
G2	39,4	0,89
G3	44,8	2,04
G4	47,8	1,09
G5	48,7	1,25
G6	49,8	2,04
G7	52,0	4,06

**Legenda:** G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 equivalem aos grupos que permaneceram 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144h e 168h, respectivamente, sob temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%, e posteriormente, sob temperatura 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80%; O grupo controle permaneceu sob a temperatura de 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80% durante todo o período do experimento.

## 6. 2 Resistência térmica das larvas L1 e L4 de *Lutzomyia longipalpis*

As larvas permaneceram imóveis durante todos os tempos de tratamento e levaram alguns minutos para voltarem a se movimentar após o término da incubação à 8°C. Foi observado que durante os tratamentos, as larvas não se alimentaram. O tubo digestivo, que é visível quando são observadas em um estereomicroscópio, estava limpo, sem resquícios de alimentação.

O efeito da redução de temperatura de 26°C para 8°C foi deletério para as larvas L1 de todos os grupos tratados (Tabela 3). Nos grupos G5, G6 e G7, nenhuma larva sobreviveu ao tratamento. No grupo controle, todas as larvas L1 passaram para o estágio L2 (processo de ecdise ou muda) em um período médio de quatro dias. 87,6% das larvas do grupo G1 sobreviveram ao tratamento de 24h e realizaram a ecdise para L2 em 5,6 dias. Nos grupos G3 e G4, 61,5% e 31,2% das larvas sobreviveram aos tratamentos, respectivamente. Nesses dois grupos, o período para ecdise foi prolongado quando comparados aos demais grupos, fazendo com as larvas permanecessem mais tempo no estágio L1.

---

Tabela 3. Porcentagem de larvas L1 de *Lutzomyia longipalpis* sobreviventes aos tratamentos e tempo médio para realização da ecdise do estágio L1 para L2

---

Tratamento	Larvas sobreviventes (%)	Desvio padrão	Tempo médio para ecdise (L1-L2) (dias)	Desvio padrão
Controle	100	0	4,0	0,7
G1	87,6	9,88	5,6	0,89
G2	61,5	8,69	6,0	0,7
G3	31,2	10,11	6,2	0,83
G4	8	5,58	8	0,7
G5	0	0	0	0
G6	0	0	0	0
G7	0	0	0	0

**Legenda:** G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 equivalem aos grupos que permaneceram 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144h e 168h, respectivamente, sob temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%, e posteriormente, sob temperatura 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80%. O grupo controle permaneceu sob a temperatura de 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80% durante todo o período do experimento.

As larvas L4 apresentaram maior resistência ao tratamento térmico. Mais de 70% das larvas de quarto estágio (L4) sobreviveram ao tratamento em todos os grupos avaliados. No grupo G1, a sobrevivência foi de 96,4%. Nos demais grupos, a porcentagem de larvas sobreviventes decaiu com o aumento do tempo de tratamento, sendo G7 o grupo com a menor taxa de sobrevivência larval (Tabela 4).

Nenhuma larva pupou durante o tratamento. A incubação à temperatura de 8°C prolongou o tempo de duração do estágio L4 (Tabela 4). Enquanto que no grupo controle as larvas permaneceram neste estágio por um tempo médio de 4,8 dias, nos grupos tratados o período para a formação das pupas variou de 7,3 dias (grupo G1) a 17,8 dias (grupo G7).

Tabela 4. Porcentagem de larvas L4 de *Lutzomyia longipalpis* sobreviventes aos tratamentos e tempo médio para pupação

Tratamento	Larvas sobreviventes (%)	Desvio padrão	Tempo médio de L4 a pupa (dias)	Desvio padrão
Controle	100	0	4,8	0,44

G1	96,4	3,66	7,3	0,83
G2	92,7	5,57	8,4	0,54
G3	83,2	10,11	8,2	0,83
G4	85,9	9,88	12	1,22
G5	80,5	7,71	11,9	1,09
G6	82,6	7,6	15,2	0,83
G7	72	5,58	16	0,7

**Legenda:** G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 equivalem aos grupos que permaneceram 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144h e 168h, respectivamente, sob temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%, e posteriormente, sob temperatura 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80%. O grupo controle permaneceu sob a temperatura de 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80% durante todo o período do experimento.

### 6. 3 Resistência térmica de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

Durante os tempos de tratamento, os insetos permaneceram imóveis, recuperando os movimentos em minutos após o término da incubação. Todas as fêmeas do grupo “não ingurgitadas” realizaram o repasto sanguíneo em até 45 minutos após os períodos de incubação a 8°C. Para esses grupos que receberam a alimentação sanguínea após os tratamentos (8°C), os tempos para início da defecação e oviposição foram os mesmos do grupo controle, 48 h e 72 h, respectivamente.

As fêmeas do grupo controle iniciaram a defecação e a oviposição 48h e 72h após a alimentação sanguínea, respectivamente. As fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo antes do tratamento térmico, não ovipositaram e nem defecaram sob a temperatura de 8°C. Ao fim dos períodos de incubação, todas as fêmeas continuavam com o abdômen distendido, ou seja, o sangue não foi digerido durante os tratamentos. Em todos os grupos de fêmeas pré ingurgitadas, a defecação iniciou 48h após o retorno para a temperatura de 26°C e a oviposição após 72h.

A longevidade média do grupo controle foi de 9,6 dias. Entre as fêmeas pré ingurgitadas, os grupos G1, G2 e G3 não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle. Porém, os grupos G4, G5, G6 e G7 apresentaram médias de longevidade sequencialmente superiores aos demais grupos. Ou seja, os grupos destas

fêmeas ingurgitadas incubados a 8°C por 96, 120, 144 e 168 horas apresentaram maior longevidade que o grupo controle (Figura 3 A).

Entre as fêmeas que receberam alimentação sanguínea após o tratamento houve diferença significativa na longevidade de todos os grupos quando comparados com o controle (Figura 3 B). Os grupos que foram incubados à 8°C por mais tempo, apresentaram maior longevidade. Os grupos G1 e G2 apresentaram médias de 10,8 e 11,8 dias, respectivamente. No grupo G3 a média de longevidade foi de 11,2 dias. As fêmeas do grupo G7 apresentaram longevidade média de 13,4 dias, próxima a longevidade do grupo G7 das fêmeas pré ingurgitadas, que foi de 12,8 dias.

Tabela 5. Longevidade de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* ingurgitadas antes (FPre) e após o tratamento (Fpos)

Tratamento	Dias (Fpre)	Desvio padrão	Dias (Fpos)	Desvio padrão
Controle	9,6	1,09	9,6	1,09
G1	10	1,87	10,8	0,83
G2	9,6	1,34	11,8	0,83
G3	9,2	0,83	11,2	1,3
G4	11	1,58	12,2	0,83
G5	11,2	1,3	12,8	1,92
G6	12,6	1,14	12,6	1,14
G7	12,38	0,83	13,4	1,14

**Legenda:** G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 equivalem aos grupos que permaneceram 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144h e 168h sob temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%, e posteriormente, sob temperatura 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80%. O grupo controle permaneceu sob a temperatura de 26°C e Umidade Relativa do ar de 80% durante todo o período do experimento.

A média de ovos depositados pelo grupo controle foi de 69,14 ovos por fêmea. Tanto nos grupos de fêmeas pré ingurgitadas (Fpre) como naqueles que realizaram o repasto sanguíneo após a incubação a 8°C (Fps), a oviposição decaiu de acordo com o aumento do tempo de tratamento (Tabela 6) Entretanto, os grupos de fêmeas que foram ingurgitadas após o tratamento, ovipositaram uma média de ovos maior em todos os grupos quando

comparados com os grupos equivalentes das fêmeas pré ingurgitadas. A média de ovos depositados pelas fêmeas pré ingurgitadas do grupo G7, por exemplo, foi de 12,38 ovos; já nas fêmeas que realizaram o repasto posteriormente ao tratamento, a média foi 41,16 ovos, o equivalente a três vezes mais que a média do mesmo grupo equivalente.

Tabela 6. Ovos depositados por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* ingurgitadas antes (FPre) e após o tratamento (Fpos)

Tratamento	Média de ovos (FPre)	Desvio padrão	Média de ovos (FPos)	Desvio padrão
Controle	69,14	7,8	69,14	7,8
G1	53,64	5,09	63,78	10,42
G2	47,98	5,82	55,3	6,75
G3	48,7	48,7	58,92	8,37
G4	39,46	7,26	47,3	4,55
G5	28,82	6,95	50,5	6,14
G6	16,1	6,01	42,24	5,72
G7	12,38	4,95	41,16	8,6

**Legenda:** G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7 equivalem aos grupos que permaneceram 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144h e 168h sob temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%, e posteriormente, sob temperatura 26°C e Umidade Relativa do Ar de 80%. FPre= Fêmeas ingurgitadas antes do tratamento temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%; FPos=Fêmeas ingurgitadas após o tratamento (temperatura de 8°C e Umidade Relativa do Ar de 80%). O grupo controle permaneceu sob a temperatura de 26°C e Umidade Relativa do ar de 80% durante todo o período do experimento.

## 7 DISCUSSÃO

A incubação das diferentes fases evolutivas *Lutzomyia longipalpis* à temperatura de 8°C mostrou que baixas temperaturas afetam o desenvolvimento desta espécie. Os resultados obtidos no experimento de resistência térmica dos ovos de *Lu. longipalpis* evidenciou que o processo de embriogênese é interrompido sob a temperatura de 8°C. A incubação dos ovos sob a temperatura de 8°C influenciou no tempo de eclosão das larvas L1, prolongando o estágio de ovo, e inviabilizou mais da metade dos ovos dos grupos tratados por mais de 120 horas. Além disso, o tratamento térmico alterou o tempo de desenvolvimento das larvas e pupas provenientes dos ovos submetidos ao tratamento.

A eclosão das larvas de primeiro instar de todos os grupos de ovos tratados só ocorreu no segundo e terceiro dia após o término dos tempos de tratamento. Isso sugere que a redução da temperatura à 8°C fez com que os ovos entrassem em processo de dormência embrionária. É interessante ressaltar que os ovos foram submetidos ao tratamento térmico após 96 horas (quatro dias) da sua oviposição. O tempo médio de desenvolvimento total dos ovos do grupo controle, da oviposição até a eclosão das larvas, foi de sete dias. Sendo assim, podemos observar que o desenvolvimento embrionário dos ovos tratados foi retomado imediatamente após a transferência para a temperatura de 26°C, pois somando-se os tempos antes do tratamento (quatro dias) e pós-tratamento (dois/três dias) dos ovos, temos um período de seis a sete dias.

Embora os mecanismos de dormência embrionária nos flebotomíneos sejam pouco estudados, esta adaptação é considerada uma estratégia importante para a sobrevivência dos insetos sob condições ambientais desfavoráveis. Muitos dos relatos de ocorrência de dormência neste grupo estão relacionados às espécies de regiões temperadas onde as baixas temperaturas dificultam a ocorrência desses insetos (READY & CROSET, 1980; LAWYER & YOUNG, 1991; VOLF & VOLFOVA, 2011). No entanto, há estudos que mostram que espécies da zona tropical também podem apresentar esta estratégia de sobrevivência (TROUILLET & VATTIER-BERNARD, 1979). Ward e Killick-Kendrick (1979), por exemplo, observaram a dormência embrionária em ovos de *L. anduzei* na região Amazônica, área onde *Lu. longipalpis* também ocorre.

Em relação aos efeitos da temperatura sobre ovos de flebotomíneos, Sherlock e Sherlock (1959) constataram que a redução da temperatura é um fator prejudicial ao desenvolvimento embrionário e que ovos de *Lu. longipalpis* mantidos por 24 horas ou mais sob temperaturas entre 0 a 5°C perdem a viabilidade. Nossos resultados estão em consonância com esses dados e sugerem que a inviabilidade dos ovos pela temperatura depende do estágio embrionário em que o ovo se encontra. Com 96 horas, idade em que os ovos foram submetidos à condição térmica de 8°C, o embrião já está em avançado desenvolvimento, tendo completado a fase de gastrulação (ABBASSY et al, 1995). Portanto, exposições a baixas temperaturas antes desse período, tendem a causar um efeito deletério maior na viabilidade dos ovos.

Foi observado que os instares L3 e L4 provenientes dos ovos submetidos ao estresse térmico por seis dias, apresentaram um desenvolvimento mais prolongado. Estes resultados sugerem que o estresse térmico prolongado sofrido pelos insetos ainda na fase de embrião induziram a um atraso no desenvolvimento dos ovos e também dos estágios posteriores. Este

processo é relatado em algumas espécies de flebotomíneos (KUMAR & KISHORE 1991; VOLF & VOLFOVA, 2011), entretanto este é primeiro relato para *Lu. longipalpis*.

Os resultados do tratamento térmico nas larvas L1 mostram que este estágio é pouco resistente às baixas temperaturas. Sob 8°C, as larvas diminuíram sua atividade, inclusive alimentar, e reduziram seus movimentos. Entretanto, sobreviveram sob essa temperatura por até quatro dias. Considerando que as larvas L1 foram submetidas ao tratamento térmico pouco tempo após a eclosão e que não se alimentaram durante o tratamento, a baixa resistência térmica deste estágio pode ser explicada pela falta de reservas energéticas e não somente à susceptibilidade à temperatura de 8°C.

Na natureza, a forma evolutiva dos flebotomíneos apontada como mais resistente a baixas temperaturas é a larva L4 (TEODOR, 1936; VOLF & VOLFOVA, 2011). Em nossos experimentos, este estágio se mostrou altamente resistente à temperatura de 8°C, provavelmente por ser um estágio com maiores reservas energéticas. Contudo, foi observado que sob a temperatura de 8°C as larvas L4 de *Lu. longipalpis* são incapazes de pupar e que a transição para o estágio de pupa só ocorre em condições térmicas favoráveis, o que pode prolongar o quarto estágio larval por longos períodos. A tolerância deste estágio larval à baixa temperatura pode ser considerada um fator importante para a ecologia de *Lu. longipalpis*, especialmente no que tange a sua colonização em regiões de clima temperado, como o Sul do Brasil.

Com relação aos insetos adultos, verificamos que o estresse térmico sofrido pelas fêmeas de *Lu. longipalpis* não afetou sua sobrevivência, mas sua fisiologia. Tanto as fêmeas ingurgitadas antes do tratamento, quanto as ingurgitadas pós tratamento, apresentaram tempos de longevidade superiores aos do grupo controle, mas taxa de oviposição, abaixo. Inclusive, as fêmeas que foram submetidas ao tratamento térmico por mais tempo, foram as que apresentaram maior longevidade. Isso pode ser explicado pela redução da atividade metabólica dos insetos durante o tratamento. Como todos os grupos foram alimentados com açúcar antes da incubação a 8°C, conseguiram resistir a baixa temperatura reduzindo seus movimentos e deste modo poupar energia.

Embora sejam poucos os trabalhos dedicados a este tema, a redução das atividades fisiológicas em flebotomíneos adultos provocada por baixas temperaturas é relatada em alguns estudos. Ao incubar fêmeas de *Phlebotomus papatasi* sob 20 e 28°C, Benkova e Volf (2007) verificaram que na menor temperatura testada os processos de digestão e oviposição foram mais lentos. Hlavacova e colaboradores (2013) constataram que a temperatura ambiente influencia no processo de defecação de *Lu. longipalpis*, sob 20°C a defecação de

fêmeas ingurgitadas foi atrasada em três dias. Este atraso proporcionou mais tempo para promastigotas das espécies *L. infantum* e *Leishmania peruviana* se estabelecessem no intestino dos insetos.

Foi observado que sob a temperatura de 8°C a digestão foi totalmente interrompida nas fêmeas ingurgitadas e retomada após a elevação da temperatura a 26°C. Nenhuma fêmea defecou ou ovipositou durante o tratamento térmico e todas permaneceram com abdômen distendido. Essas observações podem ter aplicações importantes na epidemiologia das leishmanioses em regiões mais frias do Brasil, pois demonstram que o vetor é capaz de sobreviver por longos períodos sem digerir o sangue ingerido.

Em relação às fêmeas não ingurgitadas que foram submetidas ao tratamento, constatamos que a incubação à 8°C não interferiu na aptidão dos insetos por sangue, uma vez que as fêmeas de todos os grupos realizaram repasto sanguíneo após o término do tratamento. Observamos diferenças significativas na quantidade de ovos postos pelas fêmeas dos diferentes grupos tratados. Nos grupos de fêmeas ingurgitadas antes do tratamento, a diferença foi maior, o que sugere que o atraso na digestão sanguínea pode afetar a quantidade de ovos produzidos, uma vez que a dieta sanguínea é a fonte de proteínas necessárias para a produção de ovos dos flebotomíneos. A quantidade, a qualidade e a origem do sangue ingerido estão diretamente relacionadas a produção dos ovos (READY, 1979).

A temperatura é considerada uma variável ambiental que interfere diretamente na dinâmica populacional dos insetos (WOLDA, 1988). Conhecer a resistência térmica de espécies de insetos pode ser fundamental para entender sua origem e capacidade de dispersão. Se tratando de insetos vetores, esse conhecimento se torna ainda mais relevante devido às suas aplicações epidemiológicas. Embora a dispersão natural dos flebotomíneos ainda seja considerada limitada, estudos avaliando os potenciais impactos das mudanças climáticas na ecologia desses insetos apontam para um avanço sobre regiões consideradas pouco favoráveis ao seu estabelecimento (ASPÖCK et al., 2007; FISCHER et al., 2010; DAOUDI et al., 2022).

Neste contexto, foi avaliada a resistência térmica de diferentes formas evolutivas do vetor *Lu. longipalpis* à média das temperaturas mínimas registradas na cidade de Curitiba, capital mais fria do Brasil e onde *Lu. longipalpis* não foi registrado. Apesar da constatação de que exposições prolongadas à temperatura de 8°C modulam o desenvolvimento e sobrevivência desse inseto, esses danos variam em relação ao tempo de exposição. Ainda,

deve-se levar em consideração que na natureza as oscilações na temperatura são frequentes e não se limitam às duas temperaturas testadas.

A implantação de políticas públicas e estratégias de enfrentamentos na propagação da LVA é um desafio, contudo, necessária e urgente. A vigilância em relação aos vetores, emergentes ou reemergentes, deveria estar associada a possibilidade em detectar eventuais fenômenos o mais precocemente possível, o que implica em conhecimento de fatores biológicos desses vetores em favor da investigação dos fatores de risco. Os resultados com a linhagem de *Lu. longipalpis* avaliada mostraram que é possível a sua colonização em regiões com as condições térmicas testadas. Desse modo, nossos resultados visam auxiliar os sistemas de monitoramento, com maior especificidade para as zonas com potencial risco de estabelecimento de *Lu. longipalpis* com o perfil climático avaliado.

## 8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a eclosão de larvas é afetada quando os ovos são submetidos a baixas temperaturas. Nestas condições térmicas, a eclosão pode ser retardada ou ocorrer posteriormente à elevação da temperatura. Quando expostos a baixa temperatura por longos períodos, os ovos podem tornar-se inviáveis. Sob a temperatura de 8°C, larvas de primeiro estágio cessam suas atividades fisiológicas, apresentando pouca resistência térmica. No entanto, larvas de quarto estágio sobrevivem mais tempo sob essas condições. As fêmeas de *Lu. longipalpis* apresentam alta resistência à temperatura de 8°C. Tanto as fêmeas ingurgitadas com sangue, como as alimentadas com açúcar sobrevivem a esta condição e retomam as atividades de digestão e oviposição após o estresse térmico. No entanto, a temperatura testada afetou a quantidade de ovos depositados pelas fêmeas. As fêmeas submetidas a 8°C por longos períodos depositam menos ovos quando comparadas às fêmeas que passaram menos tempo sob essa temperatura.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASSY, M. M.; HELMY, N.; OSMAN, M., COPE, S. E.; PRESLEY, S. M. Embryogenesis of the Sand Fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae): Cell Cleavage, Blastoderm Formation, and Gastrulation, *Annals of the Entomological Society of America*. v . 88, 1, p. 809–814, 1995.

AGUIAR, G. M.; SCHUBACK, P. A.; VILELA, M. L.; AZEVEDO, A. C. R. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro: II. Distribuição vertical (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 187-194, 1985.

ALENCAR, R. B.; DE QUEIROZ, R. G.; BARRETT, T. V. Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil. *Acta Tropica*, Basel, v. 118, n. 3, p. 204–208, 2011.

ALENCAR, R. B.; SCARPASSA, V. M. Morphology of the eggs surface of ten Brazilian species of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Acta Tropica*, Basel, v. 187, p. 182–189, 2018.

ALEXANDER, B.; USMA, M. C. Potencial source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.88, p.543-549, 1994.

ALEXANDER, B.; MUTEBI, J.; HEARNE, D.; LANZARO, G.; WARD, R.; HAMILTON, J. Current status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n. Suppl II, p. 31–33, 1998.

ALEXANDRE, J.; SADLOVA, J.; LESTINOVA, T., et al. Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific Reports*. 27;10(1):3566, 2020.

ALMEIDA, P. S. et al. Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 8, pp. 992-996, 2013.

ALTO, B. W. JULIANO, S. A. Temperature effects on the dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations in the laboratory. *J Med Entomol*. 2001.

ALVES, W. A.; SENA, J. M.; GOMES, M. L. S.; ELKHOURY, N. S. M. Leishmaniose: situação atual no Brasil. Brasília: Ministério da saúde, 2008.

ANTONIALI, SAC, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. J Infection. 54:509–14, 2007.

ARAKI, A. S.; VIGODER, F. M.; BAUZER, L. G. S. R.; FERREIRA; G. E. M.; SOUZA, N. A.; ARAÚJO, I. B.; HAMILTON, J. G. C.; BRAZIL, R. P. & PEIXOTO, A. A. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). PLoS Negl Trop Dis 3: e365, 2009.

ASPÖCK, H, WALOCHNIK, J., GERESDORFER, T., FORMAYER, H. Risiko-Profil für das autochthone Auftreten von Leishmaniosen in Österreich - Startclim, 2007.

AZEVEDO, A. C. R.; LUZ, S. L. B.; VILELA, M. L.; RANGEL, E. F. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho Municipality, Rondônia state, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 88, p. 509-512, 1993.

BENKOVA, I. & VOLFF, P. Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol; 44(1):150-4, 2007.

BORGES, D. A.; MOLINA, S. M. G.; PINTO, M. C.; GALATI E. A. B., et al. First Record of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on the Trinational Frontier (Brazil–Peru–Bolivia) of South-Western Amazonia, Journal of Medical Entomology, Volume 54, Issue 5, September, 2017, Pages 1425–142

BRAZIL, R. P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]. v. 46, n. 3, 2013.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomy: Biology of neotropical phlebotomine sand flies. In: RANGEL, E. F.; SHAW, J. J. (org.). Brazilian Sand Flies. 2. ed. Cham: Springer International Publishing, p. 299–318, 2018.

BYRON, N. C. The Biology of California *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) Under Laboratory Conditions, Journal of Medical Entomology, v. 4, Issue 2, p. 221–233, 1967.

CALADO, D. C., & Silva, M. A. N. da. Evaluation of the temperature influence on the development of *Aedes albopictus*. *Revista De Saúde Pública*, 36(2), p. 173-179, 2002.

CAMERON, M. M., ET AL. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará, Brazil. *Med Vet Entomol*, v.9, p. 263-272, 1995.

CARRANZA-TAMAYO, C. O. et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010, v. 43, n. 4, p. 396-399.

CURTI, M. C. M.; SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A. et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2009; 30:63-68.

CARVALHO, M. S. L.; BREDT, A.; MENEGHIN, E. R. S.; OLIVEIRA, C. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of transmission of american cutaneous leishmaniasis in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.19, n.3, p.2 27-237, 2010.

CASTRO, E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAIKI, M.; et al. Ecoepidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. *Acta Trop*. v. 93, p. 141-149, 2005.

COSTA, C. H. N; PEREIRA; H. F.; ARAÚJO; M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saúde Pública*. v 24, p. 361-372, 1990.

DANKS, H. V. *Insect Dormancy: An Ecological Perspective*. Ottawa: University of Chicago,. p. 439 ,1987

DAOUDI, M., OUTAMMASSINE, A., AMANE, M. *et al*. Climate Change Influences on the Potential Distribution of the Sand Fly *Phlebotomus sergenti*, Vector of *Leishmania tropica* in Morocco. *Acta Parasit*. v. 67, p. 858–866, 2022.

DEL CARRO, K. B.; LEITE, G. R.; DE OLIVEIRA FILHO, A. G.; DOS SANTOS, C. B., et al. Assessing geographic and climatic variables to predict the potential distribution of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in the state of Espírito Santo, Brazil. *PLoS One*. 18;15(9):e0238198, 2020.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico.*, Rio de Janeiro, v. 50, p. 221-222, 1936.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; et al. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 33, p. 89-229, 1938.

CHRISTOPHERS, R. *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito. 1st ed. London: Cambridge University, p. 752, 1960

CURITIBA. SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE. Plano municipal de controle ambiental e desenvolvimento sustentável: diagnóstico versão III. Curitiba. 2008.

DENLINGER, D.; YOCUM, G.; RINEHART, J. Hormonal Control of Diapause. In: Gilbert, I. G. *Insect Endocrinology.* San Diego: Academic press, p. 430–463, 2012.

DIAS, E. S. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 1 p. 49-52, 2007.

DIAS, E.S.; Michalsky ÉM, do Nascimento JC, Ferreira Ede C, Lopes JV, Fortes-Dias CL. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. *J Vector Ecol.* v. 38, p. 193-6, 2013.

DINIZ, D. F. A. et al. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasit. vectors.*, London, v. 10, n. 1, 2017.

DUTRA, S. J. G. et al. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* [online]. v. 23, n. 7, p. 1715-1720, 2007.

DYE, C.; DAVIES, C. R.; LAINSON, R. Comunicação entre flebotomíneos: um estudo de campo de populações domesticadas de *Lutzomyia longipalpis* na Amazônia brasileira. *Comportamento Animal*, v. 42, p. 183-19, 1991.

FISCHER, D.; THOMAS, S. M.; et al. Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. *Geospatial Health.* v. 5, p. 59–69, 2010.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) em foco de Leishmaniose Visceral no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v.31, p.378-390, 1997.

GALATI, E.A.B. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. p.133, 2021.

GARZÓN, M.J. *et al.* Temperature and photoperiod effects on dormancy status and life cycle parameters in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from subtropical Argentina. *Med. Vet. Entomol*, 2021.

GORDON, G.; HEADRICK, D. H. *A Dictionary of Entomology*. California: CABI, p. 1032, 2001.

GRISE, M. M.; BIONDI, D.; ARAKI, H. A floresta urbana da cidade de Curitiba-PR. *FLORESTA*, [S.l.], v. 46, n. 4, p. 425-438, ISSN 1982-4688, 2017.

GUALANDI, FC. *Medicina tropical no Brasil: Evandro Chagas e os estudos sobre a Leishmaniose visceral americana na década de 1930*. [dissertação]. Fiocruz: Rio de Janeiro. p. 141, 2013.

HLAVACOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. The Effect of Temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Development in Sand Flies. *Journal of Medical Entomology*. v. 50, Issue 5, p.955–958, 2013.

INSTITUTO DE PESQUISA E PLANEJAMENTO URBANO DE CURITIBA (IPPUC). *Curitiba em dados*. Curitiba, 2014.

KILLICK-KENDRICK, R., Leaney, A. J. Ready, P. D. The Establishment, Maintenance and Productivity of a Laboratory Colony of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae), *Journal of Medical Entomology*, v. 13, Issue 4-5, 31, p. 429–440, 1977.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* v. 17, p. 279-289, 1999.

KUMAR, V.; KISHORE, K. A preliminary observation on larval diapause of *Phebotomus argentipes* (Diptera, Psychodidae). *J Comm Dis.*, v. 23, p. 165-166, 1991.

LAINSON, R.; SHAW, J., RYAN L.; RIBEIRO, R. S. M.; SILVEIRA, F. T. Leishmaniasis in Brazil: XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Trans R Soc Trop Med Hyg. v. 79, p. 223-26, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters & Killick-Dendrick. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press. p. 1:20, 1987.

LAINSON, R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ryan L, Povia MM, Ishikawa EAY 1986. A Leishmania e as leishmanioses. In Instituto Evandro Chagas: 50 Anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical, Vol. I, Serviços de Saúde Pública, Belém, Pará, p. 83-124.

LAINSON, R. & RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. 8, pp. 811-827, 2005.

LANZARO, G.; OSTROVSKA, K.; HERRERO, M.; ADVOGADO, P., WARBURG, A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. Am J Trop Med Hyg. v. 48. p. 839-847, 1993.

LAWYER, P. & YOUNG, D. Diapause and quiescence in *Lutzomyia diabolica* (Diptera: Psychodidae). Parasitologia. v. 33, Suppl:353-60, 1991.

LAWYER, P. et al. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). Parasite, Paris, v. 24, p. 42, 2017.

LIMA, L. H. G. de M. et al. DNA barcode for the identification of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* plant feeding preferences in a tropical urban environment. Scientific Reports, London, v. 6, n. 1, p. 29742, 2016.

LOPES E.G.P. 2009. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. [Dissertação de Mestrado] 95 p.

LUTZ A & NEIVA A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 4: 84-95. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online]. , v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005

- MAGNARELLI, L. A.; MODI, G. B. Caloric determinations of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*. v. 25(2), p.127-130, 1988.
- MAHMUD, I. C. et al. Epidemiological aspects of the first human autochthonous visceral leishmaniosis cases in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 23, n. 2, p. 124-129, 2019.
- MAINGON, R. D.; WARD, R. D., HAMILTON, J. G.; BAUZER, L. G., PEIXOTO, A. A. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends Parasitol.* v. 24(1), p.12-7, 2008.
- MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N. & GRADONI, L. Flebotomíneos e disseminação de leishmanioses e outras doenças de interesse da saúde pública. *Med. Veterinario. Entomol.* v. 27, p. 123–147, 2013.
- MARTINS, R.; LEWINSOHN, T.; BARBEIROS, M. Ecologia e comportamento dos insetos. *Oecologia*, Berlin, v. 8, p. 149–192, 2000.
- MARZOCHI, M. C. A; Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, de Sousa PPM, Toledo LM, Filho FBR. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. *Cad Saúde Pública*. v.1, p. 432-446, 1985.
- MARZOCHI, M. C. A, MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 30, p. 162–4, 1997.
- MILLS, J. N.; GAGE, K. L.; KHAN, A. S. Potential Influence of Climate Change on Vector-Borne and Zoonotic Diseases: A Review and Proposed Research Plan. *Environ Health Perspect.* v. 118, p. 1507-1514, 2010.
- MOO-LLANES, D. A; IBARRA-CERDEÑA, C. N.; REBOLLAR-TELLEZ, E. A.; S. IBAÑES-BERNAL, C. et al. Current and future niche of North and Central American sand flies (Diptera: Psychodidae) in climate change scenarios. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7, p. e2421, 2013.
- OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G. R.; et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* ; 101:869-874, 2006.

OLIVEIRA, E. F.; SILVA, E. A.; CASARIL, A. E.; FERNADES, C. E.; PARANHOS FILHO, A. C., GAMARRA, R. M.; et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. J Med Entomol; 50:277-284, 2013.

OLIVEIRA, A. M.; LÓPEZ, R. V. M.; DIDO, M. R.; RODAS, L. A. C.; GUIRADO, M. M., CHIARAVALLOTTI-NETO F. dispersão de *Lutzomyia longipalpis* e expansão da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: identificação de fatores associados por análise de sobrevivência. Parasit Vectors 11(1):503, 2018.

OSMARI, V.; TATTO, M.; DE ANDRADE, A. J.; RATZLAFF, F. R.; DE PAULA VASCONSELLOS, J. S.; DE AVILA BOTTON, S.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A. First identification of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in central Rio Grande do Sul State, southern Brazil. Parasitol Res. Nov;121(11):3327-3330, 2022.

PAULA, M. B.; RODRIGUES, E. A.; SOUZA, A. A.; REIS, A. A.; PAULA, F. P.; PAJUABA, NETO, A. A.; LIMONGI, J. E. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Uberlândia, MG, concomitante com o relato de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana. Rev Soc Bras Med Trop 41: 304-305, 2008.

PECH-MAY A, RAMSEY JM, GONZÁLEZ ITTIG RE, GIULIANI M, BERROZPE P, QUINTANA MG & SALOMÓN OD. 2018. Genetic diversity, phylogeography and molecular clock of the *Lutzomyia longipalpis* Complex (Diptera: Psychodidae). PLoS Negl Trop Dis 12: e0006614.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. Brasil-Médico, v. 48, p. 949- 950, 1934.

PESSOA, F. A. C. et al. Immature stages of two species of *Evandromyia* (*Aldamyia*) and the systematic importance of larval mouthparts within Psychodidae (Diptera, Phlebotominae, Psychodinae). Zootaxa, [s. l.], v. 1740, n. 1, p. 1, 2008.

PETERSON, A. & SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: Ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. International journal for parasitology. 33. 919-31, 2003.

PETERSON, A. T.; CAMPBELL, L. P., MOO-LLANES, D. A.; TRAVI, B.; GONZÁLEZ, et al.. Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Psychodidae: Phlebotominae). *Int J Parasitol.* Sep;47(10-11):667-674, 2017.

Prestes-Carneiro LE, Daniel LAF, Almeida LC, D'Andrea LZ, Vieira AG, Anjolete IR, André L, Flores EF (2019) Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo state, Brazil. *Parasit Vectors* 12(1):251.

RABINOVITCH, J. Innovative land use and public transport policy – the case of Curitiba, Brazil. In: *Land Use Policy*, Elsevier v.13, p.51-67, 1996.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA AF E ANDRADE CA. 1986. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz e Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz e Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), sob condições experimentais. I. Aspectos alimentares de larvas e adultos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 431-438.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003

RANGEL, E. F., VILELA, M. L. 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 24: 2948-2952.

READY, P. Factors Affecting Egg Production of Laboratory-Bred *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae), *Journal of Medical Entomology*, Volume 16, Issue 5, 23 Pages 413–423, 1979.

READY, P., & CROSET, H. 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, 1980.

RÊGO, FELIPE D. and SOARES, RODRIGO PEDRO. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* . 2021, v. 93, n. 3.

RESENDE, M. C. et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006, v. 39, n. 1, pp. 51-55.

RODRIGUES, A. C. M. et al. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017, v. 37, n. 10, pp. 1119-1124.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; FRAIHA-NETO, H. Ecologia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Região Amazônica. In: Ministério da Saúde, Fundação Serviços de Saúde Pública. Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. v. 1, 1986.

SMITH, F. A. A Laboratory Investigation of the Percent of Hatch and Diapause in the Salt Marsh Mosquito *Aedes taeniorhynchus*, *Beta Beta Biological Society*, v. 58, n. 4, 1987.

SHIMABUKURO, P. H. F., DE ANDRADE, A. J. & GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *Zookeys* 660, 67–106 (2017).

SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2011, v. 106, n. 3, pp. 381-382, 2011.

SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015, v. 110, n. 7

SALOMÓN, O.D. *Lutzomyia longipalpis*, Gone with the Wind and Other Variables. *Neotrop Entomol* 50, 161–171 (2021)

SOARES, R. P. P. and TUYRICO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 3, 2003.

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C. BISSETO JUNIOR. 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*, v. 45, n, pp. 643-645, 2012.

SILVA, R. C. R. D.; CRUZ, L. N. P. D.; COUTNHO, J. M. D. S., FONSECA-ALVES, C. E.; REBELO, J. M. M.; PEREIRA, S. R. F. Experimental transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* to immunosuppressed mice through the bite of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidae) results in cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2021 Dec 6;63:e81.

SHERLOCK, I. A.; SHERLOCK, V. A. Criação e biologia, em laboratório, do "*Phlebotomus longipalpis*" Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 19: 229-250, 1959.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J. D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 8, pp. 1181-1182, 2009.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. Some sandfly food is a *Leishmania* poison. *Bull. Soc. Vector. Ecol.* v.19, p. 82-86, 1994.

THEODOR, O. On the Relation of *Phlebotomus papatasi* to the Temperature and Humidity of the Environment. *Bulletin of Entomological Research*, 27(4), 1936.

THOMAS, S.M., OBERMAYR, U., FISCHER, D. *et al.* Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasites Vectors* 5, 100 (2012).

TROUILLET, J.; VATTIER-BERNARD, G. Cycle annuel de *Sergentomyia hamoni* (Abonnenc, 1958) (Diptera, Phlebotomidae) en République populaire du Congo. *Ann Parasitol Hum Comp*, v. 54, p. 665–672, 1979.

URIBE, S. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 6, pp. 729-734, 1999.

VOLF, P. & MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*; 23(3):91-2, 2007.

VOLF, P. & VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* 36, S1–S9, 2011.

VIVERO, R. J. *et al.* Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of *Leishmania* transmission in Colombia. *Parasites and Vectors*, Oxford, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

WARD, R., & KILLICK-KENDRICK, R. Field and laboratory observations on *Psychodopygus lainsoni* Fraiha & Ward and other sandflies (Diptera, Phlebotomidae) from the Transamazônica highway, Pará State, Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 64(2), 213-221, 1974.

WARD, R. D. Some aspects of the biology of phlebotomine sand fly vectors. In: HARRIS KF (Ed.). *Adv Dis Vector Res*, New York: Springer-Verlag, p. 91-126, 1990.

WOLDA, H. Insect seasonality: why? *Ann Rev Ecol Sist* 19:1–18, 1988.

XIMENES, M. F. F. M.; SOUZA, M. F.; CASTELLON, E. G. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 427- 432, 1999.

XIMENES, M. F. F. M. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil: reflexos do ambiente antrópico. *Neotropical Entomology*, v. 36, n. 1, pp. 128-137, 2007.

YOUNG & DUNCAN M. Guia para a identificação e distribuição geográfica dos flebotomíneos *Lutzomyia* no México, Índias Ocidentais, América Central e do Sul (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* 54: 1-881, 1994.