

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**O RITMO CIRCADIANO DIFERE ENTRE MACHOS E
FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS *Nyssomyia whitmani*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE) INDEPENDENTEMENTE
DE VARIAÇÕES CLIMÁTICAS**

ANTONIO CARLOS FERRARI JÚNIOR

Dourados-MS
Abril/2017

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Antonio Carlos Ferrari Júnior

**O RITMO CIRCADIANO DIFERE ENTRE MACHOS E FÊMEAS
DE FLEBOTOMÍNEOS *Nyssomyia whitmani* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) INDEPENDENTEMENTE DE VARIAÇÕES
CLIMÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
da Grande Dourados (UFGD), como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM ENTOMOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Wedson Desidério Fernandes
Co-orientadora: Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati

Dourados-MS
Abril/2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD

Ferrari-Júnior, Antonio Carlos.

O ritmo circadiano difere entre machos e fêmeas de flebotomíneos *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) independentemente de variações climáticas / Antonio Carlos Ferrari Júnior – Dourados, MS: UFGD, 2017.

41f.

Orientador: Prof. Wedson Desidério Fernandes.

Co-Orientadora: Profa. Eunice Aparecida Bianchi Galati.

Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Leishmanioses. 2. ciclo circadiano. 3. comportamento. I. O ritmo circadiano difere entre machos e fêmeas de flebotomíneos *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) independentemente de variações climáticas.

**“O RITMO CIRCADIANO DIFERE ENTRE MACHOS E FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS
Nyssomyia whitmani (DIPTERA: PSYCHODIDAE) INDEPENDENTEMENTE DE
VARIAÇÕES CLIMÁTICAS”**

Por

ANTONIO CARLOS FERRARI JÚNIOR

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr. Wedson Desidério Fernandes
Orientador/Presidente - UFGD



Dr.ª Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval
Membro titular - UFMS



Dr.ª Vânia Lúcia Brandão Nunes
Membro titular - UFMS

Aprovada em: 10 de abril de 2017

BIOGRAFIA DO ACADÊMICO

ANTONIO CARLOS FERRARI JÚNIOR – filho de Antonio Carlos Ferrari e Suzana Fátima Mattos dos Santos Ferrari, nascido em 16 de fevereiro de 1992, na cidade de Presidente Venceslau, Estado de São Paulo. Coursou ensino médio na Escola Estadual Rodrigues Alves (2009), na cidade de Itaporã, Estado de Mato Grosso do Sul (MS). Formado em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, na cidade de Dourados, MS, onde desenvolveu vários trabalhos publicados em anais de congressos nacionais e internacionais. Realizou diversos cursos e estágios voltados para a área de Entomologia médica e veterinária, duas iniciações científicas, uma como bolsista CNPq – “Monitoramento e avaliação de insetos hematófagos em área rural e urbana” - e outra como voluntário – “Epidemiologia das infecções por *Leishmania* sp. em pacientes da Região da Grande Dourados”. Foi monitor das disciplinas de Bioquímica Aplicada e Zoologia dos Vertebrados I e também membro bolsista do Programa de Educação Tutorial – PETBio/MEC. No ano de 2015 iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade pela mesma universidade, na cidade de Dourados-MS.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser o meu refúgio, por guiar meus passos e me dar forças para superar todas as dificuldades enfrentadas até aqui.

Ao meu orientador Dr. Wedson Desidério Fernandes, exemplo de professor. Admiro sua sabedoria e humildade, agradeço pela amizade e dedicação na condução desse trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, por contribuir com todo seu conhecimento, sendo fundamental para realização do trabalho.

À Dra. Magda Freitas Fernandes, pela supervisão e condução durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais, Antonio Carlos Ferrari e Suzana Fátima Mattos dos Santos Ferrari, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu realizasse essa etapa.

Aos meus irmãos Adolfo Felipe dos Santos Ferrari e Ana Carla dos Santos Ferrari, que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Ao biólogo MSc. Kleiton Maciel dos Santos, pelo apoio nas coletas de campo e identificação dos insetos.

Ao senhor Ajurycaba Cortez de Lucena, que nos cedeu sua residência na Fazenda Coqueiro, sendo extremamente importante durante a execução das coletas e, ao seu caseiro Sr. Adão, por todo suporte durante os dias a campo.

Aos meus grandes amigos, Fernando Menani e Diogo Rodrigues, pela disponibilidade em ajudar nas coletas de campo sempre que preciso.

Aos colegas de laboratório, Maithon M. Rocha, Juliano R. Nascimento e Ana Leticia R. Tomita, pela amizade e ajuda nas coletas de campo e atividades de laboratório.

Aos estagiários da UEMS e UFGD, Neide Bezerra da Serra, Poliana Galvão dos Santos, Elane Galvão dos Santos, Alex Durão Martins, Ivana Rissato, Bruna Dominiqui, Érika Santos e Nathalia Lomba Thomaz, que de forma voluntária ajudaram nas coletas de campo, serei sempre grato.

Ao Dr. Josué Raizer, por todo apoio nas análises estatísticas e sugestões feitas durante os períodos de correção.

À divisão de Transportes da UFGD, na pessoa do senhor Carlos Paulino Ramos pelo apoio logístico na disponibilidade de veículos para os trabalhos de campo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, os docentes, colegas discentes e secretários, Marcelo Cardoso e Vitor Cunha Gomes Sfeir, que sempre atenderam de prontidão e fizeram o possível para ajudar.

À Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval e à Dra. Vânia Lúcia Brandão Nunes pela participação na banca e considerações feitas durante a defesa.

E, por fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento!

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Antonio Carlos Ferrari e Suzana Fátima Mattos dos Santos Ferrari. Aos meus avós, Dorival Felipe dos Santos e Maria Lilla Fernandes Mattos e Adolfo Ferrari *in memorian* e Josefina Ferrari *in memorian*.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Principais agentes e vetores das leishmanioses no Brasil	14
2.2. Leishmanioses em Mato Grosso do Sul	17
2.3. Biologia dos flebotomíneos	18
2.4. Ritmo circadiano	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Área de estudo e coleta dos espécimes de flebotomíneos	22
4.2. Dissecção e identificação dos flebotomíneos	23
4.3. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	28
REFÊRENCIAS	32
APÊNDICES	40

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo determinar o ritmo circadiano de *Nyssomyia whitmani* quanto a sua atividade antropofílica e relação com fatores abióticos em um fragmento de mata em Dourados, MS, Brasil. As coletas foram realizadas com capturas mensais de 25 horas ininterruptas em armadilha de Shannon preta modificada, com auxílio de aspiradores elétricos manuais e dois indivíduos aspirando ao mesmo tempo. Foram capturados 8.363 flebotomíneos pertencentes à espécie *Nyssomyia whitmani*, sendo 5.975 machos e 2.388 fêmeas. A frequência de dias em que o número de machos foi maior que o de fêmeas não difere do esperado ao acaso ($p > 0,05$). Os dados foram submetidos à análise de covariância com dados de temperatura e umidade relativa obtidos durante o período de captura e os resultados mostram que nenhum desses fatores influenciou a captura de adultos, tanto de machos quanto de fêmeas. A captura de flebotomíneos foi maior no período da escotofase, sendo que a maior densidade ocorreu entre 17 e 02 horas, com pico entre 23 horas e 01 hora. No período da fotofase, a densidade de flebotomíneos foi baixa, totalizando apenas 5% dos insetos e, a maioria capturada no período entre 10 horas e 11 horas. *Nyssomyia whitmani* compreende um complexo de espécies crípticas, sendo uma das principais na cadeia de transmissão de agentes da leishmaniose tegumentar americana e está amplamente distribuída no Brasil e em vários países do Cone Sul, o que demonstra a importância de investigar as populações dessa espécie para o conhecimento do seu comportamento nas diferentes regiões do país.

Palavras-chave: Leishmanioses; ciclo circadiano; comportamento.

ABSTRACT

This research had the main purpose of determining the *Nyssomyia*'s circadian rhythm when it comes to its antropophilic activities and its relation to abiotic factors on a forest fragment located near to Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. The collecting of the data was developed with monthly captures of 25 uninterrupted hours made with the black, modified, Shannon trap, having the manual assistance of electric vacuums, with two individuals aspirating at the same time. We captured a total of 8.3633 sandflies belonging to the *Nyssomyia whitmani* specie, with 5.975 of them being male and 2.388 being female. The frequency of days in which the number of males was superior to the number of females doesn't differ from what was expected then ($p > 0,05$). The sandflies were submitted to a covariance analysis with data about the temperature and air humidity obtained during the capture period. Our results point out that none of these factors influenced in the capturing of adults, for the male as much as for the females. The capturing of sandflies was larger during the period of scotophase, and the largest capture density occurred between 17 hours pm and 2 hours am, showing its peak between 23 hours pm and 01 hour am. During the photophase period the density of sandflies was low, totalizing only 5% of the insects, most of them having being captured between 10 hours am and 11 hours am. *Nyssomyia whitmani* is a complex of criptical species, being one of the main within the American cutaneous leishmaniosis transmission chain and it is widely distributed in Brazil as well as in many countries of the Southern Mato Grosso do Sul, which demonstrates the importance of investigating the populations of this species in order to obtain the knowledge on its behavior in different parts of the country.

Key-words: Leishmaniosis; circadian cycle; behavior.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* transmitidos pela picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). São reconhecidas duas formas principais da doença com diferentes apresentações clínicas: a leishmaniose visceral (LV), que em certas áreas da África e da Ásia também é denominada de calazar; leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC); leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose mucocutânea (LCM). A LTA é a forma mais comum da doença, todavia a LV é a mais grave, podendo ser fatal se não tratada. Dependendo da natureza dos reservatórios (humano ou outros animais) as leishmanioses podem ser classificadas como antroponoses ou zoonoses. São 102 os países ou territórios com registros de leishmaniose, com 90% dos casos de LV ocorrendo em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul e 70% dos casos de LTA em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria (WHO, 2017).

Nas Américas, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antroponose de grande impacto, particularmente na população rural de países pobres. Está amplamente distribuída no território brasileiro e apresenta transmissão essencialmente focal. A sua dinâmica se diferencia entre os locais de ocorrência em função das variáveis relacionadas aos parasitas, aos vetores, aos ecossistemas e aos processos sociais de ocupação do solo e contato com a natureza (BRASIL, 2013).

Caracteriza-se por causar lesões, únicas ou múltiplas, na pele e nas mucosas do nariz, boca, faringe e laringe e também a forma difusa. São 14 espécies de *Leishmania* que atuam na etiologia da doença (LAINSON e SHAW, 2005; DESBOIS et al., 2014; SHAW et al., 2015) e que circulam em animais silvestres (reservatórios) como roedores, marsupiais, edentados, dentre outros, afetando secundariamente o cão e o homem. Dentre as cerca de 500 espécies de flebotomíneos descritas para as Américas (BATES et al., 2015), aproximadamente 10% delas estão implicadas, suspeitas ou comprovadas, na veiculação de duas ou mais espécies de *Leishmania* (MAROLI et al., 2013). Esses dípteros são encontrados em ecótipos naturais, como troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, frestas em rochas e cavernas (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; GALATI et al, 2006), assim como, em ambientes rurais e urbanos, próximos a abrigos de animais domésticos e habitações humanas, o que sugere que se encontram

em processo de adaptação ao ambiente urbanizado (TOLEZANO et al., 2001; BARATA et al., 2004). Isso vem ocorrendo devido à diminuição das matas nativas, com alteração dos habitats e restrição dos ambientes utilizados por esses vetores. Essas alterações ambientais ocasionadas pelo homem também levam à dispersão de animais silvestres, reservatórios desses protozoários, que servem como fontes de alimentação aos flebotomíneos e, conseqüentemente, contribuem para a ocupação de diferentes ambientes, inclusive o antrópico (MARZOCHI, 1989; TOLEZANO et al., 2001).

Desse modo, aquelas espécies que de alguma forma resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (FORATTINI et al., 1976; OLIVEIRA et al., 2006). Uma vez atraídos a esses ambientes, podem se estabelecer e representam um risco constante como vetores de agentes da LTA, podendo manter o ciclo de transmissão entre animais domésticos e humanos (BRASIL, 2013).

As atividades diárias de locomoção, alimentação, cópula, oviposição, eclosão, entre outras, têm importância fundamental na caracterização da biologia das espécies de flebotomíneos e na dinâmica de transmissão das leishmanioses (SAUNDERS, 2002). A atratividade de flebotomíneos é influenciada pelo ritmo circadiano. Embora muitas espécies tenham atividade diurna, a maioria tem hábito noturno, com suas frequências variando ao longo do dia ou da noite.

O encontro de diversas espécies de flebotomíneos naturalmente infectadas por *Leishmania* traz à tona a necessidade de se investigar representantes da fauna desses insetos em áreas de transmissão das leishmanioses, assim como a atratividade humana para as espécies, segundo ritmo horário e sexo.

Neste sentido, são de particular interesse espécies que possam atuar na cadeia de transmissão dos agentes da LTA.

Analisar o ritmo circadiano de *Nyssomyia whitmani* quanto a sua atividade antropofílica e sua relação com alguns fatores abióticos é um dos principais objetivos dessa pesquisa. Sendo assim, foram testadas as hipóteses nulas: 1- O período do dia não interfere na abundância de machos e fêmeas; 2- Os fatores abióticos – temperatura e umidade relativa – não influenciam na abundância de machos e fêmeas de *Ny. whitmani*; 3- O período do dia – fotofase/escotofase – não influencia na captura de machos e fêmeas de *Ny. whitmani*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A LTA apresenta ampla distribuição geográfica no país e, entender melhor a epidemiologia da doença é fundamental para que medidas eficazes sejam adotadas na intenção de minimizar a incidência dos casos e, como resultado, o sofrimento da população que convive com essa zoonose (SILVA e MUNIZ, 2009).

No Brasil, considera-se a existência de três padrões epidemiológicos de transmissão da LTA: 1) **Silvestre**: a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária, tratando-se de uma zoonose associada a animais silvestres e atingindo os seres humanos quando adentram os ambientes de ocorrência da doença; 2) **Ocupacional e Lazer**: está diretamente ligado à exploração das florestas, quando ocorre desmatamento de áreas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, extração de madeira e agricultura, e atividades para treinamento militar e ecoturismo, que atualmente está sendo muito implementado; 3) **Rural e Periurbano em áreas de colonização**: este padrão tem sido o mais frequente na ocorrência da doença nos últimos tempos, estando relacionado ao processo migratório, como também, pela ocupação de encostas e formação de aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais (BRASIL, 2013). Ainda que tais áreas de transmissão de LTA apresentem formas de ocupação diferentes, ambas apresentam características epidemiológicas e paisagísticas semelhantes (KAWA, OLIVEIRA e BARCELLOS, 2010).

2.1. Principais vetores e agentes das leishmanioses no Brasil

Na atualidade, são conhecidas aproximadamente 20 espécies de flebotomíneos ligadas à transmissão das leishmanioses no Brasil (READY, 2013). *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é apontado como o principal vetor da *Leishmania infantum*, agente da leishmaniose visceral (LV) na América Latina, e é amplamente distribuído no Brasil (AGUIAR e MEDEIROS, 2003). *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) foi incriminada como vetor deste agente nos estados do Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1997) e Mato Grosso (MISSAWA et al., 2011). As espécies *Lutzomyia forattini* Galati, Rego, Nunes & Teruya, 1985 e *Lutzomyia almerioi* Galati & Nunes, 1999 podem estar associadas à transmissão da doença no Mato Grosso do Sul (SAVANI et al., 2009) e no estado do Pará, *Nyssomyia antunesi* Coutinho, 1939 é suspeita de ser vetor desta espécie de *Leishmania* (RANGEL e LAINSON, 2003). *Migonemyia*

migonei França, 1920 e *Nyssomyia neivai* Pinto, 1926 são prováveis envolvidos na veiculação de *Leishmania infantum* em algumas regiões do Brasil (DIAS et al., 2013).

Assim como na LV, a LTA também conta com várias espécies de flebotomíneos vetores no país. Dentre elas, *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) é destaque na cadeia de transmissão da doença por ser amplamente distribuída no Brasil e alguns países do Cone Sul (COSTA et al., 2007). *Ny. neivai* tem sido apontada como vetor da leishmaniose tegumentar nas regiões Sudeste e Sul do país, Argentina e Paraguai, e também tem sido encontrada na região Centro-Oeste do Brasil (ALMEIDA et al., 2013). Nas regiões Nordeste e Sudeste do país têm sido verificado que *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) vem assumindo esse papel (ANDRADE-FILHO, GALATI e FALCÃO, 2007). Em várias regiões do Brasil, inclusive no Mato Grosso do Sul, a espécie *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) está envolvida na veiculação de *Leishmania (L.) amazonensi* (BRILHANTE et al., 2015).

Sete espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, são responsáveis por causar LTA no Brasil:

A espécie *Leishmania Viannia braziliensis* é a mais prevalente no homem, causando lesões cutâneas e mucosas. É encontrada em todas as áreas endêmicas do país, podendo ser associada à presença de animais domésticos. É frequentemente encontrada em áreas de colonização antiga, onde o ambiente se encontra bastante modificado, com distintas espécies de vetores atuando em sua transmissão devido à sua larga distribuição geográfica (ANDRADE-FILHO, GALATI e FALCÃO, 2007). Diferentes espécies de flebotomíneos estão relacionadas à transmissão deste agente etiológico, que segundo a classificação de Galati (2003) compreendem: *Ny. whitmani*, *Ny. neivai*, *Pintomyia pessoai*; *Pintomyia fischeri*, *Mg. migonei*, *Psychodopygus wellcomei*, *Ny. intermedia*, entre outras (LAINSON e SHAW, 2005). Os principais reservatórios relacionados com a infecção são os roedores *Akodon* sp., *Proechimys* sp., *Rattus* sp., *Oryzomys* sp., *Rhipidomys* sp. e o marsupial *Didelphis* sp. Além de animais silvestres, alguns animais domésticos podem estar envolvidos na transmissão domiciliar, por exemplo: cão, equinos, roedores e gatos (LAINSON e SHAW, 2005).

Leishmania V. guyanensis é causadora de leishmaniose cutânea caracterizada por múltiplas lesões cutâneas e raramente lesões nas mucosas. Os seres humanos são os maiores acometidos, principalmente profissionais que exercem atividades florestais. Ocorre com frequência na região norte do Rio Amazonas, também nas Guianas, Peru, Equador, Venezuela e Colômbia (DAVIES et al., 2000). As fontes de infecção estão

associadas com desdentados, como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais (*Didelphis sp.*), e roedores, *Proechimys sp.* As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são: *Nyssomyia umbratilis*, *Ny. anduzei*, e *Ny. whitmani*, sendo a primeira o principal vetor.

Leishmania V. naiffi ocorre nos Estados do Pará e Amazonas, e na Guiana Francesa, tendo o tatu (*Dasypus novemcinctus*) como reservatório natural. O parasita causa LTA de evolução branda e seus principais vetores são *Psychodopygus squamiventris*, *Psychodopygus paraensis* e *Psychodopygus ayrozai*, que apresentam antropofilia e hábitos zoofílicos pouco conhecidos (LAINSON e SHAW, 2005).

Leishmania V. shawi é responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará, e tem como reservatórios vários animais silvestres como macacos (*Cebus apella*, *Chiropotes satanas*), preguiças (*Choloepus didactylus*) e procionídeos (*Nasua nasua*). O principal vetor é a espécie *Ny. whitmani* (LAINSON e SHAW, 2005).

Leishmania V. lainsoni ocorre na Amazônia causando a leishmaniose cutânea, foi descrita no Peru e Bolívia. Como hospedeiro suspeito de reservatório natural tem-se a paca (*Agouti paca*) e como único vetor conhecido, *Trichophoromyia ubiquitalis* (BASANO e CAMARGO, 2004; LAINSON e SHAW, 2005).

Leishmania V. lindenbergi está presente em Belém (PA) e, até o momento, foi isolada somente de casos humanos, sendo o provável vetor *Ny. antunesi* (LAINSON e SHAW, 2005).

Em relação à *Leishmania Leishmania amazonensis*, a infecção ocorre em diferentes regiões do Brasil, na região Norte: Amazônia, Pará e Rondônia; Nordeste: Maranhão e Bahia; Sudeste em Minas Gerais, no Centro-Oeste em Goiás e Mato Grosso do Sul (LAINSON e SHAW 2005; DORVAL et al., 2006) , e no Sul foi reportada no Paraná (SILVEIRA et al., 1999) e Santa Catarina (GRISARD et al., 2000). Também foi encontrada em roedores e cães no estado de São Paulo (TOLEZANO, 2000). É responsável pela leishmaniose cutânea e ocasionalmente pela forma cutâneo-difusa anérgica, em indivíduos com deficiência imunológica inata, sendo considerada uma forma sem tratamento que pode provocar mutilações e caracterizam-se por infiltrações, tubérculos e pápulas em áreas cutâneas extensas e com grande quantidade de parasitos na lesão. Geralmente a transmissão está associada à presença de roedores silvestres (*Proechimys sp*; *Oryzomys sp.*; *Nectomys sp.*; *Neacomys sp.* e *Dasyprocta sp.*); marsupiais conhecidos como cuíca, gambá e marmosa (*Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp.* e *Marmosa sp.*) e a raposa (*Cerdocyon thous*). Os principais vetores de

acordo com a classificação de Galati (2003) pertencem ao gênero *Bichromomyia*; *Bi. flaviscutellata*; *Bichromomyia olmeca nociva*; *Bichromomyia reducta* (BASANO e CAMARGO, 2004).

2.2. Leishmanioses em Mato Grosso do Sul

Acredita-se que o primeiro caso humano autóctone de leishmaniose visceral, com confirmação parasitológica no continente americano, tenha sido registrado na região de Porto Esperança, município de Corumbá, MS, em 1911 (MIGONE, 1913). Tempos depois, na década de 40, foram confirmados dois casos humanos dessa parasitose, em uma criança residente no município de Rio Brillhante e outro em um adulto que na época trabalhava na ferrovia Bolívia-Brasil, também em Corumbá (ARRUDA et al., 1949). Na década de 80, a infecção canina atingiu 8,7% dos 481 cães examinados no município de Corumbá. O parasito isolado foi identificado sendo *Leishmania (L.) infantum* (NUNES et al., 1988). A fauna flebotomínea urbana era de apenas oito espécies, e suspeitou-se que *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* pudessem atuar como vetoras em virtude do predomínio de ambas, sobretudo da primeira (GALATI et al., 1997). Posteriormente, *Lu. cruzi* foi incriminada como vetor do agente etiológico da leishmaniose visceral em Corumbá e Ladário (SANTOS et al., 1998).

Até meados de 1995, a LV era restrita apenas a essa área e lentamente passou a se expandir para novas regiões. Em 1999, foram notificados 61 casos, com nove óbitos, sendo que 54% dos casos eram em menores de 10 anos. Nesse período a doença abrangia 11 municípios num raio de praticamente 300 km de Corumbá (CORTADA et al., 2004). Em Campo Grande, no mesmo ano, observou-se pela primeira vez a presença de *Lu. longipalpis*, espécie que já havia sido comprovada como vetora de *L. L. infantum* (OLIVEIRA et al., 2003). Na região da Serra da Bodoquena, no município de Bonito, em um assentamento rural, foco de leishmaniose visceral canina, *Lu. longipalpis* e *Lu. almerioi* foram encontradas naturalmente infectadas por *L. infantum* (SAVANI et al., 2009).

A doença continuou seu processo de expansão e urbanização, atingindo até dezembro de 2014, 58 dos 78 municípios de Mato Grosso do Sul. De 2000 até dezembro de 2016, 3.092 casos de LV foram notificados com 266 óbitos no Estado (MATO GROSSO DO SUL, 2017).

No município de Dourados, MS, *Ny. whitmani* foi encontrada infectada por *L. L. infantum*, em peridomicílios (VERLINDO et al., 2011), e em fragmentos de mata

(FERNANDES et al., 2013, FERNANDES, 2014). Ainda merece atenção o fato de que *Ny. whitmani* ter sido encontrada infectada por *L. L. amazonensis* em área indígena no município (SANTOS, 2010).

Em se tratando da leishmaniose tegumentar, no período de 2000 a 2015 foram registrados 415.780 casos humanos no Brasil. Entretanto, pouco se sabe a respeito das várias características clínicas e epidemiológicas da doença em MS, onde de 2000 a 2015, foram notificados 2.542 casos, distribuídos praticamente em todos os municípios, demonstrando a importância de se estudar melhor essa parasitose no Estado (BRASIL, 2016). Infecções por *L. braziliensis* têm sido registradas em humanos (NUNES et al., 1995) assim como em morcegos (SHAPIRO et al., 2013), e por *L. amazonensis*, em humanos (DORVAL et al., 2006) e em felinos (SOUZA et al., 2009). A infecção natural por *Leishmania (Viannia) sp.* foi detectada em *Lu. longipalpis* e *Lu. almerioi* (SAVANI et al., 2009) e *L. (V.) braziliensis* em *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Lu. longipalpis*, *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), *Ny. whitmani*, *Psathyromyia aragaoi* (Costa Lima, 1932) e *Psychodopygus clautrei* (Abonnenc, Léger & Fauran, 1979) (PAIVA et al., 2010).

2.3. Biologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e estão distribuídos por todo o mundo. Atualmente, são conhecidas quase 1000 espécies (BATES et al., 2015) e cerca de 10% delas são vetores (suspeitas ou confirmadas) de agentes das leishmanioses, várias delas de duas ou mais espécies de *Leishmania* (MAROLI et al., 2013). Ainda que se tenha um número significativo de espécies descritas, até então, pouco se conhece a respeito da biologia destes dípteros. Isso pode ser explicado pelas dificuldades para se estudar o ciclo biológico de uma determinada espécie de flebotomíneo, sendo preciso estabelecer uma colônia em laboratório (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

Os flebotomíneos, assim como todos os dípteros, são holometábolos, apresentam metamorfose completa, com quatro estádios larvais e uma fase de pupa, que dará origem ao adulto. A duração do ciclo de ovo à fase de adulto varia entre as espécies, sendo influenciada por fatores abióticos, principalmente, temperatura e umidade e, também, pela disponibilidade de alimento (VOLF e VOLFOVA, 2011).

As fases imaturas destes dípteros podem ser encontradas se desenvolvendo em criadouros formados por solos úmidos e ricos em matéria orgânica, em geral ao abrigo

da luz direta. Os principais locais são troncos de árvores, raízes expostas, embaixo de folhas e pedras, em gretas de rochas, tocas de animais e em ambientes antrópicos, como chiqueiros, galinheiros e canis ou outros ecótopos que proporcionem condições apropriadas para o seu desenvolvimento. As formas imaturas dos flebotomíneos são altamente frágeis a mudanças bruscas que possam ocorrer no meio ambiente, sendo assim, os criadouros também funcionam como local de abrigo para os adultos (AGUIAR e MEDEIROS, 2003).

Tanto o macho quanto a fêmea necessitam ingerir açúcares como fonte energética. Somente as fêmeas praticam a hematofagia, tendo como hospedeiros vários mamíferos, inclusive o homem, aves e alguns animais de sangue frio (BAUM et al., 2015; BRITO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, Santos da Silva e Grünwald (1999), relataram o encontro de machos com sangue no tubo digestivo.

Os flebotomíneos praticam a atividade hematofágica principalmente no período noturno, mas podem realizá-la durante o dia em ambientes com pouca luminosidade, como áreas florestais e cavernas (INFRAN et al., 2014; GALATI et al., 2006).

Para os dípteros, a composição de proteínas e aminoácidos presentes no sangue é essencial para a maturação dos ovos e a quantidade de sangue ingerido está ligada diretamente ao número de ovos produzidos (BRAZIL e BRAZIL, 2003). Entretanto, pode-se verificar a autogenia, capacidade de deixar descendente independente da hematofagia. Esta pode ocorrer juntamente com a partenogênese (BRAZIL e OLIVEIRA, 1999).

2.4. Ritmo Circadiano

O ritmo (ou ciclo) circadiano é uma propriedade inerente aos organismos vivos e é responsável pelo controle de oscilações fisiológicas ao longo das 24 horas diárias. A duração de um ciclo é chamada de período e em cada um observam-se duas fases, que são denominadas de fotofase, que é a fase clara (dia), e a escotofase, que é fase da noite (SAUNDERS, 2002; TOMIOKA e MATSUMOTO, 2010).

Os flebotomíneos, assim como a maioria dos organismos, apresentam variações circadianas de comportamento e fisiologia que são de fato controladas por um relógio biológico interno, que podem influenciar na dinâmica de transmissão das leishmanioses. A genética molecular tem mostrado que esse ciclo circadiano é constituído por um conjunto de genes que interagem por meio de alças de autorregulação e que

compreendem um ciclo próximo de um período de 24 horas, independente das condições ambientais constantes (GENTILE, 2007).

Conhecer o ritmo circadiano de flebotomíneos e como fatores climáticos, tais como pluviosidade, temperatura e umidade relativa do ar, influenciam suas atividades, pode orientar medidas profiláticas para o controle da transmissão das leishmanioses. Tais medidas então deveriam ser empregadas no dia-a-dia pelas populações em áreas endêmicas das leishmanioses, especialmente por aquelas próximas a áreas florestadas onde a utilização de inseticidas é desaconselhada em função dos riscos ambientais inerentes (ALEXANDER e MAROLI, 2003; DIAS et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Conhecer o ritmo circadiano de *Nyssomyia whitmani* quanto a sua atividade antropofílica e sua relação com alguns fatores abióticos.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar as espécies de flebotomíneos presentes em fragmento de mata na área urbana de Dourados, MS;
- Determinar a abundância de flebotomíneos segundo o sexo;
- Determinar o período de maior atividade dos espécimes capturados;
- Analisar fatores abióticos e sua relação com a abundância de espécimes capturados;
- Verificar diferenças no ritmo circadiano entre machos e fêmeas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e coleta dos espécimes de flebotomíneos

As coletas dos espécimes de *Ny. whitmani* foram realizadas em um fragmento de mata remanescente do tipo floresta estacional semidecidual (22°11'57"S e 54°54'29"W), popularmente conhecida como Mata do Azulão, uma reserva particular de mata nativa com cerca de 54 ha, localizada na bacia do córrego Curral de Arame, no município de Dourados, sudoeste do estado de Mato Grosso do Sul (MS).

Para as coletas dos espécimes foi utilizada armadilha de Shannon modificada, na cor preta (GALATI et al., 2001), que proporciona a captura de espécies antropofílicas, com dois indivíduos aspirando ao mesmo tempo, com início às 18h até as 19h do dia seguinte (25 horas de coleta), sem obedecer ao horário de verão. As coletas foram realizadas uma vez ao mês, de outubro de 2015 a outubro de 2016 em um total de 13. Os flebotomíneos pousados na armadilha de Shannon foram coletados com auxílio de aspiradores elétricos manuais (Figura 1).



Figura 1. Captura de flebotomíneos em barraca de Shannon Preta com a utilização do aspirador elétrico manual.

Os aspiradores eram acoplados em uma garrafa plástica com fundo substituído por uma malha fina. A cada ciclo de uma (01) hora, a garrafa contendo os espécimes vivos era substituída. Os insetos foram mantidos na própria garrafa separadamente, sendo assim possível obter o ritmo da espécie em período noturno e diurno. Durante a substituição da garrafa a cada hora eram registrados os dados sobre temperatura e umidade relativa do ar por meio de um termo-higrômetro digital.

Os espécimes machos coletados foram clarificados e montados para a identificação específica segundo Protocolo de clarificação e coloração de flebotomíneos (Apêndice I). As fêmeas de flebotomíneos foram dissecadas para confirmação da espécie mediante aspecto morfológico das espermatecas. A nomenclatura adotada para identificação das espécies de flebotomíneos segue a padronizada por Galati (2003; 2014) e a abreviação dos gêneros, a de Marcondes (2007).

4.2. Dissecção e identificação dos flebotomíneos

A dissecção foi realizada em microscópio estereoscópico, com auxílio de estiletos, em lâminas esterilizadas, lavadas com detergente e mantidas em álcool a 70%. As fêmeas foram colocadas em uma gota de solução salina sobre lâminas. Para a dissecção fixou-se o tórax com um micro estilete e com outro, fez-se o movimento de tração entre o 7º e o 8º tergitos abdominais de modo a expor o tubo digestório, que vem preso ao 8º tergito e às demais partes da terminália (Figura 2).

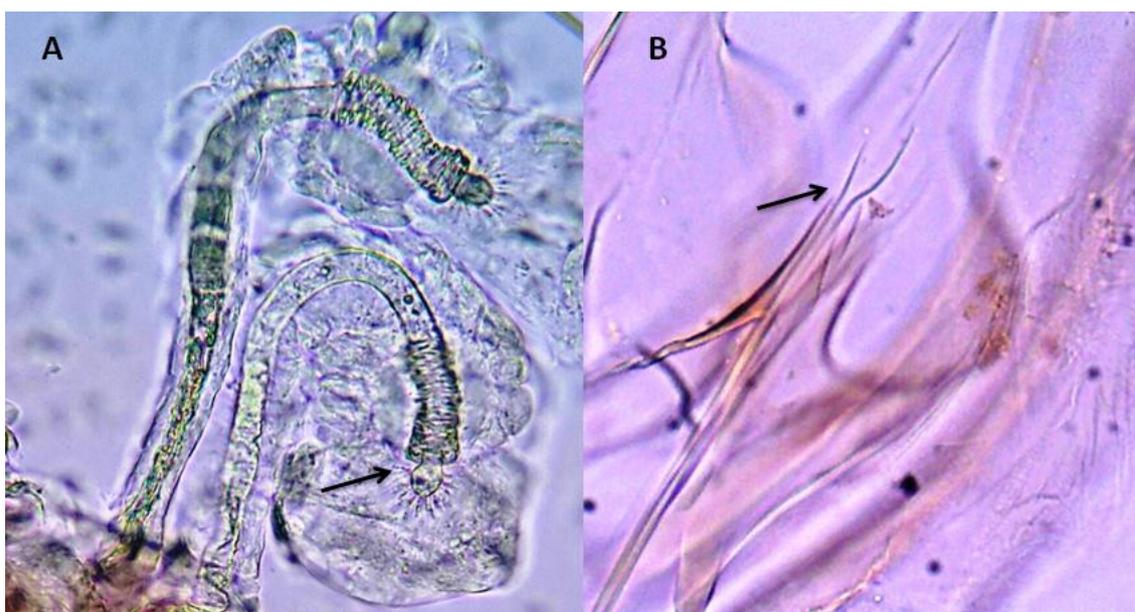


Figura 2. Caracteres taxonômicos de *Nyssomyia whitmani*. **A:** Fêmea (espermateca). **B:** Macho (duto ejaculatório).

Sob microscópio óptico e aumento de 400 vezes, fez-se a identificação das espécies através das espermatecas, antenas e cibário. O conteúdo do líquido coberto com a lamínula contendo o tubo digestório dos espécimes foi armazenado em microtubos contendo álcool isopropílico, em *pools* de, no máximo 10 fêmeas da mesma espécie, data e horário de captura.

4.3. Análise estatística

A razão sexual foi avaliada considerando-se a abundância total de machos e fêmeas em períodos de 25 horas de observação ao longo de 13 meses. Para verificar se essa razão diferiu significativamente de um macho para uma fêmea foi usado teste t.

Os dados de abundância dos flebotomíneos em cada hora do ciclo circadiano foram submetidos a uma reamostragem sorteando-se (sem reposição) dias de coleta, a fim de obter quatro amostras aleatórias independentes da variação ao longo do ano (n=3 dias por amostra). Para as análises considerou-se a abundância total de flebotomíneos e as médias de temperatura e umidade relativa do ar nessas amostras aleatórias.

Para testar a hipótese de efeitos do horário, temperatura e umidade relativa sobre a atividade de flebotomíneos, utilizou-se a análise de covariância (ancova) separadamente para abundância de machos e fêmeas (considerando as probabilidades com correção de Bonferroni, pela repetição de testes).

Todas as análises foram feitas com auxílio do software de livre acesso R (R CORE TEAM 2016). Gráficos circulares da abundância nos horários do dia foram construídos utilizando as funções dos pacotes “Circular” (AGOSTINELLI e LUND, 2013), “Plotrix” (LEMON, 2006). Por sua vez, gráficos de resíduos parciais da ancova foram feitos com auxílio do pacote “Car” (FOX e WEISBERG, 2011).

5. RESULTADOS

Durante as 325 horas de coleta, foram capturadas 8.452 espécimes de flebotomíneos, contabilizando 11 espécies. Dentre elas, a espécie *Ny. whitmani* somou 8.363 indivíduos (98,94%), sendo 5.975 machos e 2.388 fêmeas. As demais espécies foram registradas com menor abundância (89 indivíduos) durante todo o período do estudo (Tabela 1) (Apêndice II).

Tabela 1. Número e porcentagem de indivíduos (machos e fêmeas) de cada espécie.

Espécie	N° de ♂	N° de ♀	Total	
			N°	%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	-	1	1	0,01
<i>Brumptomyia cunhai</i>	1	1	2	0,02
<i>Brumptomyia galindoi</i>	3	-	3	0,03
<i>Migonemyia migonei</i>	3	-	3	0,03
<i>Pintomyia christenseni</i>	-	2	2	0,02
<i>Pintomyia pessoai</i>	13	7	20	0,23
<i>Pintomyia monticola</i>	-	1	1	0,01
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	29	20	49	0,57
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	-	1	1	0,01
<i>Nyssomyia neivai</i>	6	1	7	0,08
<i>Nyssomyia whitmani</i>	5975	2388	8363	98,94
Total	N°	6030	2422	8452
	%	71,34	28,66	100,00

A frequência nos dias de coleta das amostras em que o número de machos de *Ny. whitmani* foi maior que o de fêmeas não difere do esperado ao acaso (Figura 3), ou seja, a razão sexual não foi diferente de um ao longo dos meses de observação ($t= 0,95$, $gl= 12$, $p= 0,36$). A maior parte dos espécimes foi coletada nos meses de agosto de 2016 com 50,91% dos indivíduos da espécie, seguido de outubro de 2015, com 20,99% e março de 2016 representando 13,67% dos insetos.

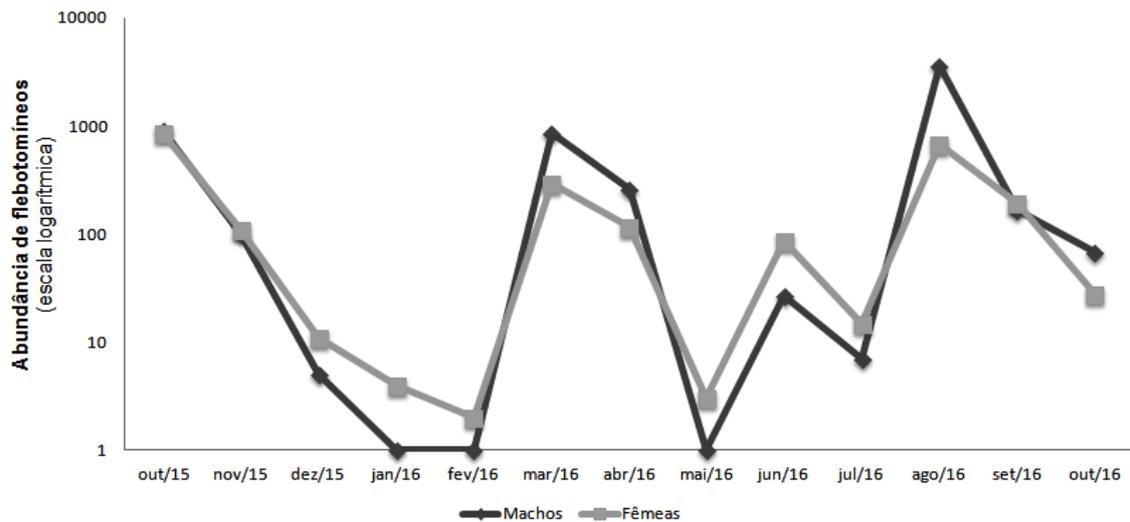


Figura 3. A abundância de *Ny. whitmani* machos e fêmeas durante 13 meses consecutivos.

Os flebotomíneos apresentam períodos de atividades diárias que não se sobrepõem totalmente, tendo sua captura maior no período da escotofase. A maior densidade de captura ocorreu entre 17 e duas horas, com pico entre as 23 e uma hora. No período da fotofase, a densidade de flebotomíneos foi baixa, totalizando apenas 5% dos insetos, com a maioria capturada no período entre 10 e 11 horas. Temperatura e umidade relativa do ar não influenciaram a abundância de machos e fêmeas independentemente do horário em modelos de covariância, que por sua vez teve efeitos significantes (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo estatístico de uma análise de covariância para os efeitos das variações em horário do dia, temperatura e umidade relativa do ar sobre a abundância de *Nyssomyia whitmani*. A análise foi feita separadamente para machos e fêmeas.

Fonte de variação	F	gl	p
Machos	3,085	96	0,031
horário	8,509	1	0,004
temperatura	0,745	1	0,390
umidade	< 0,001	1	0,991
Fêmeas	2,336	96	0,079
horário	6,197	1	0,015
temperatura	0,004	1	0,947
umidade	0,806	1	0,372

O ritmo circadiano diferiu entre machos e fêmeas sendo que machos iniciaram suas atividades aproximadamente às 11 horas, encerrando-as às três horas do dia seguinte, enquanto fêmeas tiveram atividade quase que exclusivamente noturna (Figura 4).

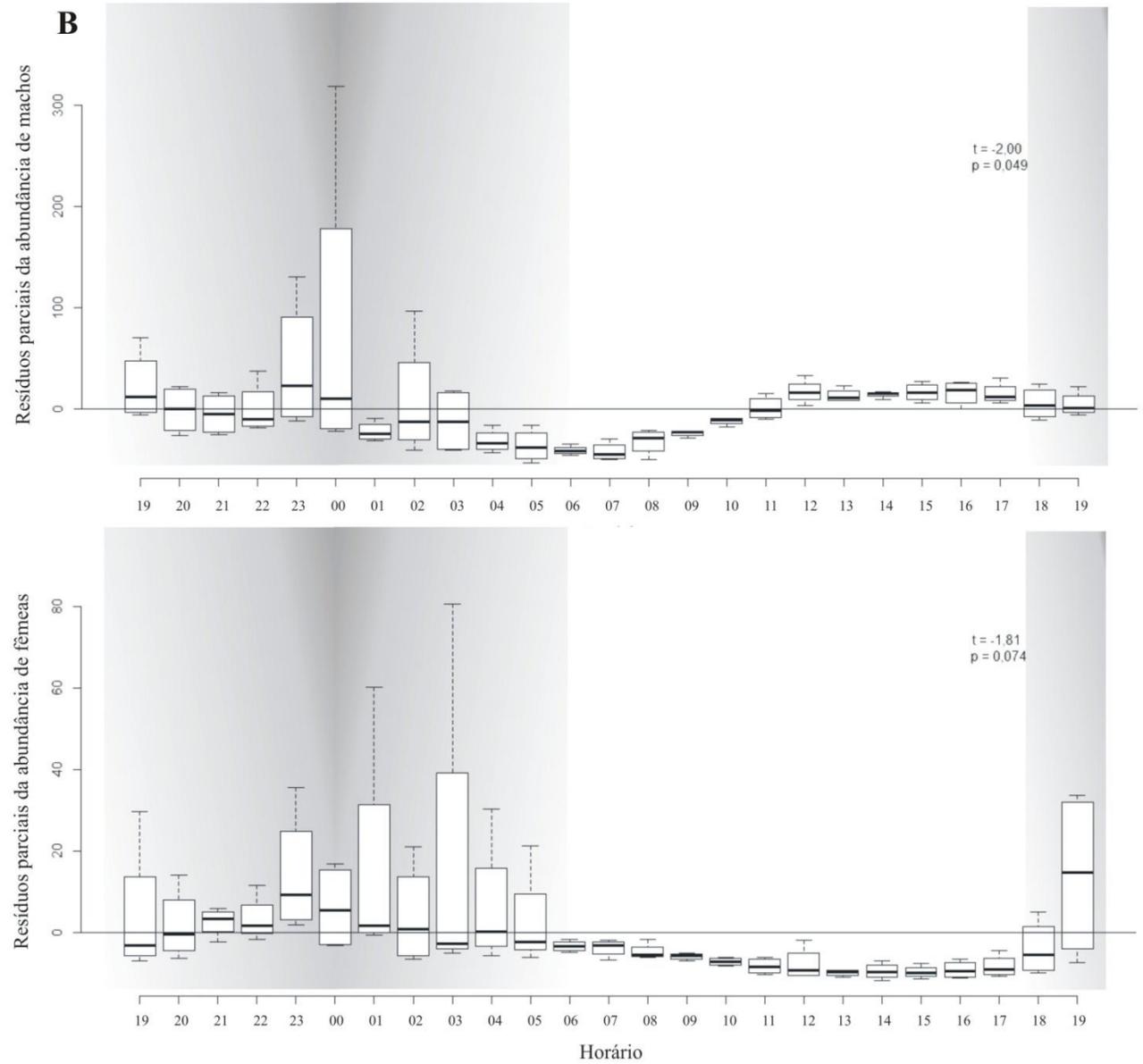
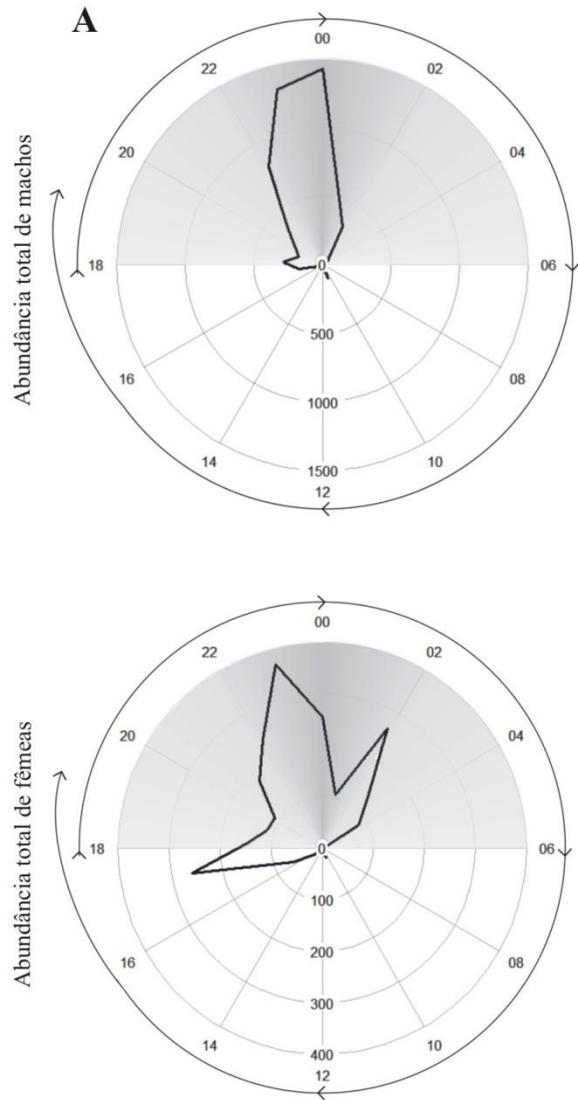


Figura 4. Abundância total (A) e mediana (B) de flebotômíneos *Nyssomyia whitmani* ao longo do dia. As medianas referem-se aos resíduos parciais em um modelo linear de covariância do horário ($n = 100$) independentemente dos efeitos de temperatura e umidade relativa do ar. A linha horizontal (resíduo parcial zero) indica o limiar de abundância entre os períodos de atividade (resíduos parciais positivos) e inatividade (resíduos parciais negativos).

6. DISCUSSÃO

Estudos sobre aspectos bioecológicos em condições de campo são muito importantes para compreensão sobre as populações de insetos, especialmente aquelas que têm uma direta relação com o homem, tal como a de *Nyssomyia whitmani* que tem aumentado sua abundância gradualmente, principalmente em fragmentos de mata próximos ao município de Dourados, MS.

A frequência de flebotomíneos foi menor no intervalo entre oito e 16 horas, inclusive nula em alguns períodos de captura. Provavelmente isto ocorra devido à alta incidência de luz. Neste período, possivelmente os flebotomíneos permaneçam em abrigos que servem como proteção contra variações climáticas bruscas e ataque de predadores. Esse tipo de pressão do ambiente pode influenciar no ciclo biológico desses insetos, principalmente na cópula e no repasto sanguíneo (RIVAS et al., 2014).

Em estudos realizados com uma população de *Ny. whitmani* no município de Maringá, PR, e observações apenas diurnas, no período entre seis e 12 horas (fotofase), o pico de atividade ocorreu entre nove e 11 horas (SANTOS et al., 2009). Resultado este muito parecido com o do presente estudo durante a fotofase, quando os flebotomíneos estiveram mais ativos entre 10 e 11 horas.

A população de *Ny. whitmani* estudada, apresentou hábito preferencialmente noturno, com pico de atividade entre as 23 e três horas, comportamento este muito próximo ao da população do Planalto Paulista, que revelou pico da uma às duas horas (GOMES et al., 1989). No norte do Paraná, em observações apenas noturnas, a população apresentou maior abundância das três às seis horas, com pico de atividade das quatro às cinco horas (TEODORO et al., 1993), comportamento este diferente do encontrado neste trabalho onde a abundância dos flebotomíneos foi reduzida nesses horários. Diferiu também da população de Corguinho, MS, que em 24 horas ininterruptas de observação o pico de ocorrência foi das 18 às 19 horas (GALATI et al., 1996). No presente estudo, percebeu-se que neste horário, as fêmeas de *Ny. whitmani* iniciavam suas atividades, diferente dos machos que iniciam suas atividades próximo das 12 horas. É provável que as fêmeas tenham períodos de atividades mais curtos em função da demanda energética. Além disso, os machos iniciam suas atividades diárias antes das fêmeas, porque essas são atraídas pelos machos que localizaram sua fonte de sangue anteriormente.

A atividade das fêmeas de *Ny. whitmani* está restrita à escotofase, crescente a partir dos primeiros horários da noite e com pico a partir do momento em que a abundância dos machos diminui, o que pode estar associado ao fenômeno que, nos flebotomíneos é conhecido como “efeito leque” (JONES, 1997). Neste fenômeno tem sido observado que inicialmente os machos são atraídos pela liberação de gás carbônico e pelo odor do hospedeiro vertebrado, em seguida liberam feromônios sexuais atraindo as fêmeas para o acasalamento e repasto sanguíneo (WARD et al., 1993; KELLY e DIE, 1997; OLIVEIRA et al., 2010). Essas suposições sugerem pesquisas adicionais que são importantes para entender a atividade dos flebotomíneos em seu habitat, uma vez que dominando essa ação do “efeito leque” seja possível no futuro manipular populações em áreas endêmicas com o uso de feromônios sintéticos. Todavia, as observações do “efeito leque” têm sido descritas para espécies que apresentam papilas em seus tergitos abdominais. Nelas existem um poro através do qual os feromônios são eliminados ao meio ambiente. No entanto, nas espécies do gênero *Nyssomyia* essas papilas são ausentes (GALATI, 2003). Portanto, este é um aspecto também a ser investigado em relação a feromônios de atração sexual para esta espécie de inseto.

A população de *Ny. whitmani* de Dourados, apresentou semelhanças e diferenças quando comparadas a outras populações da espécie encontradas no estado do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, o que corrobora a suspeita de RANGEL, LAINSON e SOUZA (1990) de que *Ny. whitmani* é um complexo de espécies crípticas. Reforçam este ponto de vista, o fato de que análises filogenéticas (baseada em caracteres morfológicos e morfométricos) mostraram que existiam duas linhagens de *Ny. whitmani* no Brasil, uma no Amazonas e outra no Nordeste (RANGEL et al., 1996). Posteriormente foi encontrada uma terceira linhagem denominada Norte-Sul (READY et al., 1998). Com a consolidação das análises moleculares (*Randon Amplification of Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction – RAPD-PCR*), confirmou-se a existência de populações biogeográficas distintas de *Ny. whitmani* (MARGONARI, FORTES-DIAS e DIAS, 2004). Tendo-se presente que *Nyssomyia whitmani* é uma das principais vetoras na cadeia de transmissão da LTA e está amplamente distribuída no Brasil e vários países do Cone Sul (LAINSON e SHAW, 2005; COSTA et al., 2007; SANTOS, 2010), os presentes dados reforçam uma vez mais a importância de investigar as populações da espécie para obter o conhecimento do seu comportamento nas diferentes regiões do país.

O número de estudos presentes na literatura sobre ritmo horário de flebotomíneos ainda é pequena e um dos motivos é a dificuldade na execução, uma vez que é necessário permanecer no local durante 24 horas ininterruptas. A maioria das pesquisas é realizada à noite e em períodos entre seis e 12 horas de captura. No presente estudo, a metodologia de aspiração em armadilha de Shannon, possibilitou atrair os flebotomíneos, e com predomínio de espécies antropofílicas, tendo em vista o calor emitido e cairomônios (dióxido de carbono, ácido lático e amônia) exalados pelos seres humanos, além da luz utilizada na armadilha, que de certa forma proporciona condições muito semelhantes ao que ocorre no peri e intradomicílio podendo portanto, refletir os períodos de atividade desses flebotomíneos. Sabendo-se que os machos antecedem a fêmea e que estas são atraídas por eles, tanto pela frequência emitida pelo som em virtude do batimento das asas ou talvez pela secreção de feromônios, pode-se pensar que este fenômeno ocorra na natureza.

Durante décadas a leishmaniose tegumentar apresentou um padrão epidemiológico predominantemente silvestre. Essa zoonose atingia e ainda atinge o homem quando adentra nos ambientes florestais, entretanto, com o desmatamento, expansão de fronteiras agrícolas e urbanização das florestas, um processo de adaptação de vetores e reservatórios a esses novos ambientes, com uma domiciliação dos vetores, alterando as condições de exposição do homem ao parasito. Esse conjunto de fatores induz a uma mudança no perfil tradicional da doença, haja vista o crescente número de casos e a ampla distribuição geográfica da doença confirmando esse processo de transformação do meio (GOMES, 1992; DUNAISK, 2006).

A área estudada vem apresentando um crescimento no número de moradias e conseqüentemente, aumento no número de pessoas vivendo naquele local, o que gera preocupação, pois durante o dia, quando a atividade dos flebotomíneos é reduzida, a população local está ocupada com suas atividades agropastoris e/ou domésticas, não ficando em situação potencial para a infecção. No entanto, a abundância noturna desses insetos, principalmente das fêmeas, que são as responsáveis pela transmissão do agente da doença, é alta, e é nesse momento, quando estão em suas casas, que muitas vezes são próximas de galinheiros e chiqueiros, que ficam expostos à picado do vetor e sujeitos à possível infecção por *Leishmania* spp.

Embora não se tenha comprovado a infecção natural de *Nyssomyia whitmani* por alguma espécie de *Leishmania* na população estudada, os resultados apresentados ampliam o conhecimento das áreas em que essa espécie possa estar atuando como

vetora da LTA. Sendo assim, os estudos sobre ritmo horário são imprescindíveis para a articulação das estratégias de monitoramento de vetores pelos órgãos competentes, para que sejam capazes de propor ações de educação em saúde, que ao menos recomendem o uso de repelentes ao adentrarem a mata, uso de mosquiteiros e telas de proteção nas janelas e portas das residências, bem como a limpeza dos peridomicílios e construção de galinheiros e pocilgas distantes das residências, uma vez que em áreas de mata o uso de inseticidas químicos deve ser limitado.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINELLI, C.; LUND, U. R package 'circular': Circular Statistics (version 0.4-7). 2013. URL <https://r-forge.r-project.org/projects/circular/>
- AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz. cap. 3, p. 207-255. 2003.
- ALEXANDER, J.E.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.
- ALMEIDA, P.S.; LEITE, J.A.; ARAÚJO, A.D.; BATISTA, P.M.; TOURO, R.B.S.; ARAÚJO, V.S.; SOUZA, E.J.; RODRIGUES, J.B.; OLIVEIRA, G.A.; SANTOS, J.V.; FACCENDA, O.; ANDRADE FILHO, J.D. Fauna of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in areas with endemic American cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 57, p. 105-112, 2013.
- ANDRADE-FILHO, J.D.; GALATI, E.A.B.; FALCÃO, A.L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1916) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 481-487, 2007.
- ARRUDA, W.; COSTA, F.C.; NAHAS, S.; ROSENFELD, G. Leishmaniose visceral americana: constatação de dois casos. **Brasil-Médico**, v. 63, n. 8/9, p. 64-65, 1949.
- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; FORTES-DIAS, C.L.; COSTA, R.T.; SILVA, J.C.; VIEIRA, E.P.; PRATA, A.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, na endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 481-487, 2004.
- BASANO, A.S.; CAMARGO, A.L.M. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BAUM, M.; CASTRO, E.A.; PINTO, M.C.; GOULART, T.M.; BAURA, W.; KLISIOWICZ, D.R.; COSTA-RIBEIRO, M.C.V. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 143, p. 8-12, 2015.
- BATES, P.A.; DEPAQUIT, J.; GALATI, E.A.B.; KAMHAWI, S.; MAROLI, M.; McDOWELL, M.A.; PICADO, A.; READY, P.D.; SALOMÓN, O.D.; SHAW, J.J.; TRAUB-CSEKO, Y.M.; WARBURG, A. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 131, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de

Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. atual., 3. reimpr. 180 p. : il. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos de LTA no Brasil, Grande Regiões e Unidades Federadas de 1990 a 2015. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2016.

BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 4, p. 257-274, 2003.

BRAZIL, R.P.; OLIVEIRA, S.M.P. Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 4, p. 463-464, 1999.

BRILHANTE, A.F.; DORVAL, M.E.C.; GALATI, E.A.B.; CRISTALDO G.; ROCHA, H.C.; NUNES, V.L.B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) in an area of fishing tourism in Central-Western Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 233-238, 2015.

BRITO, V.N.; ALMEIDA, A.B.P.F.; NAKAZATO, L.; DUARTE, R.; SOUZA, C.O.; SOUSA, V.R.F. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899-904, 2014.

CORTADA, V.M.C.L.; DORVAL, M.E.C.; SOUZA-LIMA, M.A.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.V.; ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.F.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; BRAZIL, R.P.; CALABRESE, K.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 365-74, 2004.

COSTA, S.M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J.C.; LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 149-153, 2007.

DAVIES, C.R.; REITHINGER, R.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; FELICIANGELI, D.; BORGES, R.; RODRIGUES, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Caderno de Saúde Pública**.; v. 16, n. 4, p. 925-50, 2000.

DESBOIS, N.; PRATLONG, F.; QUIST, D.; DEDET, J.P. *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies). **Parasite**, v. 21, p. 12, 2014.

DIAS, E.S.; FRANÇA-SILVA, J.C.; SILVA, J.C.; MONTEIRO, E.M.; GONÇALVES, C.M.; BARATA, R.A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.

DIAS, E.S.; MICHALSKY, É.M.; NASCIMENTO, J.C.; FERREIRA, E.C.; LOPES-VALADÃO, J.; FORTES-DIAS, C.L. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, p. 193-196, 2013.

DORVAL, M.E.C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILLO, E.; CAMARGO De CASTRO, A.C.; ALVES, T.P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, p. 43-46, 2006.

DUNAISK, M. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do Vale do Ribeira Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? [**dissertação de mestrado**]. Curitiba: Setor de ciências agrárias da Universidade Federal do Paraná, 2006.

FERNANDES, M.F. Competência vetorial de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) para *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [**Tese de Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade**, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul. 116f.]. 2014.

FERNANDES, M.F.; ISHIMI, C.M.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; SANTOS, K.M.; PERES, L.L.S.; OSHIRO, E.T.; RAIZER, J.; FERNANDES, W.D.; NEGRÃO, F. J.; SANTOS, M. F. C.; CASARIL, A. E.; ANDRADE FILHO, J. D. Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in fragments of urban forest and natural infection of *Nyssomyia whitmani* by *Leishmania infantum chagasi* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. In: **Worldleish 5 - Fifth World Congress on Leishmaniasis**, 13 a 17 de maio de 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. Abstract ID 1218. Vector biology and control: experimental and field work. 2013.

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

FOX, J.; WEISBERG, S. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. 2011.

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

GALATI, E.A.B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/egalati/ApostilaPhlebotominae_2014_vol_I.pdf>.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B; BOGGIANI, P.C.; DORVAL, M.E.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; OSHIRO, E.T.; DAMASCENO-JÚNIOR, G.A. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena,

state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 175-193, 2006.

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

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.C.; OSHIRO, E.T.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, p. 115-128, 1996.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; RÊGO-JÚNIOR, F.A.; OSHIRO, E.T.; CHANG, M.R. Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, p. 378-390, 1997.

GENTILE, C. Genética Molecular dos Ritmos Circadianos em Mosquitos Vetores (Diptera: Culicidae). **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 2007.

GOMES, A.C. Perfil Epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **An Bras Dermatol.**; v. 67, n. 2, p. 55-60, 1992.

GOMES, A. C.; BARATA, J.M.S.; ROCHA E SILVA, E. O.; GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais na região centro-oeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v, 31, p. 32-9, 1989.

GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.Y.; CARVALHO-PINTO, C.J.; EGER-MANGRICH, I.; TOMA, H.K.; LIMA, J.H.; ROMANHA, A.J.; CAMPBELL, D.A. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**. v. 74, n. 1, p. 89-93, 2000.

INFRAN, J.O.M.; SOUZA, D.A.; SOUZA, W.F.; CASARIL, A.E.; EGUCHI, G.U.; OSHIRO, E.T.; FERNANDES, C.E.; OLIVEIRA, A.G. Nycthemeral rhythm of phlebotominae in a maroon area at Piraputanga District, Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. In: **VIII International Symposium on Phlebotomine Sandflies**, Puerto Iguazu, Argentina, p. 85-P, 2014.

JONES, T. M. Evaluating models for the evolution of lekking: a field and laboratory study. In: **Sexual Selection in the Sandfly *Lutzomyia longipalpis***. Department of Medical Parasitology. University of London. 183p. 1997.

KAWA, H.S.P.C.; OLIVEIRA, R.M.; BARCELLOS, C. A produção do lugar de transmissão da leishmaniose tegumentar: o caso da Localidade Pau da Fome na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública.**; v. 26, n. 8, p. 1495-1507, 2010.

KELLY, D.W.; DYE, C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Animal Behaviour**, v. 53, n. 4, p. 721-31, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world leishmaniasis. In: COX, F.E.G.; KREIER, J.P.; WAKELIN, D. Microbiology and Microbial Infections, **Parasitology**, p. 313-49, 2005.

LEMON, J. Plotrix: a package in the red light district of R. *R-News*, v. 6, n. 4, p. 8-12, 2006.

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

MARGONARI, C.S.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Genetic Variability in Geographical Populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* Elucidated by RAPD-PCR. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 2, p. 187-192, 2004.

MAROLI, M.; FELICIANGLI, M.D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R.N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 27, p. 123-147, 2013.

MARZOCHI, M.C.A. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: **Grandes Endemias Brasileiras**. Editora Universidade de Brasília, DF. 1989.

MATO GROSSO DO SUL. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Saúde de Saúde do Estado. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Informe epidemiológico das leishmanioses nº 1/2017**. Campo Grande, 2017.

MIGONE, L.E. Un caso de Kalazar a Assuncion (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E; LIMA, G.B.M; MICHALSKY, É.M; DIAS, E.S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76-78, 2011.

NUNES, V.L.B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; NOGUCHI, R. C.; ARÃO, L. B.; HANS FILHO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; SERAFINI, L. N.; SANTOS, D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul: estudos na população humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 3, p. 185-193, 1995.

NUNES, V.L.B.; YAMAMOTO, Y.Y.; REGO-JÚNIOR, F.A.; DORVAL, M.E.C.; GALATI, E.A.B.; OSHIRO, E.T.; RODRIGUES, M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 17-21, 1988.

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999–2000. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 933–944, 2003.

OLIVEIRA, G.M.G.; FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; ANDRADE, G.C.; ARAÚJO, L.A.; OLIVEIRA, M.L.G.; CUNHA, R.V. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de Leishmaniose Visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 3, p. 83-94, 2010.

OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G.R.; ESPÍNDOLA, I.A.C.; DORVAL, M.E.M.C.; BRAZIL, R.P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 869-874, 2006.

OLIVEIRA, A.G.; MARASSÁ, A.M.; CONSALES, C.A.; DORVAL, M.E.C.; FERNANDES, C.E.; OLIVEIRA, G.R.; BRAZIL, R.P.; GALATI, E.A.B. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, n. 3, p. 238-241, 2008.

PAIVA, B.R.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; MALAFRONTI, R.S. Species-specific identification of Leishmanian naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil **Acta Tropica** v. 115, p. 126-130, 2010.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. URL <https://www.R-project.org/>.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses, p.291-309. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368p. 2003.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R.; SOUZA, A.A. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) a vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Is it a complex of cryptical species? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 122, 1990.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R.; SOUZA, A.A.; READY, P.; AZEVEDO, A.C.R. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 43-50, 1996.

READY, P.D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227-250, 2013.

READY, P.D.; SOUZA, A.A.; REBELO, J.M.; DAY, J.C.; SILVEIRA, F.T.; CAMPBELL-LENDUM, D.; DAVIES, C.R.; COSTA, J.M.L. Phylogenetic species and domestics of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* at the south-east boundary of Amazonian Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, p. 187-195, 1998.

RIVAS, G.B.S.; SOUZA, N.A.; PEIXOTO, A.A.; BRUNO, R.V. Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 278, 2014.

SANTOS, K.M. Biodiversidade de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) na Aldeia Indígena Jaguapiru, Dourados, Mato Grosso do Sul, 2008 - 2009: Implicações Epidemiológicas. **Dissertação de Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade** – Universidade Federal da Grande Dourados. UFGD, 85f, 2010.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; SANTOS, E.S.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; SILVA, A.M. Observações sobre a atividade diurna de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) na área urbana de Maringá, Paraná, Brasil. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 227-236, 2009.

SANTOS DA SILVA, O.; GRÜNEWALD, J. Natural haematophagy of male *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 4, p. 465-466, 1999.

SAUNDERS, D.S. Insect Clocks. 3rd edition Elsevier. **Science**. Amsterdam. 2002.

SAVANI, E.S.M.M.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; CASTILHO, T.M.; ZAMPIERI, R.A.; FLOETER-WINTER, L.M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 18–24, 2009.

SHAPIRO, J.T.; LIMA-JUNIOR, M.S.C.; DORVALC, M.E.C.; FRANC, A.deO.; MATOSE, M.F.C.; BORDIGNON, M.O. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta Tropica**, v.128, n.1, p.171-174, 2013.

SHAW, J.J.; PRATLONG, F.; FLOETER-WINTE, L.; ISHIKAWA, E.; EL BAIDOURI, F.; RAVEL, C.; DEDET, JP. *Leishmania* (*Leishmania*) *waltoni* n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the parasite responsible for diffuse cutaneous leishmaniasis in the Dominican Republic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3, p. 552–558, 2015.

SILVA, N.S.; MUNIZ, V.D. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. **Caderno de Saúde Pública**.; v. 25, n. 6, p. 1325-1336, 2009.

SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; ROBERTO, A.C.B.S. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, p. 413-23, 1999.

SOUZA A.I., NUNES V.L.B., BORRALHO V.M., ISHIKAWA E.A.Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do sul state, Brazil: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 15, n. 2, p. 359-365, 2009.

TEODORO, U.; SALVIA FILHO, V.; LIMA, E.M.; SPINOSA, R.P.; BARBOSA, O.C.; FERREIRA, M.E.M.C.; SILVEIRA, T.G.V. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná — Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 190-4, 1993.

TOLEZANO, J.E. Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Perpetuação da LTA no Estado de São Paulo, região endêmica de colonização antiga [Tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ELIAS, C.R; LAROSA, R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2001.

TOMIOKA, K.; MATSUMOTO A. A comparative view of insect circadian clock systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, p. 1397-406, 2010.

VERLINDO, A.C.; FERNANDES, M.F.; PERES, L.L.S.; MEIRA, R.O.; STEFANELI, M.; SANTOS, K.M.; ISHIMI, C.M.; SANTOS, M.F.C.; FERREIRA, A.M.T.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; OSHIRO, E.T.; ANDRADE FILHO, J.D.; RAIZER, J.; FERNANDES, W.D.; OLIVEIRA, A.G. Primeiro relato de infecção por *Leishmania infantum chagasi* em *Nyssomyia whitmani* e *Psathyromyia shannoni* (Diptera, Psychodidae) em Mato Grosso Sul, Brasil. **3º Congresso do Centro Oeste – Doenças Infecciosas Emergentes, Reemergentes e Negligenciadas**, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2011.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, supl. 1, p. S1-S9, 2011.

WARD, R.D.; HAMILTON, J.G.C.; DOUGHERTY, M.; FALCÃO, A.L.; FELICIANGELI, M.D.; PEREZ, J.E. Pheromone disseminating structures in tergides of male phlebotomines (Diptera; Psychodidae). **Bulletin of Entomological Research**. v. 83, p. 437-45. 1993.

WHO – World Health Organization. Leishmaniosis. (http://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_wer9122/en/). Acessado em 24/3/2017.

APÊNDICES

Apêndice I. Protocolo de Clarificação e Coloração dos Flebotomíneos (adaptado)

1. Deixar em Potassa a 10% (amolecimento da quitina), por 12 horas;
2. Realizar uma lavagem rápida em ácido acético a 10% para neutralizar a ação da potassa e retirar o excesso de gordura (15 minutos);
3. Deixar em fucsina ácida (diluição preparada) durante 10 minutos;
4. Passar os insetos por uma bateria de álcoois:
 - Álcool 70° durante 10 minutos
 - Álcool absoluto durante 10 minutos
5. Retirar o álcool e colocar os insetos em Eugenol;
6. Proceder à montagem dos insetos em meio Eneccê.

OBS.: não se deve comprimir a lamínula.

MATERIAIS UTILIZADOS:

ÁCIDO ACÉTICO 10%

Água destilada.....900 mL

Ácido acético.....100 mL

HIDRÓXIDO DE POTASSA

150 gramas de hidróxido de potassa para 850 mL de água

FUCSINA ÁCIDA

Fucsina ácida de Gruber em pó.....1,0 gr

Ácido acético P.A.....1,0 mL

Água destilada.....200,0 mL

MEIO ENECCÊ

Colofônia branca pura.....22 gr

Goma copal solúvel em álcool.....12 gr

Álcool absoluto.....20 mL

Cânfora.....10 gr

Essência de terebentina.....10 mL

Eucaliptol.....26 mL

Modo de preparo: em um recipiente que deve ser de preferência balão Erlenmeyer, coloca-se o álcool absoluto e a cânfora. A seguir adiciona-se a colofônia e a goma copal no balão arrolhado para só então ser levado ao fogo em banho-maria. Uma vez conseguida a liquidificação do conteúdo, adiciona a essência de terebintina; filtra-se em seguida com a mistura ainda quente e finalmente adiciona-se o eucaliptol.

SOLVENTE PARA O MEIO ENECÊ

Álcool absoluto.....30 mL

Cânfora.....17 gr

Essência de terebintina.....15 mL

Eucaliptol.....38 mL

Modo de preparo: em um recipiente colocar todas as substâncias e deixar descansar por um dia.

Apêndice II. Número absoluto de indivíduos de cada espécie capturados (machos e fêmeas) durante todos os meses de coleta.

Espécies	out/15		nov/15		dez/15		jan/16		fev/16		mar/16		abr/16		mai/16		jun/16		jul/16		ago/16		set/16		out/16		TOTAL
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Brumptomyia brumpti</i>									1																		1
<i>Brumptomyia cunhai</i>			1	1																							2
<i>Brumptomyia galindoi</i>											2														1		3
<i>Migonemyia migonei</i>													2											1			3
<i>Pintomyia christenseni</i>											1			1													2
<i>Pintomyia pessoai</i>	1										2	2			2							5	2	4	1	1	20
<i>Pintomyia monticola</i>															1												1
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>											2	4	7	9			1	1				18	6	1			49
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>									1																		1
<i>Nyssomyia neivai</i>	2																					4			1		7
<i>Nyssomyia whitmani</i>	908	848	101	108	5	11	1	4	1	2	849	295	263	117	1	3	27	85	7	15	3577	681	168	191	67	28	8363
	TOTAL GERAL																								8452		