Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Pública

**Investigação e documentação de flagelados no
tubo digestório de flebotomíneos**

Carole El Khoury Mansour

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação do Mestrado
Profissional em Entomologia em Saúde
Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo
como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice
Aparecida Bianchi Galati.**

**São Paulo
2018**

Investigação e documentação de flagelados no tubo digestório de flebotomíneos

Carole El Khoury Mansour

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação do Mestrado
Profissional em Entomologia em Saúde
Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo
como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

**Orientadora: Profa. Dra. Eunice
Aparecida Bianchi Galati.**

Versão corrigida

(A versão original encontra-se disponível na biblioteca da Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São Paulo FSP/ USP)

**São Paulo
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

El Khoury Mansour, Carole

Investigação e documentação de flagelados no tubo
digestório de flebotomíneos / Carole El Khoury Mansour;
orientadora Eunice Aparecida Bianchi Galati. -- São
Paulo, 2018.

87 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo, 2018.

1. Phlebotominae. 2. Leishmania. 3. Investigação. 4.
Dissecção. 5. Manual. I. Bianchi Galati, Eunice Aparecida ,
orient. II. Título.

“A verdadeira riqueza não está nas coisas, mas no coração”

Papa Francisco.

AGRADECIMENTOS

Durante estes dois anos, muitos foram os desafios vencidos, e sem a ajuda de muitos que menciono e agradeço abaixo, seria impossível a realização deste trabalho, que para mim é um sonho realizado.

A Deus, que me surpreende a cada momento da minha vida.

À fonte da minha existência, onde nasci e aprendi a crescer: aos meus pais.

À minha família: meu marido e minhas filhas que são meu tesouro eterno.

À minha orientadora, Prof^a. Eunice Aparecida Bianchi Galati, exemplo de mulher de sucesso e também de muitos valores. Sem o apoio, a paciência e a ajuda dela, seria difícil nascer esse manual.

À Prof^a. Maria Anice Mureb Sallum, por abrir a porta do laboratório dela, por sua colaboração, suporte, sugestões, incentivo e apoio constante desse trabalho.

Ao Dr. Fredy Galvis-Ovallos, pela valiosa colaboração nos experimentos de infecção, pelas sugestões, discussões e esclarecimentos, pelo incentivo e apoio e pelas contribuições na colônia de *Lutzomyia longipalpis*.

Aos nossos Professores em Entomologia em Saúde Pública, são exemplos de profissionalismo, dedicação e seriedade: Eunice Aparecida Bianchi Galati, Maria Anice Mureb Sallum, Delsio Natal, Denise Pimentel Bergamaschi, Adriano Pinter dos Santos, Tamara Nunes de Lima Camara, Angela Maria Belloni Cuenca, Regiane Maria Tironi de Menezes, Claudio Casanova, Walter Ceretti Junior, Marcia Bicudo de Paula, Paulo Roberto Urbinatti, Francisco Chiaravalloti Neto, Fredi Alexander Diaz Quijano, Mauro Toledo Marrelli, Aylene Emilia Moraes Bousquat, Nicolina Silvana Romano Lieber e todos os Professores convidados pelos ensinamentos.

Aos amigos entomólogos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho: ao doutorando Rafael de Oliveira Christe e as da primeira turma do Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública: Geane Aparecida de Almeida Andrade, Júlia Vono Alvarez Figueiredo, Kelly Reis de Menezes e Samanta Gouveia Parisi.

À Dra. Márcia Bicudo de Paula e Dra. Priscila Bassan Sábio pela colaboração na coleta de flebotomíneos, *Pintomyia fischeri* e pela ajuda durante meus estudos.

À Dra. Andréia Fernandes Brilhante pelo apoio e troca de informação.

Ao Dr. Rodrigo Espíndola Godoy pela valiosa ajuda no laboratório, na colaboração da coleta de campo e para realizar a documentação durante a pesquisa.

À doutoranda Vanessa Gusmon da Silva pelas sugestões, pela contribuição no trabalho de coleta de campo da *Pintomyia fischeri*, pela ajuda constante no laboratório, na documentação e nos experimentos de infecção experimental, pelas discussões, esclarecimentos e pela amizade.

À doutoranda Cecília de Oliveira Lavitschka pela contribuição no trabalho do laboratório, nos experimentos de infecção experimental, pelos esclarecimentos e pela amizade.

À mestranda Mariana Dantas da Silva pela contribuição no dia-dia do laboratório. Sem a ajuda dela seria impossível conseguir insetos para treinar a dissecação.

À Prof^a. Mara Cristina Pinto e ao doutorando Dennys Ghenry Samillan Ortiz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Parasitologia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Araraquara, por fornecer os espécimes de *Nyssomyia neivai* e pelo grande apoio.

A toda equipe do Laboratório de Identificação e Pesquisa em Fauna Sinantrópica da Divisão de Vigilância de Zoonoses da Prefeitura de São Paulo (LABFAUNA/ CCZ) em especial Dr^a. Kátia Valéria Aparecida Barão Dini, Neide De Oliveira Castelo, Júlia Vono, e também toda a equipe técnica especialmente Renildo Souza Teixeira, Jaílson Apóstolo dos Santos e Antônio Welder do Nascimento Lima.

À Dr^a. Cláudia Maria de Castro Gomes e à engenheira de materiais Thaise Yumie Tomokane do Departamento de Patologia da FMUSP, Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas/ LIM50, por contribuir ao andamento desse trabalho.

À biomédica bióloga do IMT: Mussya Cisotto Rocha pelo apoio, ajuda constante e pela amizade.

À Profa. Dr^a. Irene de Lourdes Noronha, por abrir as portas do laboratório e me proporcionar mais um aprendizado.

À Dr^a. Margoth Ramos Garnica, por todo auxílio nesse trabalho.

À Dr^a. Marlene Asevedo Passos de Alencar, pelo apoio e incentivo ao estudo.

À minha grande amiga fonoaudióloga, Maria Aparecida Bessa de Souza, obrigada pelo grande apoio nessa caminhada.

À minha amiga Marina Arruda da Silva pelo constante apoio.

Ao Dr. Marcos Boulos e a toda equipe do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) na Secretaria de Saúde, por cada ensinamento.

À doutoranda Tatiane Porangaba de Oliveira pela colaboração e ajuda nesse trabalho.

Ao arquiteto e urbanista, especialista em patrimônio arquitetônico Jardiel Sampaio de Oliveira, pela colaboração no projeto.

Aos nossos professores da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) pelo estágio e pela colaboração para a nossa formação.

Aos meus colegas e demais estagiários e estudantes do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP/ Phlebotominae) com os quais compartilhei momentos de muito aprendizado.

Aos meus colegas e amigos da FSP, com quem compartilhei os momentos de café no prédio do nosso laboratório, pelos momentos de troca informações e pela amizade.

MANSOUR, C. E. K. **Investigação e documentação de flagelados no tubo digestório em flebotomíneos**. 2018. Dissertação - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2018.

RESUMO

Introdução. Leishmanioses são zoonoses que têm como agentes etiológicos tripanossomatídeos de várias espécies do gênero *Leishmania*. Elas são transmitidas aos hospedeiros vertebrados por Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). As infecções por *Leishmania* podem se manifestar nas formas visceral (LV) e tegumentar (LT); ambas são sérios problemas de saúde pública no Brasil, que se encontra entre os países do mundo com as mais altas incidências. Dentre as atividades de controle das leishmanioses, as da vigilância entomológica estão voltadas para a redução da taxa de contato dos vetores com os hospedeiros vertebrados e identificar áreas de risco de transmissão. Neste sentido, a detecção de fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas por *Leishmania* constitui-se numa das estratégias. Essa detecção pode ser realizada apenas por meio de análises moleculares ou estas serem precedidas de dissecação das fêmeas para observação da presença de flagelados em seus tratos digestórios. A observação dessas formas no trato digestório pode indicar a capacidade do parasita em resistir aos processos de sua eliminação, dependendo do local onde se encontra, e a que subgênero (*Leishmania* ou *Viannia*) pertence. No Brasil, a LV tem sido associada a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*. A LT tem como agentes espécies de ambos os subgêneros. O presente projeto teve como objetivo desenvolver um manual no qual são descritos os processos para se realizar a investigação da infecção natural por flagelados em fêmeas de flebotomíneos. **Materiais e Métodos.** Para a elaboração do manual foram examinadas fêmeas selvagens e outras provenientes de colônias alimentadas em hamsters infectados experimentalmente por *Leishmania braziliensis* e, posteriormente, dissecadas e examinadas em microscópio. Os parasitas utilizados nos experimentos de infecção em laboratório são oriundos de cultivos mantidos em laboratório. As espécies examinadas foram *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia neivai* e *Pintomyia fischeri*. Foram descritos os cuidados necessários à preservação dos espécimes em campo e transporte ao laboratório, de modo a tornar viável a dissecação e exame dos espécimes. As capturas realizadas em campo para o estudo permitiram tanto a obtenção dos espécimes como a elaboração do item que trata dos cuidados com as amostras. A documentação das múltiplas etapas de dissecação e exame dos espécimes necessários para o estudo foram realizados por meio de câmera fotográfica acoplada a microscópio óptico. **Resultados.** São apresentados na forma de manual. Neste são descritos e ilustrados aspectos das técnicas de captura, cuidados com os insetos no campo e laboratório, transporte de amostras vivas, o processo de dissecação da fêmea e a observação de seu tubo digestório para a investigação da presença de flagelados, e de estruturas de sua genitália, para a identificação da espécie de flebotomíneo. Apresenta-se ainda um protocolo a ser utilizado na preservação dos espécimes que forem encontrados infectados para posterior análise molecular e identificação específica do parasita. **Conclusões.** Com os tópicos apresentados no manual, espera-se contribuir com o programa vigilância epidemiológica das leishmanioses, em atividades da vigilância entomológica voltadas para a identificação de áreas de risco de transmissão dessas doenças e obter evidências que apontem para o potencial de espécies que possam estar atuando como vetores permissíveis de *Leishmania* spp.

Palavras chaves: Phlebotominae, leishmaniose, investigação, leishmania, dissecação, manual.

MANSOUR, C.E.K., **Investigation and documentation of flagellates in the gut of sand fly phlebotomines**. 2018. Dissertation – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018.

ABSTRACT

Introduction. Leishmaniasis are zoonoses having trypanosomatids of several species of the genus *Leishmania* as etiological agents, transmitted to vertebrate hosts by the bite of females of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). These parasitoses can manifest in visceral (VL) and tegumentary (TL) forms, both being serious public health problems in Brazil, which is among the countries of the world with the highest incidence rates. Among the activities of control of leishmaniasis, those of entomological surveillance are aimed at reducing the contact rate of the vectors with the vertebrate hosts and also to identify areas in risk of the disease transmission. In this sense, the detection of sand fly females naturally infected with *Leishmania* is one of the strategies. This detection can be carried out exclusively by means of molecular analyzes or these being preceded by dissection of the females to observe the presence of flagellates in their guts. The observation of flagellate forms in the gut indicates the ability of the parasites to resist the processes of their elimination, and also to identify the subgenus (*Leishmania* or *Viannia*) to which the parasites belong. In Brazil, the VL infection is attributed to *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, while in TL, there are various agents belonging to both subgenera. **Objective.** To develop a manual in which the processes for the investigation of the natural infection by flagellates in sand fly females are described and illustrated. **Material and Method.** For the construction of the manual, observation of infection by flagellates was made through the dissection of wild or laboratory females of *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia neivai* and *Pintomyia fischeri*, experimentally infected with *Leishmania braziliensis*. The description of care in the preservation of the specimens in the field and in their transport to the laboratory, in order to make feasible the dissection, was made based on the collection undertaken in this project. The documentation was made by means of a photographic camera coupled to an optical microscope. **Result.** A manual is presented describing and illustrating aspects of collection techniques, insect care in the field and laboratory, transport of the live samples, the dissection process and observation, respectively, of the female gut for the investigation of the flagellate presence and genitalia structure for the identification of the phlebotomine species. Protocol is also presented to be used in the preservation of the specimens found infected for subsequent molecular analysis and the specific identification of the parasite. **Conclusions.** With the topics presented in this manual, we intend to contribute to the program of epidemiological surveillance of leishmaniasis, in activities of entomological surveillance, in the identification of areas of risk of transmission of these diseases, as well as to obtain evidence about the potential of species that may act as permissible vectors of *Leishmania* spp.

Keywords: Phlebotominae, leishmaniasis, leishmania, investigation, dissection, manual.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL	15
1.2. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	17
1.3. VETOR.....	21
1.4. AGENTE ETIOLÓGICO	24
1.5. DESENVOLVIMENTO DO PARASITA NO VETOR	24
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL.....	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. OBTENÇÃO DAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS INFECTADAS POR <i>Leishmania</i>	31
4.2. ELABORAÇÃO DO MANUAL	32
4.3. DISSECÇÃO E OBSERVAÇÃO DAS FÊMEAS.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. MANUAL SOBRE PROCESSO DE DISSECÇÃO DE FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS PARA INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR FLAGELADOS	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹.....	78
CURRÍCULO LATTES	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia do tubo de acrílico do aspirador de Castro com duas fêmeas dentro.	39
Figura 2	(A e B) Fotografias de armadilhas Shannon branca. (A) Pesquisadora com lanterna de cabeça e o aspirador de Castro na armadilha de Shannon branca. (B) Gaiola ao lado da armadilha de Shannon para manter os flebotomíneos. (C) Fotografia das duas armadilhas, preta e branca, uma do lado da outra. (D) Fotografia da armadilha Shannon preta.	41
Figura 3	Fotografias da CDC acoplada com gaiola, para preservar os flebotomíneos vivos. (A) Gaiola antes de ser coberta com o plástico. (B) Gaiola coberta pelo plástico.	42
Figura 4	Fotografia da armadilha CDC para coleta de flebotomíneos usando hamster protegido como isca. Protótipo desenvolvido no projeto Fapesp 2009/53414-1.	42
Figura 5	Fotografia da armadilha Disney para coleta de flebotomíneos usando hamster como isca, com bandejas untadas com óleo de rícino. Protótipo desenvolvido no projeto Fapesp 2009/53414-1.	43
Figura 6	(A) Fotografia do aspirador de Castro para a captura dos flebotomíneos. (B, C e D) Fotografias do mesmo frasco com fundo de gesso e abertura lateral para introduzir os insetos com a ajuda do aspirador Castro.	43
Figura 7	Fotografias da gaiola para acomodação e preservação dos flebotomíneos. (A) Gaiola fechada com fêmeas e por cima dela, chumaço de algodão umedecido com solução açucarada. (B) Fotografia das fêmeas pousadas em suas paredes. (C) Gaiolas cobertas com toalha umedecida e por cima vai o plástico.	44
Figura 8	(A) frascos de acrílico usados na individualização das fêmeas de flebotomíneos. (B) em destaque o frasco de acrílico com fundo revestido de gesso, tampa com orifício central e retalho da meia fina (C) bancada organizada para dissecar. (D) materiais usados durante a dissecação. (E) destaque para os estiletes e a pinça entomológicos.	47

Figura 9	Modelo da planilha para acompanhar a dissecação e observação microscópica dos flagelados.	48
Figura 10	Fotografia de frasco de acrílico para individualizar e manter vivas as fêmeas, a serem anestesiadas e dissecadas.	49
Figura 11	Fotografia de caixa de isopor contendo os frascos com fêmeas de flebotomíneos a serem anestesiadas. Observe as placas de gelo: uma abaixo do frasco e outra na lateral.	49
Figura 12	Ilustração do frasco com a fêmea para ser anestesiada utilizando éter.	50
Figura 13	Fotografia das seringas e agulhas usadas na dissecação ou também para injetar o álcool 100% nas lâminas e lamínulas, para acomodar as leishmanias nos microtubos, para futuras análises moleculares.	50
Figura 14	Fotografia do soro fisiológico 0,9% aliquotado em pequenas porções para evitar a contaminação do produto e das amostras que serão examinadas.	51
Figura 15	Fotografia da pesquisadora paramentada com equipamentos de biossegurança durante a dissecação. Observa-se seringas a serem descartadas corretamente após uso.	51
Figura 16	Microfotografia da morfologia da fêmea de flebotomíneo, em vista lateral.	54
Figura 17	Microfotografia da morfologia do macho de flebotomíneo, em vista lateral.	54
Figura 18	Microfotografia do início da dissecação, para retirada das asas. Observar a localização dos dois estiletes: um segurando na base das asas e o outro cortando-as.	55
Figura 19	Microfotografia da dissecação das pernas. Um estilete segura as coxas e o outro para a retirada das pernas.	55
Figura 20	Fotografia das asas, pernas e cabeça removidas.	56
Figura 21	Microfotografia dos ovos de flebotomíneos removidos.	56
Figura 22	Microfotografia da retirada do tubo digestório.	57
Figura 23	Ilustração do esquema do aparelho digestório da fêmea do flebotomíneo. Adaptado de Lainson e Shaw, 1987.	57

Figura 24	Microfotografia da espermateca da <i>Pintomyia fischeri</i> .	61
Figura 25	Microfotografia da espermateca de <i>Pintomyia fischeri</i> , com esquema adaptado de Galati (2003). As glândulas da espermateca destruídas no processo de clarificação (GALATI, 2003), aparecem nessa ilustração (seta vermelha).	61
Figura 26	Microfotografia da espermateca da <i>Nyssomyia neivai</i> , com esquema adaptado de Galati, 2003. Os corpos das espermateca são bem visíveis (setas vermelhas).	62
Figura 27	Microfotografia da porção posterior do abdômen de fêmea de <i>Nyssomyia whitmani</i> , mostrando o final do intestino posterior, espermatecas, folículos ovarianos, glândulas acessórias, furca genital, cercos e oitavo tergito.	63
Figura 28	Microfotografia da espermateca da <i>Pintomyia monticola</i> . A furca genital com uma reentrância da câmara genital em direção à furca (seta pontilhada); Duto comum atinge o nível do ápice da furca (seta contínua).	64
Figura 29	Microfotografia da espermateca da <i>Pintomyia monticola</i> com esquema adaptado de Galati, 2003.	65
Figura 30	(A e B) Microfotografias do intestino de fêmeas de flebotomíneos.	66
Figura 31	Microfotografia do intestino médio torácico de fêmea de flebotomíneo.	67
Figura 32	Microfotografia do intestino médio abdominal de fêmea de flebotomíneo.	67
Figura 33	Microfotografia do intestino posterior de fêmea de flebotomíneos.	68
Figura 34	Microfotografia de flagelados no trato digestório abdominal de fêmea ingurgitada, com destaque aumentado nos retângulos em negrito.	68
Figura 35	(A, B e C) Microfotografias das formas flageladas no trato digestório com sangue parcialmente digerido.	69
Figura 36	Microfotografia das formas promastigotas agrupadas em forma de rosetas (setas).	70
Figura 37	(A, B e C) Microfotografias das formas promastigotas (setas).	70

Figura 38	(A, B e C) Microfotografias das formas promastigotas agrupadas na válvula estomodeal do intestino médio torácico (setas).	71
Figura 39	Microfotografias do trato digestório de fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> . (A) Presença de bactérias. (B) Presença de gregarinas.	72
Figura 40	(A e B) Microfotografias de nematoide.	73
Figura 41	Fotografia mostrando uma armadilha CDC ligada, 24 horas, para a captura de insetos que podem escapar durante os procedimentos.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°	Graus.
°C	Graus Celcius.
%	Porcentagem.
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa Animal.
Fig.	Figura.
Figs	Figuras.
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
IMT	Instituto de Medicina Tropical.
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i> - gênero.
<i>(L.)</i>	<i>Leishmania</i> - subgênero.
LC	Leishmaniose cutânea.
LCL	Leishmaniose cutânea localizada.
LCD	Leishmaniose cutânea difusa.
LD	Leishmaniose disseminada ou cutânea disseminada.
LESP	Laboratório de Entomologia de Saúde Pública.
LIM	Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas.
LM	Leishmaniose mucosa.
LT	Leishmaniose Tegumentar.
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana.
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i> - gênero.
LV	Leishmaniose Visceral.
ml	Mililitro.
mm	Milímetro
<i>Ny.</i>	<i>Nyssomyia</i> .
PCR	Polymerase Chain Reaction.
<i>Pi.</i>	<i>Pintomyia</i> - gênero.
SP	São Paulo.
spp.	Espécies.
USP	Universidade de São Paulo.
<i>(V.)</i>	<i>Viannia</i> - subgênero.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Material necessário para coleta de flebotomíneos, segundo os tipos de armadilhas.	40
Quadro 2	Processo de dissecação de fêmeas de flebotomíneos. Situações em que ocorrem dificuldades na dissecação e possíveis soluções.	53

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (OKWOR e UZONNA, 2016). Os parasitas são transmitidos a hospedeiros mamíferos silvestres, ou animais sinantrópicos ou domésticos, através da picada de fêmeas infectadas de insetos flebotomíneos (LAINSON e SHAW, 1987). Dependendo do parasita e da resposta imune do hospedeiro, tanto na resistência quanto na suscetibilidade, a infecção estabelecida nas células do sistema fagocítico mononuclear pode se expressar nas formas clínicas, tegumentar (LT) ou visceral (LV) (PEARSON, 1993). Ambas as formas são endêmicas nas regiões tropicais e subtropicais. Existem em mais de 98 países, com estimativas de 0,2 – 0,4 milhões de novos casos ao ano de LV, 0,7 – 1,2 milhões de novos casos/ano de LT e com uma estimativa de morte anual entre 20.000 – 40.000 casos dessas doenças (ALVAR et al., 2012). A ocorrência das leishmanioses associa-se estreitamente a fatores ambientais, tanto naturais como antrópicos, influenciados pelas condições econômicas, sociais e culturais. A cobertura vegetal e fatores climáticos têm impacto no desenvolvimento e proliferação dos vetores, interferindo em suas densidades e, conseqüentemente, na taxa de contato entre os hospedeiros vertebrados e subsequente ocorrência de surtos de leishmanioses. A fragmentação de florestas naturais para atividades agrícolas ou de pecuária e, a preservação de manchas fragmentos de matas podem propiciar a presença de animais reservatórios da *Leishmania* spp. e oferecer condições para os vetores se desenvolverem no ambiente antrópico, incluindo áreas do peridomicílio (ORYAN e AKBARI, 2016). As leishmanioses afetam particularmente comunidades rurais pobres, ou por afluxo de populações suscetíveis atraídas para a agricultura e extrativismo; em contrapartida, populações de áreas com longos períodos de estiagem ao migrarem para outras áreas podem contribuir para a expansão da doença (ORYAN e AKBARI, 2016).

1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL

Mais de 90% dos casos de LV concentram-se em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. Um sério problema de saúde pública que está se agravando. A LV tem como agentes a *Leishmania donovani* de ocorrência no Velho Mundo e a *Leishmania infantum*, no Velho e Novo Mundo (ALVAR et al., 2012).

Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países, cuja transmissão se divide em três cenários: esporádica (Bolívia, Costa Rica, Guatemala, Guiana, Honduras, México e Nicarágua), estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai) (PAHO, 2016). De 2001 a 2014 foram registrados 48.720 casos de LV, com média anual de 3.480 casos. Do total de casos, 46.976 (96,42%) concentram-se no Brasil. Para o período de 2004 a 2012, houve uma tendência estável do número de casos, mas a partir de 2009 ocorreu aumento nos países do Cone Sul e redução nos países Andinos, Venezuela e Colômbia. A partir de 2012, ano em que os dados estão disponíveis no SisLeish, foram registradas 654 mortes atribuíveis à LV, com letalidade média de 6,6% (PAHO, 2016). No Brasil, desde 2007, quando a notificação passou a ser feita por autoctonia e não mais por residência, em 20 Unidades Federativas houve transmissão da doença humana. No período de 2001 a 2015, foram notificados 50.242 casos, sendo 2.649 (5,3%) sem informação do local de residência (até 2006) ou do local provável de infecção (a partir de 2007). Os casos com estas informações tiveram a seguinte distribuição: Região Norte: 8.690 (18,3%), Nordeste: 26.512 (55,7%), Sudeste: 8.496 (17,9%), Sul: 38 (0,08%) e Centro-Oeste: 3.857 (8,1%) (BRASIL, 2016). A presença da espécie *Lutzomyia longipalpis* tem papel epidemiológico importante na transmissão da LV, tanto no Brasil como no México, Guatemala, Venezuela, entre outros países (FORATTINI, 1973). A população humana suscetível, os vetores, os reservatórios, principalmente o cão doméstico e o meio ambiente formam a estrutura epidemiológica da doença (FORATTINI, 1973).

O principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*, do agente da LV está presente no continente americano desde a Península de Yucatan no México até o norte da Argentina. Na América Central, não foi assinalada em Belize. Na América do Sul, não existe registro da espécie no Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Equador, Peru e Chile. No Brasil, está presente em 25 dos 27 estados da Federação, sem registro nos Estados do Amazonas e Santa Catarina (ARRIVILLAGA et al., 2003; RANGEL e VILELA, 2008; SOUZA et al., 2009; SALOMÓN et al., 2011; SANTOS et al., 2012; GALARDO et al., 2013; BORGES et al., 2017). No Brasil, *Lu. longipalpis* está bem adaptado ao meio urbano; em algumas regiões dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, *Lu. cruzi* atua como vetor desse parasita e *Migonemyia migonei* é vetor suspeito no estado de Pernambuco (BRASIL, 2006).

Segundo o manual de vigilância e controle de LV, a incubação do agente etiológico no homem varia de 10 dias a 24 meses, com média de dois a seis meses. No cão, o período de incubação é variável de 3 meses a vários anos, com média de três a sete meses. Em humanos, essa parasitose é considerada crônica grave e pode levar à morte, quando não tratada (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014). A maior frequência de LV ocorre no sexo masculino, que apresenta maior susceptibilidade à doença e é mais frequente em crianças menores de 10 anos; isso é explicado pelo estado da imaturidade imunológica celular agravada pela desnutrição (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014).

O primeiro relato de LV em humano descrito nas Américas ocorreu em Porto Esperança, município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, em 1913 (MIGONE, 1913 *apud* ALENCAR, 1959). Nos focos de LV urbana no Brasil, tem-se observado que as crianças com menos de dois anos de idade apresentam sintomas clínicos progressivos e elevado índice de complicações. A letalidade da LV tem sido crescente, entre 7% e 13,3% (OLIVEIRA et al., 2006; REY et al., 2005; CAVALCANTE, 2007).

A infecção atinge o sistema linfo hematopoiético, que inclui fígado, baço, gânglios, medula óssea, rim e pulmão, podendo determinar lesões em praticamente todos os órgãos (DUARTE, 2000). Os rins apresentaram alterações nos homens e nos cães afetados, com sério risco de comprometer o estado geral do organismo (BADARÓ et al., 1986).

1.2. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A LT compreende um conjunto de infecções causadas por *Leishmania* spp., que afetam a pele, mucosas ou semimucosas. Têm distribuição mundial, com 1/3 dos casos ocorrendo em três regiões epidemiológicas: Américas, Bacia do Mediterrâneo, e o Oeste Asiático (do Oriente Médio até a Ásia Central). Dentre os países com estimativa elevada da LT, as formas cutâneas são as mais comuns e respondem por 70-75% da incidência global. Concentra-se em 10 países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Síria e Sudão (ALVAR et al., 2012; WHO, 2013).

Nas Américas, a LTA tem ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais. No período de 2001 a 2011, foram 638.702 casos reportados, sendo 257.812 (40,36%) na região Andina e 100.475 (15,73%) na América Central. Três países, Brasil com 270.572 casos

(42,36%), Colômbia, com 128.535 (20,08%) e Peru com 85.410 (13,37%), contribuíram com 75,8% do total de casos. Todavia, os coeficientes de incidência/100.000 habitantes mais elevados foram registrados no Panamá, Nicarágua e Peru (PAHO, 2016).

Em 2014, dos países endêmicos (dados do Suriname e Guiana Francesa não foram incluídos no sistema), 16 deles reportaram 51.098 casos de leishmanioses tegumentar, e assim como no período anterior, 3/4 dos casos detectados ocorreram nos mesmos países, Brasil, 20.418 (39,5%), Colômbia 11.586 (22,7%), Peru 6.231 (12,2%). A taxa de incidência para a América foi de 19,76 casos por 100.000 habitantes. Sendo as mais elevadas em Nicarágua (62,97/100.000 habitantes) e Costa Rica (52,55/100.000 habitantes) (PAHO, 2016).

No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões brasileiras. No período de 2001 a 2016 foram registrados 364.383 casos, assim distribuídos: Região Norte: 150.028 (41,17%), Nordeste: 113.273 (31,1%), Sudeste: 33.158 (9,1%), Sul: 8.155 (2,23%) e Centro-Oeste: 57.166 (15,7%), e 2.603 casos (0,7%) sem identificação do local da procedência. Na Região Norte, os estados do Pará, Amazonas e Rondônia se destacam. Na Região Nordeste, a maioria dos casos ocorre na Bahia, Ceará e Maranhão; na região Sudeste se destaca Minas Gerais; na região Sul a maioria dos casos no Paraná; na região Centro-Oeste, a maioria em Mato Grosso. A média anual considerando as cinco regiões foi de 23 mil casos novos de LTA (BRASIL, 2017).

A LTA é causada por várias espécies do gênero *Leishmania* dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* entre estas: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) garnhami*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) shawi* (LAINSON e SHAW, 2005). Os agentes da LTA são transmitidos no Brasil por várias espécies de flebotomíneos. A manifestação clínica pode ocorrer de várias formas (DESTOMBES, 1960), como pode ocorrer cura espontânea no decorrer da investigação diagnóstica (FAGUNDES et al., 2010).

Com base nas características clínicas e/ou imunopatológicas do quadro clínico e do aspecto morfológico e evolutivo das lesões (AZULAY, 1977; MARZOCHI e MARZOCHI, 1994) a LTA pode ser classificada em: cutânea subclínica, cutânea localizada, disseminada ou cutânea disseminada, cutânea difusa, mucosa e mucosa tardia, mucosa indeterminada ou

isolada, mucosa primária, mucocutânea (forma mucocutânea concomitante e forma mucocutânea contígua), linfática, recidiva cútis e dérmica pós calazar.

Leishmaniose subclínica em que há ausência de lesão cutânea, com 5% a 39,4% de taxas de infecção em áreas endêmicas (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; MARZOCHI et al., 1980).

Leishmaniose cutânea localizada (LCL) também denominada de “úlceras de Bauru” (FORATTINI, 1973) do Novo Mundo é caracterizada por lesão típica descrita como úlcera com bordas em moldura. Após a picada do flebotômio, surge no local, entre 15 dias a três meses, uma lesão de poucos milímetros de diâmetro (MARZOCHI, 1992), que aumenta de tamanho até chegar a necrosar, chamada de úlcera. A *Leishmania amazonensis* é uma das responsáveis por casos de LCL. Na maioria das vezes, são lesões únicas, ulceradas, com borda mais infiltrada que outras úlceras causadas por diferentes agentes etiológicos (SILVEIRA et al., 2004). Na leishmaniose linfática, ou leishmaniose bubônica, o parasita atinge os linfonodos e os vasos linfáticos de drenagem. O enfartamento ganglionar pode preceder o surgimento da lesão cutânea (SOUSA et al., 1995).

Leishmaniose recidiva cútis foi caracterizada por BERLIN et al., em 1940 como o mecanismo de reativação das lesões já cicatrizadas, que em geral se manifesta dentro de um ano após a infecção inicial (SARAVIA et al., 1990). Esse mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Leishmaniose disseminada (LD) ou cutânea disseminada é caracterizada pela presença de lesões múltiplas, espalhadas pelo corpo (CARVALHO et al., 1994; MACHADO et al., 2011). Essa forma clínica é causada pela infecção por *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (VIEIRA- GONÇALVES et al., 2008; CARVALHO et al., 1994; COSTA et al., 1986; COUPPIÉ et al., 2004; RINCÓN et al., 2009). Atinge geralmente o adulto do sexo masculino, porém há casos de mulheres e crianças afetadas (COSTA et al., 1986; RINCÓN et al., 2009). Nessa situação, a úlcera apresenta numerosas pápulas foliculares ou acneiformes, pústulas, placas e lesões verrucosas, que podem ou não sofrer necrose central e formar crosta (CARVALHO et al., 1994; COUPPIÉ et al., 2004). Em qualquer momento da doença, a mucosa das vias aéreas superiores pode ser acometida. A *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são responsáveis pela LD (CARVALHO et al., 1994; MACHADO et al., 2011; COSTA et al., 1986). Nos tecidos, as amastigotas de *L. amazonensis* são numerosas (SILVEIRA et al., 2005).

Leishmaniose cutânea difusa (LCD) apresenta lesões nodulares disseminadas, sem ulceração, relatadas por CONVIT e LAPENTA (1948) na Venezuela. Nas Américas, as espécies do complexo *mexicana* do subgênero *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, e *L. venezuelensis* são as responsáveis por essa forma de leishmaniose. No Brasil, a única responsável pela LCD é a *L. amazonensis*. As lesões nodulares causadas por ela não possuem ulcerações e evitam as mucosas (SILVA, 1978). Caso aconteça invasão da mucosa ou semimucosa, juntamente com lesões cutâneas ocorrerão lesões ósseas como osteopenia, lesões osteolíticas ou osteomielite (COSTA et al., 2005). Sem tratamento, essa doença leva a ocorrência de infiltração difusa da face, provocando desfiguração do paciente.

A forma mais grave na LTA é a leishmaniose mucosa (LM), na qual o parasita afeta as mucosas das vias aéreas superiores. Sem tratamento, a pirâmide nasal pode ser destruída. Nos anos 1980, a LM representava 3% dos casos da LTA (JONES et al., 1987). A LM é a responsável pelos casos de lesões nas mucosas e cutâneas simultaneamente, representando 14%- 28% dos casos entre pacientes com leishmaniose tegumentar (MARSDEN, 1986).

A lesão mucosa metastática ou tardia provocada pela espécie do parasita *L. (V.) braziliensis* aparece logo após o surgimento da lesão cutânea, 46% dos casos dois anos depois, 50% dos casos após cinco ou seis anos (AMATO et al., 2008; JONES et al., 1987; MARSDEN, 1986). Entretanto, entre 220 pacientes com leishmaniose cutânea (LC), em seis deles, no exame otorrinolaringológico com fibromicroscopia detectou-se a infiltração precoce das mucosas. (BOAVENTURA et al., 2006).

As espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* podem causar lesões nas mucosas (OSÓRIO et al., 1998; SANTRICH et al., 1990). Apesar dessa forma clínica ser associada a espécies do subgênero *Viannia* (DISCH et al., 2005), casos de LM provocadas por *L. amazonensis* foram relatados no Brasil (BARRAL et al., 1991).

Segundo o Ministério da Saúde (2017), no Brasil, a LTA é causada por sete espécies de *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. As três primeiras são responsáveis pela maioria dos casos e as quatro últimas estão restritas à Região Amazônica, e, em sua maioria, em ciclos silvestres.

1.3. VETOR

Os vetores de *Leishmania* spp. são os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), caracterizados por tamanho pequeno (dois a três mm) e corpo revestido por intensa cerdasidade. São holometábolos e passam por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (RANGEL e LAINSON, 2003). Atualmente são reconhecidas 1.008 (977 atuais e 38 fósseis) espécies de flebotomíneos no mundo, exceto na Antártica. Dessas, 522 atuais e 17 fósseis ocorrem no Novo Mundo (BATES et al., 2015; GALATI, 2017).

1.3.1. Fase imatura

Os ovos são colocados diretamente no substrato úmido, rico em matéria orgânica, e levam vários dias para eclodir. São geralmente de forma elipsóide, caracterizados por uma coloração branco-amarelada, que muda na maturação para cor castanho-escuro. A eclosão depende da espécie, das condições de temperatura, entre outros (FORATTINI, 1973).

A fase larval é dividida em quatro estádios e dura entre 14 e 21 dias. Durante a fase de pupa, caracterizada inicialmente por uma cor clara, esse inseto passa pela metamorfose, processo em que permanece fixo, e sua coloração torna-se mais escura ao se aproximar da emergência do adulto. Essa fase dura de seis a 12 dias, dependendo da espécie. O tempo total de desenvolvimento, desde a hematofagia da fêmea até o surgimento de formas adultas, no laboratório, é variável em relação a espécie e temperatura e dura em torno de 26 a 56 dias (ENDRIS et al., 1984; RANGEL et al., 1986).

1.3.2. Fase adulta

Na fase adulta, os flebotomíneos apresentam dimorfismo sexual em diferentes partes do corpo e nos hábitos alimentares: machos e fêmeas se nutrem de carboidratos provenientes da seiva de plantas e as fêmeas são hematófagas. Estas possuem o cibário adaptado e probóscide mais longa que as dos machos para a ingestão de sangue, necessário para a maturação dos ovários e formação dos ovos (RANGEL e LAINSON, 2003).

Morfologicamente, segundo GALATI (2003), os flebotomíneos adultos apresentam uma cápsula cefálica dotada de olhos compostos, genas, fronte, face, clipeo, vértice, pós-crânio com occipício, pós-gena e forâmen occipital. Os apêndices são representados pelas antenas, palpos, maxilares e peças bucais. As partes bucais ou probóscide são representadas pelo labro-epifaringe dorsal, hipofaringe intermediária, lábio na posição ventral, um par de

mandíbulas e um par de lacínias maxilares. A antena é formada por três segmentos: escapo, pedicelo e flagelo, este com 14 artículos ou flagelômeros.

O cibário, mais desenvolvido nas fêmeas, é uma cavidade constituída por escleritos laterais, protuberância posterior, área esclerosada, armadura bucal (formada por vários conjuntos de dentes), dentes anteriores, dentes posteriores e dentes laterais. Os prolongamentos dos escleritos laterais formam o arco esclerosado, no qual se implantam os músculos da bomba salivar. O cibário é ligado à faringe dorsalmente no nível da ponte posterior. Os dentes verticais atuam como trituradores das partículas e os horizontais como seletores de partículas. Segue-se ao cibário a faringe ou bomba esofagiana.

O cérvix, liga a cabeça ao tórax.

Três segmentos formam o tórax: pró, meso e meta tórax; cada um deles com a área dorsal representada pelo noto, uma ventral pelo esterno e unindo estes dois escleritos as pleuras laterais. Cada um dos segmentos apresenta um par de pernas, inseridas entre o esterno e as pleuras. No mesotórax, ocorre um par de asas inseridas entre a pleura e o mesonoto e no metatórax um par de halteres inseridos entre a pleura e o metanoto.

O abdômen é formado de 11 segmentos. Dorsalmente estão os tergitos, ventralmente, os esternitos e pleuras laterais unindo estes dois escleritos. No macho, os três últimos segmentos e nas fêmeas, os quatro últimos, se modificam para formar a genitália. Nos machos a genitália sofre rotação de 180° após a emergência.

Na genitália da fêmea, o nono esternito transforma-se em estrutura interna e possui um par de spermatecas e glândulas acessórias (GALATI, 2017).

As spermatecas (estrutura onde são armazenados os espermatozoides após a cópula) são dotadas de dutos individuais, um para cada corpo, que em muitas das espécies se unem para formar o duto comum, que se abre na câmara genital. Nas espécies que têm apenas dutos individuais estes se abrem isoladamente na câmara genital. Cada corpo apresenta uma estrutura apical (denominada de cabeça da spermateca) no qual se abrem os dutos de glândulas que secretam substâncias para preservação dos espermatozoides. O 10° segmento se torna bem reduzido e no 11° segmento, o tergito e o esternito se aderem para formar o proctígero, formando os cercos e o ânus (GALATI, 2017).

Nos machos, o nono segmento se transforma, formando várias estruturas que auxiliam para segurar as fêmeas durante a cópula (um par de gonocoxitos, gonóstilos, parâmeros e lobos epandriais), e também as estruturas internas: um par de testículos, que se unem por meio dos vasos deferentes à vesícula seminal e esta por meio do ducto ejaculador à bomba espermática. Esta é dotada de duas partes, a região do apódema edeagal, que se assemelha a um pistão, e o saco espermático, por onde entram os espermatozóides. O saco espermático conecta-se com os ductos edeagais através do qual são ejetados os espermatozoides. Os ductos edeagais alcançam o meio externo por meio das bainhas paramerais, situadas entre o par de parâmeros, servindo de guia.

Assim como nas fêmeas, o 10º segmento é reduzido e com a 11ª forma o proctígero de onde surgem os cercos e o ânus (GALATI, 2017).

1.3.2.1. Ingestão de sangue pela fêmea

O sangue ao ser ingerido pela fêmea entra por meio do canal alimentar que se encontra no interior do labro-epifaringe que faz conexão com o cibário onde os dentes anteriores, realizam um movimento de compressão contra a área esclerosada e auxiliam na quebra de partículas do sangue e de seleção, à maneira de um rastelo, ao passar pelos dentes posteriores (horizontais). A partir daí, adentra à faringe ou bomba esofagiana que empurra o sangue para o esôfago (onde se abre o divertículo esofágico, ou papo no qual se armazena açúcares), atravessa a válvula estomodeal, entra na parte torácica do tubo digestório médio ou intestino torácico médio, segue para a parte abdominal do intestino médio. Neste, após algumas horas, começa a se formar a matriz peritrófica, que envolve o bolo alimentar e atua como uma barreira seletiva a entrada das enzimas digestivas e também protege a parede abdominal de danos mecânicos. O processo de degradação do bolo alimentar tem início da parte posterior desta porção do intestino. Os produtos remanescentes da degradação do bolo alimentar atravessam a região do piloro, onde se abrem os tubos de Malpighi (órgãos excretórios) e entra na porção posterior do tubo digestório, onde se encontram as ampolas (papilas) retais e segue até o ânus para serem eliminados (FORATTINI, 1973).

1.4. AGENTE ETIOLÓGICO

Os agentes etiológicos das leishmanioses são tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. LAINSON e SHAW, em 1987, dividiram o gênero *Leishmania* em três subgêneros. *Leishmania* agregando as espécies em que os flagelados, formas promastigotas, nos flebotomíneos ocupam a parte suprapilária do organismo do inseto, ou seja, no tubo digestório anterior e médio do vetor, com distribuição no Velho Mundo e nas Américas, *Viannia* para as espécies que as promastigotas ocorrem na região peripilária, ou seja, na parte anterior, média e posterior do tubo digestório, com distribuição apenas nas Américas, e o subgênero *Sauroleishmania* ocupando apenas a parte posterior do tubo digestório dos vetores, e encontrado apenas em répteis do Velho Mundo. Recentemente, foi proposto o subgênero *Mundinia* por ESPINOSA et al., (2018), com distribuição nas regiões Australiana, Velho Mundo e Américas, para uma parte das espécies incluídas por LAINSON e SHAW, em 1987, no subgênero *Leishmania*.

As leishmanias que causam a forma visceral, predominantemente, pertencem a duas espécies: *L. (Leishmania) donovani*, restrita ao Velho Mundo e *L. (L.) infantum*, com ocorrência no Velho Mundo e nas Américas. As leishmanioses tegumentares no Velho Mundo, em sua maioria, são atribuídas a *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*. Nas Américas, a LTA em humanos é causada por 16 espécies: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) garnhami*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) waltoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) shawi*, e *L. (Mundinia) martiniquensis* (LAINSON e SHAW, 2005; SHAW et al. 2015; ESPINOSA et al., 2018).

Além dessas espécies, casos humanos de LTA foram atribuídos ao tripanossomatídeo *Endotrypanum colombiense* por ESPINOSA et al. 2018. Vale ressaltar que esta espécie foi incluída no gênero *Leishmania* por diversos autores (KREUTZER et al., 1991; LAINSON e SHAW, 2005; CUPOLLILO et al., 2000).

1.5. DESENVOLVIMENTO DO PARASITA NO VETOR

As leishmanias apresentam ciclo digenético: a forma amastigota, sem flagelo aparente, ocorre no hospedeiro vertebrado; e a forma promastigota que ocorre no trato digestório do

vetor invertebrado, e apresenta flagelo externo (SACKS, 1989; WALTERS, 1993). Fator importante para o desenvolvimento da leishmania até a forma infectante (metacíclica) no intestino do vetor é a metaciclogenese (multiplicação, evolução e diferenciação das leishmanias) que necessita da microbiota intestinal do flebotomíneo. A microbiota diminui em riqueza e diversidade bacteriana, conforme ocorre a evolução das leishmanias (KELLY et al., 2017).

Segundo KAMHAWI (2006), a ingestão do sangue pela fêmea, forma o bolo alimentar no intestino médio abdominal e induz as seguintes respostas fisiológicas: formação da matriz peritrófica dentro das primeiras quatro horas da entrada do bolo alimentar, (a matriz peritrófica é constituída de proteínas com glicoproteínas, mantidas junto por microfibrilas quitinosas), diurese e secreção de enzimas digestivas. A matriz envolve o repasto sanguíneo, protegendo o epitélio do intestino médio das partículas alimentares abrasivas e dos micróbios, desacelerando a difusão das proteases digestivas no interior do lúmen endoperitrófico (dentro da matriz peritrófica); o pico dessa protease é atingido entre 18 a 48 horas depois do repasto sanguíneo e é um meio destrutivo e devastador para o parasita. Pouco se sabe da regulação da expressão das enzimas digestivas dos flebotomíneos.

A infecção inicia-se quando o inseto ingere o sangue com os macrófagos infectados com **amastigotas**, células ovóides sem flagelo aparente. As amastigotas após o repasto sanguíneo são altamente sensíveis para a proteólise, e 50% delas morrem pela ação das enzimas nos primeiros dois dias, as outras 50% sobrevivem e se desenvolvem nas formas promastigotas flageladas (KAMHAWI, 2006).

Na parte abdominal do tubo digestório médio, as amastigotas se transformam em promastigotas com diferentes formas: **procíclicas** (com curto flagelo). Os procíclicos, relativamente resistentes ao ataque das enzimas digestivas, se transformam entre 24 - 48 h nas formas **nectomonas** (mais alongadas e com flagelo mais longos que as procíclicas). Estas escapam das limitações da matriz peritrófica e se conectam ao longo do revestimento epitelial do tubo digestório médio abdominal, para depois migrarem, se multiplicarem e colonizarem o tubo digestório médio torácico. Em torno do quarto dia, se transformam nas **leptomonas**. Essas formas produzem um gel que ocupa o tubo digestório médio na parte torácica, e no qual as promastigotas em grande quantidade ficam imersas. Do quinto ao sétimo dia, as leptomonas

se transformam em **metacíclicas** e **haptomonas**. As haptomonas se ligam à válvula estomodeal. No caso de uma infecção pesada, a válvula estomodeal degenera e propicia a passagem das formas metacíclicas para o tubo digestório anterior, facilitando o refluxo das formas metacíclicas imersas no gel para o tubo digestório anterior, e transmissão do parasita ao hospedeiro vertebrado. A sobrevivência do parasita dentro do inseto depende de cada etapa caracterizada por mudanças morfológicas e funcionais. O período do sexto ao nono dia é o tempo necessário para o parasita completar a evolução gradual dele dentro do tubo digestório do vetor, dependendo da espécie (KAMHAWI, 2006; DOSTALOVÁ e VOLF, 2012). Os mecanismos de transmissão usados pela *Leishmania* são fundamentais para manter o ciclo de vida desses agentes infecciosos (BATES, 2007).

Para que o inseto seja incriminado como vetor de *Leishmania* ao homem, deve obedecer a cinco critérios básicos: 1) Tem que ser antropofílico e alimentar em reservatório do parasita. 2) Estar presente na mesma região geográfica onde ocorre a doença. 3) Ser capaz de suportar o desenvolvimento do parasita após a refeição mantendo uma cepa de parasitas depois da alimentação, digestão e evacuação, de modo a se transformar na forma infectante. 4) Ser encontrado infectado naturalmente com as mesmas espécies de parasitas dos isolados de pacientes. 5) A prova irrefutável, que consiste em demonstrar a sua competência vetorial. Esta consiste na habilidade de uma espécie de flebotomíneo se infectar, permitir que ocorra todo o ciclo de desenvolvimento do parasita, sobreviver a infecção e transmitir a forma infectante ao picar um hospedeiro suscetível (MAROLI et al., 2013) ou seja demonstrar a competência vetorial (KILLICK- KENDRICK, 1999).

Para que uma população de uma determinada espécie seja considerada vetora de um determinado agente infeccioso, deve apresentar um comportamento que propicia o contato homem - reservatório, apresentar condições intrínsecas para o desenvolvimento do agente infeccioso até a forma infectante, denominado período de incubação extrínseca, ter sobrevida infectante, e ocorrer em uma densidade tal que permita a manutenção do parasita na natureza, além de ser competente para transmitir o parasita. O atendimento a esses itens implica na capacidade vetorial (GALVIS-OVALLOS, 2011).

Nas Américas, são 56 as espécies de flebotomíneos implicadas como vetores de agentes de leishmaniose para homens e animais; no entanto, para poucas delas se tem o

conhecimento de todos os quesitos de modo a considerá-las como vetoras comprovadas (MAROLI et al., 2013). Segundo esses autores, essas espécies implicadas como vetoras, pertencem ao gênero *Lutzomyia*. Todavia, na classificação de GALATI (2003), essas espécies foram divididas em duas subtribos: Lutzomyiina e Psychodopygina e nove gêneros; quatro destes: *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia* e *Pintomyia* estão incluídos em Lutzomyiina; e cinco: *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Psathyromyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia*, em Psychodopygina.

O estudo da interação vetor-parasita tem um grande interesse epidemiológico, não somente para mostrar a existência de flagelados no trato digestório do inseto, mas também para obter informações sobre em que fases do ciclo biológico se encontram as leishmanias. Isto é importante, pois apenas as formas metacíclicas são infectivas para os vertebrados (KILLICK- KENDRICK, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses apresentam peculiaridades nas áreas de transmissão. A leishmaniose tegumentar envolve várias espécies de *Leishmania* em sua etiologia, vários grupos de reservatórios, e mais de 50 espécies de flebotomíneos com potencial vetor. Além disso, apresentam variedade de ambientes de transmissão envolvendo áreas de vegetação nativa, áreas rurais ou periurbanos com matas residuais nativas ou de segunda formação (BRASIL, 2007). Por outro lado, a leishmaniose visceral, com etiologia atribuída apenas a *L. (L.) infantum* e transmitida principalmente por *Lu. longipalpis*, e tendo os cães domésticos como principais reservatórios; merece atenção pela diferença nos padrões de transmissão nas áreas de ocorrência das espécies do complexo *longipalpis* e nas áreas com transmissão na ausência deste vetor.

A vigilância entomológica auxilia na elucidação dos padrões de transmissão das leishmanioses com estudos sobre a fauna flebotomínea em seus aspectos de distribuição espaço temporal e da interação das populações de vetores-parasitas- hospedeiros. Nesse sentido, as investigações da infecção natural das espécies de flebotomíneos por *Leishmania* contribuem para elucidar as espécies de maior potencial vetor e são imprescindíveis para avaliar a capacidade vetorial.

Além disto, a vigilância entomológica atua complementarmente à vigilância epidemiológica para definir a autoctonia dos casos e identificar o ambiente de transmissão, tais como, domiciliar urbano, periurbano ou silvestre.

Na investigação entomológica, as espécies vetoras podem ser coletadas utilizando vários métodos e equipamentos, em especial: armadilhas automáticas luminosas (tipo CDC), armadilha de Shannon com isca luminosa e aspiradores manuais. As coletas devem ser repetidas por três meses seguidos para confirmar a ausência de vetores. Ao encontrar, pelo menos, uma espécie de importância epidemiológica em um ou mais métodos de coleta, a pesquisa entomológica em foco é considerada positiva.

As capturas para monitoramento entomológico deverão ser realizadas em, pelo menos, três pontos de coleta, em estações de monitoramento: no intradomicílio, no peridomicílio e na margem da mata.

A investigação da presença de flagelados no tubo digestório de fêmeas e posterior identificação da espécie do parasita pode ser utilizada pela vigilância entomológica para identificar a espécie de leishmania circulante, bem como áreas de risco de transmissão.

Todavia, a dissecação de fêmeas nem sempre é uma tarefa fácil, haja vista as discordâncias entre os exames realizados por dissecação e por técnicas moleculares (PAIVA et al., 2006; SAVANI et al., 2009).

Essa dificuldade na visualização pode ser reflexo da quantidade de parasitas no tubo digestório, do estágio evolutivo em que se encontram e o modo como o trato digestório da fêmea foi exposto, para que se possa observá-lo em toda a sua extensão. Além desses aspectos, a experiência do observador pode interferir na visualização dos flagelados.

É neste sentido que o estudo pretende contribuir com imagens de todo o processo de dissecação e nas diferentes formas de manifestação da infecção por flagelados no tubo digestório da fêmea de flebotomíneo. Com isto, oferecer ferramenta de apoio aos profissionais da vigilância entomológica para a identificação de possíveis vetores de *Leishmania* spp., e apoiar as investigações de áreas com potencial de risco de transmissão das leishmanioses.

O manual visa, portanto, fornecer passo a passo o processo de dissecação dos insetos, identificação dos flebotomíneos e investigação da presença de flagelados. Consequentemente, colaborar com o programa de controle e de vigilância epidemiológica das leishmanioses, auxiliando na preparação de técnicos para atuarem na área de vigilância entomológica. Além disso, o manual também poderá contribuir em outros estudos relacionados a ecologia de vetores, assim como os voltados para a competência vetorial.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar manual que auxilie na investigação de infecção natural por *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever e documentar o processo de obtenção de fêmeas de flebotomíneos em campo e procedimentos para sua sobrevivência.
- Descrever e documentar o procedimento de dissecção para investigação de formas flageladas e identificação da espécie de flebotomíneo.
- Descrever e documentar etapas evolutivas das formas flageladas.
- Descrever e documentar os procedimentos para uma adequada conservação das amostras de flagelados para futuros testes moleculares para identificação da espécie do parasita.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a investigação das formas flageladas houve necessidade de obtenção da infecção experimental de fêmeas de flebotomíneos selvagens e de obtidas em laboratório. Os estudos foram realizados com três espécies: *Lu. longipalpis*, vetor de *L. (L.) infantum*, *Nyssomyia neivai* e *Pintomyia fischeri*, considerados potenciais vetores de *L. (V.) braziliensis* (DINIZ et al., 2014).

Para a elaboração do manual foram feitos registros do processo de coleta dos espécimes, manutenção dos espécimes em laboratório, dissecação para observação de flagelados e documentação das etapas.

4.1. OBTENÇÃO DAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS INFECTADAS POR *Leishmania*

As fêmeas de *Ny. neivai* foram coletadas em armadilha Shannon, no município de Araraquara (SP), e cedidas pela Dra. Mara Cristina Pinto do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Araraquara. Depois foram expostas para se alimentarem em hamsters infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis*. Apenas duas fêmeas mostraram-se infectadas por *L. braziliensis*.

As fêmeas de *Lu. longipalpis* provenientes de cultivo no laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP/ Flebotomíneos), com parentais coletados em municípios da região noroeste do estado de São Paulo, foram cedidas pelo Dr. Fredy Galvis-Ovallos, pós-doutorando da Faculdade de Saúde Pública FSP/USP. Depois foram expostas para se alimentarem em hamsters infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis*. Apenas duas fêmeas mostraram-se infectadas por *L. braziliensis*.

As fêmeas de *Pi. fischeri* foram coletadas em armadilha Shannon, no Parque da Cantareira, São Paulo (SP) e depois foram expostas para se alimentarem em hamsters infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis*. Apenas duas fêmeas mostraram-se infectadas por *L. braziliensis*.

A obtenção dos flebotomíneos infectados foi realizada no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública (LESP/ Flebotomíneos), segundo o protocolo descrito por DINIZ et al. (2014), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (CEP-IMT 057/2009) e Comitê de Biossegurança da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São

Paulo (protocolo 2026 OF. COEP/14/10). Os hamsters foram infectados por cepas mantidas no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-50-FMUSP) [*L. (V.) braziliensis* cepa MHOM/BR/1995/M15280; *L. (L.) infantum* cepa 46 IP].

4.2. ELABORAÇÃO DO MANUAL

A descrição e documentação do processo de obtenção de fêmeas em campo, procedimentos para garantir a sobrevivência delas até a dissecação para investigação da infecção por flagelados e o processo de dissecação foram feitos com base em atividades desenvolvidas no LESP/ Flebotomíneos, quando do desenvolvimento de estudos ecológicos de flebotomíneos e aspectos da capacidade vetorial para *Leishmania* (BRILHANTE et al., 2017; GALATI et al., 2001, 2003, 2010; GALVIS 2011; DINIZ et al., 2014; GALVIS et al., 2017; MOSCHIN et al., 2013).

4.3. DISSECÇÃO E OBSERVAÇÃO DAS FÊMEAS

A dissecação foi realizada em estereoscópio, com aumento de 60x e a investigação da presença de flagelados em microscópio óptico com aumento de 400x ao qual foi acoplada uma câmara que capturava a imagem e a transmitia à tela de um computador (AxioCam camera model '105 color' (Carl Zeiss® MicroImaging GmbH, Jena, TH, DE).

Após a análise, uma amostra de cada uma das fêmeas que apresentaram flagelados foi recolhida em microtubos (1,5 ml) contendo álcool isopropílico 100%, documentada e armazenada para futuros estudos moleculares com a finalidade de identificar os parasitas.

5. RESULTADOS

Como resultado da pesquisa, apresenta-se o manual, no qual são descritos e ilustrados aspectos relativos a captura e preservação dos espécimes em campo, transporte dos espécimes para o laboratório, manutenção das fêmeas para que permaneçam vivas até a dissecação, o processo de dissecação para a investigação de flagelados, a observação dos flagelados e armazenamento dos tubos digestórios contendo flagelados a ser enviado a um centro de referência para a identificação específica do parasita.

5.1. MANUAL SOBRE PROCESSO DE DISSECAÇÃO DE FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS PARA INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR FLAGELADOS

O manual é apresentado nas páginas 34 a 76.

5.2. VÍDEOS

Os arquivos em vídeos encontram-se anexados, e apresentam o processo de dissecação das fêmeas de flebotomíneos e o trato digestório das mesmas com presença de flagelados.

Manual sobre processo de dissecação de fêmeas de flebotomíneos para investigação de infecção por flagelados

**Carole El Khoury Mansour
Fredy Galvis-Ovallos
Vanessa Gusmon da Silva
Eunice A. B. Galati**

**Programa de Mestrado
Profissional em Entomologia em
Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública,
Universidade de São Paulo**

**São Paulo
2018**

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	36
2. COLETA E PRESERVAÇÃO DOS ESPÉCIMES EM CAMPO	38
3. ACOMODAÇÃO, ALIMENTAÇÃO E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIO	44
4. DISSECÇÃO	45
4.1. MATERIAIS UTILIZADOS	45
4.2. PREPARAÇÃO DA BANCADA PARA DISSECÇÃO	45
4.3. PROCEDIMENTOS DA DISSECÇÃO E REGISTRO DOS DADOS	52
4.4. OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA E REGISTRO DOS DADOS	58
5. BIOSEGURANÇA DURANTE A INVESTIGAÇÃO	74
6. INSTALAÇÕES FÍSICAS DO LABORATÓRIO	75
7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. APRESENTAÇÃO

As leishmanioses são parasitoses não contagiosas causadas por diversas espécies de *Leishmania* transmitidas pelas fêmeas de várias espécies de flebotomíneos a mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos. Podem se manifestar na forma tegumentar (LT) ou visceral (LV) e têm sido registradas em quase uma centena de países, com estimativas de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos ao ano de LV e de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos ao ano de LT (ALVAR et al., 2012). A ocorrência dessas parasitoses encontra-se estreitamente associada a fatores ambientais naturais e antrópicos, influenciados por condições econômicas, sociais e culturais (ORYAN e AKBARI, 2016). No Brasil as formas tegumentares e a visceral representam importantes problemas de saúde pública. Na LT as cicatrizes são permanentes e em alguns casos podem evoluir para a forma mucosa que é desfigurante. A LV, em franca expansão, incide principalmente em crianças e a doença quando manifesta, se não oportunamente tratada pode evoluir para óbito.

A vigilância entomológica integra o programa de controle de leishmanioses, sendo um dos seus propósitos avaliar o nível de circulação do parasita e também identificar a espécie de leishmânia circulante na área. Essas informações podem ser obtidas por meio da investigação da infecção natural por leishmânia em fêmeas silvestres por meio da observação de flagelados no tubo digestório de fêmeas dissecadas. No entanto, as discordâncias entre os exames realizados por dissecação e por técnicas moleculares (PAIVA et al., 2006; SAVANI et al., 2009) evidenciam que nem sempre, a dissecação é uma tarefa fácil e o resultado obtido é fidedigno. A quantidade de parasitas no tubo digestório, flagelados ainda vivos durante a observação ao microscópio, de modo que o seu movimento chame a atenção do observador, mas, sobretudo como o trato digestório foi exposto de modo que se possa observá-lo em sua extensão, são fatores que podem influenciar nos resultados obtidos pela dissecação. Não há dúvida também de que a experiência do observador bem treinado em visualizar os flagelados possa também interferir. É, portanto, objetivo deste manual, contribuir com imagens de todo o processo de dissecação e nas diferentes formas de manifestação da infecção por flagelados no tubo digestório das fêmeas de flebotomíneos.

O manual apresenta passo a passo o processo de dissecação dos insetos, identificação dos flebotomíneos e investigação da presença de flagelados. Espera-se, com essa ferramenta auxiliar profissionais da vigilância entomológica para a identificação de possíveis vetores de *Leishmania* spp. que apoiem as investigações de áreas com potencial de risco de transmissão das leishmanioses. Consequentemente colaborar com o programa de controle e de vigilância

epidemiológica das leishmanioses, auxiliando na preparação de técnicos para atuarem nessa área da vigilância entomológica. Além disto, o manual também poderá contribuir para pesquisadores que estejam iniciando seus estudos sobre ecologia de vetores, principalmente para aqueles voltados para a competência vetorial.

2. COLETA E PRESERVAÇÃO DOS ESPÉCIMES EM CAMPO

As atividades de vigilância entomológica nos programas de controle de leishmaniose têm como objetivo levantar informações qualitativas e quantitativas sobre os flebotomíneos vetores de agentes das leishmanioses tegumentar e visceral. Para tanto, indica coletas manuais utilizando capturador elétrico (motorizado) ou tubo de sucção tipo aspirador de Castro (Fig. 1), armadilhas automáticas luminosas, tipo CDC (CDC= Centers of Disease Control and Prevention) ou similares; armadilhas de Shannon, folhas em papel impregnado com óleo, armadilhas tendo feromônios ou iscas animais, tal como roedores, em armadilha de Disney, em áreas com transmissão da leishmaniose tegumentar com a presença de *L. amazonensis* (BRASIL 2014, 2017).

Essas armadilhas em diferentes estudos têm sido adaptadas para melhor atender aos objetivos das pesquisas, como na proposta de GALATI et al. (2001) que apresentaram modificações da armadilha de Shannon no sentido de torná-la menor, mais leve e na cor preta, diferindo assim da originalmente descrita (SHANNON, 1939) (Fig. 2. A, B, C e D). Armadilhas CDC alimentadas por baterias ao invés de pilhas, tornando-as menos dispendiosas foram propostas por GALATI et al. (2010). Nas armadilhas tipo CDC, a substituição da câmara coletora por uma gaiola com armação em ferro e tecido em voil (20 x 20 x 20 cm) favorece a permanência das fêmeas vivas, assim como o seu revestimento com saco plástico (Fig. 3. A e B); no caso de armadilha CDC adaptada para coleta de flebotomíneos usando hamster protegido como isca (Fig. 4); a câmara coletora pode ser substituída por uma gaiola para preservar melhor as fêmeas vivas. No caso de armadilhas Disney para coleta de flebotomíneos usando hamster como isca, com bandejas untadas com óleo de rícino (Fig. 5) ou folhas impregnadas com óleo, embora seja um método eficaz para a coleta de algumas espécies em determinadas circunstâncias, o fato das fêmeas ficarem aderidas ao óleo não é muito recomendável para se fazer a dissecação, a menos que a retirada delas ocorra algumas horas após suas aderências. Quando o inseto está morto há mais tempo, a dissecação torna-se difícil para a exposição do tubo digestório, e os flagelados, se presentes, podem estar mortos e sofrerem degradação.

Os flebotomíneos coletados em armadilhas de Shannon ou por aspiração em abrigos devem ser mantidos em gaiolas de voil (20 x 20 x 20cm), nas quais são transportados para o laboratório. Para o transporte, recomenda-se cobrir a gaiola em quatro dos seus lados com toalha umedecida e envolvê-la com saco plástico. Também podem ser utilizados frascos plásticos com revestimento de gesso em seu fundo, tampa furada e coberta com tecido. Na

lateral existe uma abertura com diâmetro ligeiramente maior do que o do aspirador de Castro (Fig. 6 A) para a introdução dos insetos. A vedação dessa abertura é feita com rolha de cortiça envolvida em um pedaço de meia de nylon (Fig. 6 B, C e D). O gesso deve ser umedecido um pouco antes da introdução dos flebotomíneos. Para manter a umidade pode-se colocar os frascos dentro de um isopor tendo em seu fundo toalha úmida. Para o transporte, o isopor deve ser fechado. A gaiola acoplada à armadilha CDC, ao ser retirada, deve ser mantida e transportada como descrito para o armazenamento das coletas com armadilha de Shannon.

A manutenção dos insetos logo após mortos em congelador a -20°C preserva os flagelados vivos por mais tempo. Constatamos isso no tubo digestório de uma fêmea contendo flagelados de *L. braziliensis*, após passar pelo seguinte procedimento: à lâmina contendo o tubo digestório coberto por lamínula foi adicionada mais uma gota de solução salina a 0,9% nas bordas dessa; com isto, a solução se infiltrou e manteve o tubo digestório em meio aquoso; a seguir, a lâmina foi colocada dentro de uma placa de Petri de vidro com tampa e mantida no congelador a -20°C por 15 horas. Decorrido este período, ao examinar a lâmina, constatamos no tubo digestório que os flagelados continuavam vivos e com movimentos vigorosos.

A síntese do material a ser utilizado em campo encontra-se no quadro 1, com ilustrações nas figuras de 1 a 6.

O quadro 1 ilustra o material necessário para coleta de flebotomíneos, segundo os tipos de armadilhas.

Fig. 1. Fotografia do tubo de acrílico do aspirador de Castro com duas fêmeas dentro.

Fonte: Mansour (2018).

Quadro 1: material necessário para coleta de flebotomíneos, segundo os tipos de armadilhas.

	ASPIRADOR		CDC		DISNEY	FOLHAS aderentes	SHANNON	
	Castro	Elétrico	Com isca	Sem isca			Convencional	Modificada
Atrativos químicos: feromônios ou cairomônios (ex. CO₂, ácido láctico)	Não	Não	Não	Sim/ Não	Não	Sim/ Não	Não	Não
Cordas ou barbantes	Não	Não	Sim	Sim	Sim (Suspensa) / Não	Sim	Sim	Sim
Caixa de isopor	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Fonte luminosa	Não	Não	Sim/ Não	Sim	Não	Não	Sim/ Não (diurna)	Sim/ Não (diurna)
Gaiola ou frascos para manter os flebotomíneos vivos.	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Toalhas umedecidas para o transporte das gaiolas.	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Isca animal	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim/ Não	Sim/ Não	Sim/ Não
Pincéis	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Pinças entomológicas	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não
Tubos com álcool	Sim/ Não	Sim/ Não	Sim/ Não	Sim/ Não	Sim	Sim	Sim/ Não	Sim/ Não

Fonte: Mansour et al. (2018).

Figs. 2. (A e B) Fotografias de armadilhas Shannon branca. (A) Pesquisadora com lanterna de cabeça e o aspirador de Castro na armadilha de Shannon branca. (B) Gaiola ao lado da armadilha de Shannon para manter os flebotomíneos. (C) Fotografia das duas armadilhas, preta e branca, uma do lado da outra. (D) Fotografia da armadilha Shannon preta.

Fonte: LESP/ Flebotomíneos (2018).

Figs.3. Fotografias da CDC acoplada com gaiola, para preservar os flebotomíneos vivos. (A) Gaiola antes de ser coberta com o plástico. (B) Gaiola coberta pelo plástico.

Fonte: Mansour (2018).

Fig.4. Fotografia da armadilha CDC para coleta de flebotomíneos usando hamster protegido como isca. Protótipo desenvolvido no projeto Fapesp 2009/53414-1.

Fig.5. Fotografia da armadilha Disney para coleta de flebotomíneos usando hamster como isca, com bandejas untadas com óleo de rícino. Protótipo desenvolvido no projeto Fapesp 2009/53414-1.

Figs.6. (A) Fotografia do aspirador de Castro para a captura dos flebotomíneos. (B, C e D) Fotografias do mesmo frasco com fundo de gesso e abertura lateral para introduzir os insetos com a ajuda do aspirador Castro.

Fonte: Mansour (2018).

3. ACOMODAÇÃO, ALIMENTAÇÃO E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIO

As amostras que entraram no laboratório para a dissecação, após registradas com informações sobre procedência, método e data da coleta, foram preservadas em gaiolas de tecido voil e mantidas em temperatura ambiental entre 25-30 °C, com pouca luz. A umidade pode ser mantida cobrindo-se a gaiola com uma toalha úmida e, por cima, plástico; exceto em sua base apoiada no substrato, para evitar excesso de umidade que pode matar os insetos. A nutrição pode ser mantida com um pedaço de algodão umedecido com uma solução açucarada a 10%. A solução açucarada a 10% é preparada em tubo Falcon 50 ml. Umedecer um pedaço de algodão com essa solução, tirar o excesso, para evitar que o inseto grude e morra (Fig. 7. A, B e C).

Figs.7. Fotografias da gaiola para acomodação e preservação dos flebotomíneos. (A) Gaiola fechada com fêmeas e por cima dela, chumaço de algodão umedecido (seta preta) com solução açucarada. (B) Fotografia das fêmeas pousadas em suas paredes. (C) Gaiolas cobertas com toalha umedecida e por cima vai o plástico.

Fonte: Mansour (2018).

4. DISSECÇÃO

4.1. MATERIAIS UTILIZADOS

- Microscópio estereoscópico binocular (Lupa).
- Lâminas.
- Lamínulas.
- Solução fisiológica a 0,9%.
- Dois estiletes, que após cada dissecção devem ser mergulhados em solução de hipoclorito de sódio (2,0% a 2,5%).
- Seringas de 1ml acopladas a agulhas de 6mm x 0,45mm. Devem ser descartadas após cada dissecção para evitar a contaminação.
- Pinça entomológica.
- Álcool isopropílico 100%.
- Microtubos de (1,5ml) esterilizados para acomodar a amostras dos insetos dissecados para posterior identificação dos flagelados.
- Placas de gelo artificial reutilizável ou congelador a -20°C para anestesiá-los insetos ou, alternativamente, câmara mortífera com éter etílico.

4.2. PREPARAÇÃO DA BANCADA PARA DISSECÇÃO

Preparar a bancada com todo material que deve ser usado para a dissecção (Figs. 8. A, B, C, D e E) e uma planilha para anotações (Fig. 9); depois individualizar as fêmeas, coletando-as da gaiola e colocando-as em um frasco que é coberto com tecido voil ou de meia de nylon, e acima deste uma tampa plástica com um furo em seu centro (Fig. 10). Depois disso, anestesiá-los inseto. O frasco pode ser colocado por 10-12 minutos no congelador/freezer (-20°C) ou entre duas a três placas de gelo reutilizáveis dentro de um isopor (Fig. 11).

Alternativamente, pode-se colocar sobre o furo da tampa do frasco um pequeno chumaço de algodão embebido em éter etílico por três a quatro minutos. O frasco deve ser coberto por um recipiente fechado para evitar evaporação do produto ao meio ambiente. Sugere-se o uso de um copo de vidro de boca para baixo (Fig. 12). Nos procedimentos com o éter, não deixar o inseto exposto por tempo maior que 10 minutos, porque o abdômen da

fêmea fica inchado e, ao dissecá-la, o aparelho digestório pode se romper. Pode-se também colocar a fêmea anestesiada em um microtubo (1,5 ml) com uma solução salina a 0,9% e agitá-lo levemente para desprendimento das cerdas do corpo dela. Se o tubo for fortemente agitado, a fêmea afunda no tubo e absorve muito líquido, tornando difícil a dissecação. Para a retirada da fêmea do microtubo utiliza-se uma pipeta Pasteur plástica ou pinça entomológica. Outra alternativa é usar uma cuba e mergulhá-la em pocinhos contendo solução salina (0,9%), para desprender as cerdas e, assim, a fêmea pode ser retirada com pinça entomológica segurando-a pelas asas.

A fêmea anestesiada é colocada com a ajuda de uma pinça em uma lâmina de vidro esterilizada no meio de uma gota de solução salina 0,9%. O tamanho da gota pode ser controlado com a ajuda de uma seringa descartável de 1 ml acoplada a agulhas de diâmetro 6mm x 0,45mm (Fig.13). Na ausência da seringa, pinga-se a solução salina com pipeta Pasteur direto na lâmina. O excesso dessa solução dificulta a dissecação. É aconselhável usar o soro embalado em pequenas porções, para evitar a contaminação do produto (Fig. 14). Dada a fragilidade do inseto, os movimentos das mãos são delicados, porém firmes. Na dissecação, deve-se utilizar equipamentos de biossegurança individual (Fig. 15).

A síntese do material a ser utilizado em laboratório encontra-se nas figuras de 8 a 15.

Figs. 8. (A) Frascos de acrílico usados na individualização das fêmeas de flebotomíneos. (B) Em destaque o frasco de acrílico com fundo revestido de gesso, tampa com orifício central e retalho da meia fina. (C) Bancada organizada para dissecar. (D) Materiais usados durante a dissecação. (E) Destaque para os estiletes e a pinça entomológicos.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 9. Modelo da planilha para acompanhar a dissecação e observação microscópica dos flagelados.

REGISTRO DE ACOMPANHAMENTO DE INFECÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS

Informações Gerais	
Município de coleta:	São Paulo
Local de coleta:	Parque Estadual Serra da Cantareira (Horto Florestal)
Data da coleta:	13.09.2017
Data do repasto sanguíneo:	14.09.2017
Data do confinamento:	15.09.2017
Cepa agente inoculado:	<i>L. braziliensis</i> 15280

ID Fêmea	Data da dissecação	Espécie	Infecção	
1B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
2B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
3B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
4B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
5B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
6B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
7B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
8B			☒ Com infecção	☐ Sem infecção
9B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
10B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
11B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
12B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
13B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
14B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
15B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
16B			☐ Com infecção	☒ Sem infecção
17B			☒ Com infecção	☐ Sem infecção

Fonte: LESP/ Flebotomíneos (2017).

Fig. 10. Fotografia de frasco de acrílico para individualizar e manter vivas as fêmeas a serem anestesiadas e dissecadas.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 11. Fotografia de caixa de isopor contendo os frascos com fêmeas de flebotomíneos a serem anestesiadas. Observe as placas de gelo: uma abaixo do frasco e outra na lateral.

Fonte: Mansour (2018).

Fig.12. Ilustração do frasco com a fêmea para ser anestesiada utilizando éter.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 13. Fotografia das seringas e agulhas usadas na dissecção ou também para injetar o álcool 100% nas lâminas e lamínulas, para acomodar as leishmanias nos microtubos, para futuras análises moleculares.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 14. Fotografia do soro fisiológico 0,9% aliquotado em pequenas porções para evitar a contaminação do produto e das amostras que serão examinadas.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 15. Fotografia da pesquisadora paramentada com equipamentos de biossegurança durante a dissecação. Observa-se seringas a serem descartadas corretamente após uso.

Fonte: Mansour (2018).

4.3. PROCEDIMENTOS DA DISSECÇÃO E REGISTRO DOS DADOS

Sob a lupa (microscópio estereoscópico), observa-se a morfologia da fêmea (Fig.16) e do macho (Fig. 17). A dissecção da fêmea tem início com a ajuda de dois estiletes entomológicos: um deles serve para fixar o tórax, apoiando-o próximo à implantação da asa e o outro, para cortar as asas em suas bases e removê-las (Fig.18). A seguir, fixa-se um estilete nas pernas e com o outro as separa do corpo, na altura do trocânter (Fig. 19). Alternativamente, pode-se iniciar a dissecção, separando a cabeça do cervix para depois retirar as asas e pernas (Fig. 20). Com um dos estiletes fixado na região do cervix (pescoço), faz-se um corte na ligação deste com a cabeça, e esta é afastada (Fig. 20).

A seguir, um dos estiletes é posicionado com pequena inclinação, fixando o escudo ou escutelo na lâmina; alternativamente, o estilete pode ser fixado nas coxas. O outro estilete, com pequena inclinação (quase horizontal), é posicionado entre 7º e 8º tergito abdominal. Com movimento de leve tração separa-se a parte terminal do abdômen do resto do corpo, puxando juntos o trato digestório e ovários, quando os ovos não estão desenvolvidos. Se houver ovos maduros, o ovário pode se romper e os ovos começam a sair do abdômen antes da completa exposição do tubo digestório; para eliminar todos os ovos são feitos movimentos com leve pressão no abdômen (Fig.21). Após a expulsão dos ovos, ainda com o estilete mantendo-se fixo no mesonoto/coxa, e o outro, localizado no 8º tergito, fazer movimento de leve tração neste estilete em sentido posterior.

Quando se visualiza o intestino posterior, iniciar também movimento de leve tração com o estilete fixo no tórax/coxa, mas em sentido anterior. Com isto facilita a exposição completa do tubo digestório (Fig. 22). Para evitar que a parte torácica do tubo digestório se separe da parte abdominal e fique dentro do tórax, é recomendável que a ponta do estilete esteja apoiada no mesonoto ou na coxa. A ilustração do esquema do aparelho digestório encontra-se na figura 23.

A síntese do processo da dissecção em laboratório encontra-se no quadro 2, com ilustrações nas figuras de 16 a 23. O quadro 2 ilustra o processo de dissecção de fêmeas de flebotomíneos, e situações em que ocorrem dificuldades, com possíveis soluções para atenuá-las.

Na dissecação podem surgir dificuldades para a exposição adequada do tubo digestório. Para superar essas dificuldades são propostas soluções, conforme quadro 2.

Quadro 2: Processo de dissecação de fêmeas de flebotomíneos. Situações em que ocorrem dificuldades na dissecação e possíveis soluções.

Dificuldades da dissecação	Possíveis soluções
Fêmea despertando da anestesia	<ul style="list-style-type: none"> - Respeitar o tempo da anestesia. - Rapidez do pesquisador no procedimento de dissecação.
Fêmea desliza na gotícula de solução fisiológico	<ul style="list-style-type: none"> - Retirar o excesso de soro com um pedaço de papel toalha ou papel de filtro. - Dosar a quantidade de solução fisiológica com uma seringa de 1 ml.
Fêmea grávidas	<ul style="list-style-type: none"> - Retirar, cuidadosamente, os ovos para fora do corpo com o auxílio dos estiletes.
Ruptura do aparelho digestório durante o processo de dissecação	<ul style="list-style-type: none"> - Durante o processo inicial da dissecação, pressionar moderadamente o 8º segmento abdominal sobre a lâmina. - Caso haja ruptura, retirar o restante do trato digestório distendendo o local da ruptura
Exposição do trato digestório incompleto	<ul style="list-style-type: none"> - Apoiar o estilete de retirada do trato digestório em um ângulo de aproximadamente 45° na altura do 8º segmento, distender este vagarosamente em movimento contínuo. - Usar estiletes em bom estado de conservação (bem fixado no palito de madeira).

Fonte: Mansour et al. (2018).

Fig. 16. Microfotografia da morfologia da fêmea de flebotomíneo, em vista lateral.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 17. Microfotografia da morfologia do macho de flebotomíneo, em vista lateral.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 18. Microfotografia do início da dissecação para retirada das asas. Observar a localização dos dois estiletes: um segurando na base das asas e o outro cortando-as.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 19. Microfotografia da dissecação das pernas. Um estilete segura as coxas e o outro para a retirada das pernas.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 20. Fotografia das asas, pernas e cabeça removidas.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 21. Microfotografia dos ovos de flebotomíneos removidos.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 22. Microfotografia da retirada do tubo digestório.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 23. Ilustração do esquema do aparelho digestório da fêmea do flebotomíneo. Adaptado de Lainson e Shaw, 1987.

Adaptado de Lainson e Shaw, 1987.

Fonte: Mansour (2018).

4.4. OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA E REGISTRO DOS DADOS

No final da dissecação, cobre-se o tubo digestório juntamente com parte terminal do abdômen com uma lamínula. Então, a lâmina é levada ao microscópio para observação a aumento de 200x ou 400x.

A pesquisa por flagelados deve ser feita ao longo do tubo digestório, parte torácica e abdominal. Nesta, na região anterior e posterior do piloro (pós-piloro). Isto para ver se se trata de flagelados com comportamento **suprapilárico** (presentes no intestino torácico e abdominal anterior ao piloro) ou **peripilárico** (presentes no intestino torácico e abdominal, neste, nas partes anterior e posterior ao piloro). Flagelados com comportamento suprapilárico sugere infecção por *Leishmania* do subgênero *Leishmania* (ex. *L. infantum* e *L. amazonensis*) e com comportamento peripilárico por leishmanias do subgênero *Viannia* (ex. *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lindenbergi*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi*).

Quando existirem flagelados, o material deverá ser acondicionado para futuros testes moleculares para a identificação da espécie do parasita, em microtubo esterilizado de 1,5ml. A lamínula deve ser levantada da lâmina com a ajuda de uma pinça de ponta fina. Segurando o microtubo com a tampa aberta, posicionar a lamínula num ângulo de 45° (grau) e com a ajuda de uma pipeta esterilizada ou agulha acoplada a seringa contendo álcool isopropílico 100%, pinga-se aos poucos na lamínula, até que o conteúdo se mova inteiro para o microtubo. Repetir o mesmo processo com a lâmina, no mesmo tubo. Identificar o microtubo fechado e acompanhar as mesmas anotações em fichas com essa finalidade. Conservar no congelador para posterior teste molecular e confirmação da espécie do parasita. Para evitar contaminação entre os espécimes, toda vez que se dissecar um inseto, os estiletes e pinças utilizados devem ser mergulhados em água destilada, e após, mergulhados numa solução de hipoclorito de sódio (2,0 % a 2.5%) e secar com papel toalha.

No caso de dissecação com a finalidade de realizar o PCR aconselha-se usar agulhas 6 mm x 0,45 mm acopladas as seringas de 1 ml cada, para depois descartá-las (Fig. 13).

Quando a dissecação é feita até o terceiro dia pode-se observar formas flageladas no meio do sangue em digestão. O inseto estava no processo digestório e os flagelados foram encontrados em resíduo de sangue no interior do intestino médio das fêmeas.

Após este período, a degradação do sangue praticamente se completa e os flagelados podem ser vistos no intestino médio torácico e abdominal. Se o intestino se romper, eles podem ser vistos fora deste também.

A morfologia das leishmanias se modifica no trato digestório do vetor, conforme a maturidade até se transformar na forma infectante para o vertebrado diferindo entre si pela forma do corpo e flagelo (BATES et al., 2018; ROGERS et al., 2002) conforme descrito a seguir:

- 1- Amastigotas: formas ovóides sem flagelo aparente, ingeridas pelo vetor através do sangue infectado do mamífero. Desaparecem totalmente depois de dois dias.
- 2- Promastigotas procíclicas: comprimento do corpo maior que o flagelo. Nessa fase, o flagelo inicia o movimento e ocorre a formação de rosetas. Após 24 horas, 35% das amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas e após dois dias, 83% são promastigotas procíclicas. Localização: intestino médio abdominal.
- 3- Promastigotas nectomonas: corpo mais cheio e mais alongado que todas as formas descritas do parasita; flagelo de comprimento variável. Após três dias, 79% se transformam em nectomonas. Localização: intestino médio abdominal.
- 4- Promastigotas leptomonas: corpo de tamanho variado, mas o flagelo geralmente é duas ou mais vezes mais longo que o corpo. No quarto dia, 54% a 56% se transformam em metacíclicas. Localização: intestino médio abdominal e torácico.
- 5- Promastigotas haptomonas: corpo e flagelo curtos. Localização: geralmente presos à válvula estomodeal. Localização: intestino médio torácico e anterior.
- 6- Promastigotas metacíclicas infectantes: comprimento do corpo pequeno e mais estreito que o do leptomonas; comprimento do flagelo é cerca de três vezes o comprimento do corpo. Localização: intestino médio torácico e anterior, em meio à matriz de gel secretada pelas promastigotas.

Para identificação morfológica das espécies de flebotomíneos são utilizados caracteres da cabeça, tórax e, sobretudo das genitálias (figuras 24 a 29).

Na observação do tubo digestório (figuras 30 a 33), as promastigotas podem se manifestar como nas figuras 34 a 38. Comumente são observados alguns microrganismos que podem ser confundidos como flagelados de tripanossomatídeos, tais como bactérias que formam colônias de tamanho relativamente grande, que em movimento aparecem como se tivessem flagelo (figura 39 A).

Às vezes, pode ocorrer no abdômen infecção por gregarinas, *Psychodiella chagasi* (figura 39 B) ou infestação por nematoides (figuras 40 A e B).

Paramentos e equipamentos utilizados como medidas de biossegurança no laboratório, podem ser vistos na figura 41.

Fig. 24. Microfotografia da espermateca da *Pintomyia fischeri*.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 25. Microfotografia da espermateca de *Pintomyia fischeri*, com esquema adaptado de Galati (2003). As glândulas da espermateca destruídas no processo de clarificação (GALATI, 2003), aparecem nessa ilustração (seta vermelha).

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 26. Microfotografia da espermateca da *Nyssomyia neivai*, com esquema adaptado de Galati, 2003. Os corpos das espermateca são bem visíveis (setas vermelhas).

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 27. Microfotografia da porção posterior do abdômen de fêmea de *Nyssomyia whitmani*, mostrando o final do intestino posterior, espermatecas, folículos ovarianos, glândulas acessórias, furca genital, cercos e oitavo tergito.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 28. Microfotografia da espermateca da *Pintomyia monticola*. A furca genital com uma reentrância da câmara genital em direção à furca (seta pontilhada); Duto comum atinge o nível do ápice da furca (seta contínua).

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 29. Microfotografia da espermateca da *Pintomyia monticola* com esquema adaptado de Galati, 2003.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 30. (A e B) Microfotografias do intestino de fêmeas de flebotomíneos.

Fonte: Mansour (2018).

Fonte: LESP/ Flebotomíneos (2018).

Fig. 31. Microfotografia do intestino médio torácico de fêmea de flebotomíneo.

Fonte: LESP/ Flebotomíneos (2018).

Fig. 32. Microfotografia do intestino médio abdominal de fêmea de flebotomíneo.

Fonte: LESP/ Flebotomíneos (2018).

Fig. 33. Microfotografia do intestino posterior de fêmea de flebotomíneos.

Fonte: LESP/ Flebotomíneos (2018).

Fig. 34. Microfotografia de flagelados no trato digestório abdominal de fêmea ingurgitada, com destaque aumentado nos retângulos em negro.

Fonte: Mansour (2018)

Fig. 35. (A, B e C) Microfotografias das formas flageladas no trato digestório com sangue parcialmente digerido.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 36. Microfotografia das formas promastigotas agrupadas em forma de rosetas (setas).

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 37. (A, B e C) Microfotografias das formas promastigotas (setas).

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 38. (A, B e C) Microfotografias das formas promastigotas agrupadas na válvula estomodeal do intestino médio torácico (setas).

Fonte: Mansour (2018).

Fonte: Galvis-Ovallos (2018).

Fig. 39. Microfotografias do trato digestório de fêmea de *Lutzomyia longipalpis*. (A) Presença de bactérias. (B) Presença de gregarinas.

Fonte: Mansour (2018).

Fig. 40. (A e B) Microfotografias de nematoide.

Fonte: Mansour (2018).

5. BIOSEGURANÇA DURANTE A INVESTIGAÇÃO

Após cada dissecação, as seringas desencapadas são devidamente descartadas com as lâminas e as lamínulas no descarte biológico infectante.

A realização da dissecação, manipulação dos insetos, observação microscópica, documentação por fotografia ou filmes, devem ser realizadas com segurança para pesquisador e para o ambiente da pesquisa.

Evitar a entrada dos insetos; usar os equipamentos de proteção individual: jaleco com punho bem fechado e coberto pelo uso das luvas descartáveis, sapatos fechados e cabelo preso.

A higienização das mãos do pesquisador deve ser realizada antes e depois das tarefas de pesquisa.

6. INSTALAÇÕES FÍSICAS DO LABORATÓRIO

É de suma importância instalar armadilhas tipo CDC dentro de cada ambiente, onde existe insetos, sejam infectados ou não, devido à possibilidade de escapar um inseto ou outro. Paredes, painéis divisórios devem ser de acabamento liso, para facilitar a limpeza, a descontaminação e a visão, preferencialmente de cor branca. As portas sempre bem fechadas, as janelas também, para manter a temperatura para os insetos e a segurança para os pesquisadores. Deve-se ter caixa para descarte correto, com indicação do risco biológico e objetos perfurocortantes, como na figura 41.

Fig. 41. Fotografia mostrando uma armadilha CDC ligada, 24 horas, para a captura de insetos que podem escapar durante os procedimentos.

Fonte: Mansour (2018).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, n. 5, e35671, 2012.

BATES, P. A. Revising *Leishmania's* life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529-530, May 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, DF, 2017.

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf> Acesso em 8 de junho de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015**. Brasília, DF, 2016.

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Casos.pdf>> Acesso em 1 dezembro de 2016.

GALATI, E. A. B. et al. Attractiveness of Black Shannon Trap for Phlebotomines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 641-647, Jul. 2001.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel E.F., Lainson R, editors. **Flebotomíneos do Brasil**. 368 pp. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. 2003. p. 53-165.

GALATI, E. A. B. et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province – 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 311– 321, 2010.

GALATI, E. A. B. et al. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite**, v. 24, Jul 2017.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 901-909, Oct 2016.

PAIVA, B. R. et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, Oct 2006.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, p. 495-507, May 2002.

SAVANI, E. S. et al. 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, n. 1-2, p. 18-24, Mar 2009.

SHANNON, R. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, p. 131-148, 1939.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dissecação com intuito de retirar o aparelho digestório e observar as formas flageladas não é tarefa fácil de executar. Como resultado desse mestrado profissional, o manual apresentado aborda aspectos sobre coleta, manutenção e dissecação dos insetos, de modo a propiciar a investigação de infecção natural por flagelados. Este aspecto é de relevância para os programas de controle de leishmaniose no sentido de identificar áreas de transmissão dessas doenças. Com as descrições e ilustrações das etapas do processo de dissecação, pretende-se também auxiliar estudantes, pesquisadores e técnicos da área da saúde nessa atividade de dissecar, para que avancem na pesquisa no sentido de ampliar informações que permitam apontar vetores de *Leishmania* spp., por meio de estudos sobre a interação parasita/vetor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALENCAR, J. E. Aspectos clínicos do calazar americano. **Revista Brasileira de Malária e Doenças Tropicais**, v.1, n. 11, p. 19- 44, 1959.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, n. 5, e35671, 2012.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v.105, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ARRIVILLAGA, J. et al. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 615-27, Sep 2003.
- AZULAY, R. D. Classificação clínico-imunopatológica da leishmaniose. **Anais Brasileiros de dermatologia**, v. 52, p. 345-351, 1977.
- BADARÓ, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.154, n. 4, p. 639-649, 1986.
- BARRAL, A. et. al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
- BATES, P. A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529-530, May 2018.
- BATES, P. A. et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites and Vectors**, v. 8, p. 131, 2015.
- BERLIN, C. Leishmaniasis recidiva cutis; leishmanid. **Archives of Dermatology and Syphilology**, 41(5), 874–886, 1940.
- BOAVENTURA, V. S. et al. Short report: Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 2, p. 267-269, Aug 2006.
- BORGES, D. A. 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**, v. 54, n. 5, p. 1425-1429, Sep 2017.
- BRASIL, Ministério da Saúde, **Guia de vigilância epidemiológica**, Brasília, DF, 2002.
<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia_vig_epi_vol_11.pdf> Acesso em 8 de junho de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2006.

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer al.pdf> Acesso em 1 dezembro de 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Educação em saúde. Diretrizes**. Brasília, DF, 2007.

<http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/dir_ed_sau.pdf> Acesso em 8 de junho de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, DF, 2017.

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf> Acesso em 8 de junho de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 5ª reimpressão**. Brasília, DF, 2014.

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer al_1edicao.pdf> Acesso em 8 de junho 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015**. Brasília, DF, 2016.

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Casos.pdf>> Acesso em 1 dezembro de 2016.

BRILHANTE, A. F. et al. Attractiveness of black and white modified Shannon traps to phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in the Brazilian Amazon Basin, an area of intense transmission of American cutaneous leishmaniasis. **Parasite**, v. 24, Jun 2017.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315-325, Apr 1994.

CAVALCANTE, M. H. **Leishmaniose visceral Americana: aspectos clínicos e laboratoriais preditivos de prognóstico**. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza: 2007.

CONVIT, J.; LAPENTA, P. Sobre um caso de leishmaniasis tegumentaria de forma disseminada. **Revista de la Policlínica Caracas**, v. 10, n. 100, p. 153-158, 1948.

COSTA, A. A. et al. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Acta Tropica**, v. 96, n. 1, p. 9-15, Oct 2005.

COSTA, J. M. L. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil - a report of 8 cases. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 319-323, Dec 1986.

COUPPIE, P. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: Case of a patient with 425 lesions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 558-560, Nov 2004.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142-144, Apr 2000.

SILVA, D. S. Leishmaniose anérgica hansenóide. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 53, n. 2, 1978.

DESTOMBES, P. [Application of the concept of "polar classification" to cutaneous leishmaniasis]. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et des ses filiales**, v. 53, p. 299-301, 1960 Mar-Apr 1960.

DINIZ, M. M. et al. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 139, Mar 2014.

DISCH, J. et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 3, p. 185-190, Mar 2005.

DOSTALOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, Dec 2012.

DUARTE, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G., editor **Bogliolo Patologia**. 6º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 1215-1275.

ENDRIS, R. G.; YOUNG, D. G.; BUTLER, J. F. The laboratory biology of the sand fly *Lutzomyia anthophora* (Diptera, Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 21, n. 6, p. 656-664, 1984.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, Apr 2018.

FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 109-112, Feb 2010.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica. 4º volume**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. Editora da Universidade de São Paulo, 1973.

GALARDO, A. K. R. et al. Primeira ocorrência de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no estado do Amapá, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 2, p. 5, 2013.

GALATI, E. A. B. et al. Attractiveness of Black Shannon Trap for Phlebotomines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 641-647, Jul. 2001.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel E.F., Lainson R, editors. **Flebotomíneos do Brasil**. 368 pp. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. 2003. p. 53-165.

GALATI, E. A. B. et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province – 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 311– 321, 2010.

GALATI, E. A. B. et al. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite**, v. 24, Jul 2017.

GALVIS-OVALLOS, F. **Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Díptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GALVIS-OVALLOS, F. et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of Sao Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, Jan 2017.

JONES, T. C. et al. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania-braziliensis-braziliensis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 1, p. 73-83, Jul 1987.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KELLY, P. H. et al. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. **Mbio**, v. 8, n. 1, Jan-Feb 2017.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, May-Jun 1999.

KREUTZER, R. D. et al. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp.n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 6, p. 662-675, Jun 1991.

LAINSON, R.; SHAW J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. editors. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. In: COX, FEG; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. editors. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, London, Sydney, Auckland. 2005. Parasitology, p. 313-349.

LAWYER, P. G. et al. Development of *Leishmania-major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera, Psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 1, p. 31-43, Jul 1990.

- MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438-444, Aug 2011.
- MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, Jun 2013.
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ('espundia' Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986.
- MARZOCHI, M.C. de A. et al. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro): estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, n. 3, p. 149-155, 1980.
- MARZOCHI, M.C. de A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, 1992.
- MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10 Supl 2, p. 359-75, 1994.
- MOSCHIN, J. C. et al. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 1, p. 190-201, Mar 2013.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489-93, Mar 2016.
- OLIVEIRA, A. L. et al. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 446-50, 2006 Sep-Oct 2006.
- OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 427-35, 1988 Oct-Dec 1988.
- ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 901-909, Oct 2016.
- OSÓRIO, L. E.; CASTILLO, C. M.; OCHOA, M. T. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia. Clinical characteristics. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 49-52, Jul 1998.
- PAHO Leishmaniasis Epidemiological Report of the Americas, 2016.
<<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-cha-leish-epi-report-americas.pdf>>
Acesso 23 de janeiro 2017.

PAIVA, B. R. et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, Oct 2006.

PEARSON, R.D. Pathology of leishmaniasis. In: KENNETH S. WARREN (Ed.). **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3 ed., Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1993, p. 71-86.

RANGEL, E. F. et al. Flagellates in the malpighian tubules of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* fed on a hamster experimentally infected with *Leishmania mexicana amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 371-2, 1985 Jul-Sep 1985.

RANGEL, E. F. et al. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults]. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 431-8, 1986 Oct-Dec 1986.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Coord.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.

REY, L. C. et al. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 73-8, 2005 Jan-Feb 2005.

RINCÓN, M. Y. et al. [A report of two cases of disseminated cutaneous leishmaniasis in Santander, Colombia]. **Revista de Salud Pública**, v. 11, n. 1, p. 145-50, 2009 Jan-Feb 2009.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, p. 495-507, May 2002.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100-103, Jul 1989.

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

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C.; BISETTO JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 643-5, Oct 2012.

SANTRICH, C. et al. Mucosal disease caused by *Leishmania-braziliensis-guyanensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 1, p. 51-55, Jan 1990.

SARAVIA, N. G. et al. Recurrent lesions in human *Leishmania-braziliensis* infection - reactivation or reinfection. **Lancet**, v. 336, n. 8712, p. 398-402, Aug 1990.

SAVANI, E. S. et al. 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, n. 1-2, p. 18-24, Mar 2009.

SHANNON, R. C. Methods for Collecting and Feeding Mosquitoes in Jungle Yellow Fever Studies1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1-19, n. 2, p. 131-140, 1939.

SHAW, J. et al. Characterization of *Leishmania (Leishmania) waltoni* n.sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3, p. 552-558, Sep 2015.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, May 2004.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 525-534, 2005.

SOUSA, A. D. et al. Bubonic leishmaniasis - a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 4, p. 380-385, Oct 1995.

SOUZA, G. D.; DOS SANTOS, E.; ANDRADE, 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, p. 1181-1182, Dec 2009.

VIEIRA-GONCALVES, R. et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. **International Journal of Dermatology**, v. 47, n. 9, p. 926-932, Sep 2008.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196-206, Mar-Apr 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), **Control of the leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Technical Report Series 949**, Geneva 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), **Small bites, big threats**. 2013,.

<<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/02/Leishmaniasis.pdf>> Acesso em 1 de dezembro 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO **Leishmaniasis** 2013.
<<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>> Acesso em 1 de julho 2018.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

CURRÍCULO LATTES

25/09/2018

Currículo Lattes

Imprimir currículo

Carole El Khoury Mansour Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7602490838644032>

Última atualização do currículo em 25/09/2018

Resumo informado pelo autor

Graduada em Ciências Biológicas pela Université Libanaise (1990), mestre em Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP), concluído em 2018. Especialista em Liderança por valores pela Escola de Educação Permanente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (EEP/HC/FM/USP). Experiência em docência para o ensino médio na área de ciências biológicas, bem como na área laboratorial de Biologia Geral, com ênfase em fisiologia. Atualmente, trabalha com entomologia médica, com ênfase em flebotomíneos, e vigilância e controle de doenças zoonóticas. Fala e escreve bem árabe, francês, inglês e português.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Carole El Khoury Mansour

Dados pessoais

Nascimento 05/09/1967 - Líbano

CPF 212.891.138-10

Formação acadêmica/titulação

- 2016 - 2018** Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública.
Faculdade de saúde pública FSP-USP, FSP-USP, Brasil
Título: Investigação e documentação de flagelados no tubo digestório de flebotomíneos, Ano de obtenção: 2018
Orientador: Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati
- 2013 - 2014** Especialização em Especialização em Liderança- liderando por valores.
Escola de Educação Permanente do Hospital das Clínicas da FMUSP, EEP/ HC/ FMUSP, Brasil
Título: Novas formas de organizar o empreendimento humano: PAZ
Orientador: Dr. Marcos Boulos/ Waldir Cedotti/ Guilherme Boulos
- 1985 - 1990** Graduação em Bacharel em ciências biológicas.
Université Libanaise, UL, Líbano

Formação complementar

- 2016 - 2016** II curso de doenças tropicais negligenciadas e outras doenças de interesse...
Instituto de Infectologia Emílio Ribas, EMILIORIBAS, São Paulo, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em curso teórico- prático: Técnicas para falar em público.
Sepac - Paulinas, SEPAC, Brasil
- 2015 - 2015** Extensão universitária em Introdução à Imunologia.
Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2014 - 2014** Treinamento de biossegurança.
Instituto de Medicina Tropical - USP, IMT - USP, Brasil
- 2014 - 2014** Extensão universitária em Bases teóricas e metodológicas para a escota científica.
Faculdade de saúde pública FSP-USP, FSP-USP, Brasil
- 2014 - 2014** Extensão universitária em Saúde Global.
Faculdade de saúde pública FSP-USP, FSP-USP, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em O que fazer em caso de acidentes por animal peçonhento.
Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2014 - 2014** Extensão universitária em Tópicos avançados em Herpetologia: Anatomia, fisiologia e manutenção de ser.
Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Introdução a microscopia nas ciências biológicas.
Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Coleta, montagem e identificação de insetos...
Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Usos da base de dados de censo demográfico...
Faculdade de saúde pública FSP-USP, FSP-USP, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Sustentabilidade da Saúde Universal. Debates e estratégias.
Faculdade de saúde pública FSP-USP, FSP-USP, Brasil
- 2004 - 2004** Extensão universitária em Parapsicologia e Religião. (Carga horária: 110h).
Centro Latino Americano de Parapsicologia, CLAP, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de saúde pública FSP-USP - FSP-USP

Vínculo institucional

2016 - Atual Vínculo: mestranda, Enquadramento funcional: Aluna, Regime: Dedicção exclusiva

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 25/09/2018 às 19:44:13.

Eunice Aparecida Bianchi Galati

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1C

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1359035734723864>
Última atualização do currículo em 20/06/2018

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1977), graduação em Ciências pela Universidade de São Paulo (1976), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1981) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1990). Atualmente é professor associado no Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Coordena o Curso de Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública. É membro da Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Saúde Pública e da Comissão de Coordenação do Curso de Bacharelado em Saúde Pública. Tem experiência no ensino de graduação e pós-graduação em Epidemiologia e em Zoologia, com ênfase em Entomologia em Saúde Pública, atuando principalmente nos seguintes temas: Phlebotominae, Psychodidae, leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral taxonomia e vetores É líder do grupo de Pesquisa: taxonomia e ecologia de vetores de leishmanioses. Atualmente desenvolve projetos sobre avaliação de parâmetros que medem a capacidade vetorial de algumas espécies de flebotomíneos em relação à Leishmania braziliensis e Leishmania infantum. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Eunice Aparecida Bianchi Galati
Nome em citações bibliográficas	GALATI, E. A. B.;Galati, E.A.B.;Galati, Eunice A. B.;GALATI, EUNICE A.B.;BIANCHI GALATI, EUNICE APARECIDA;EUNICE APARECIDA GALATI;GALATI, EUNICE AB;GALATI, EUNICE APARECIDA;GALATI, EUNICE APARECIDA BIANCHI;GALATI, E.A.B;GALATI, E A B;GALATI, EUNICE A B

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617786 Fax: (11) 30617926
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

1983 - 1990	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Sistemática dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas, Ano de obtenção: 1990. Orientador: Ubirajara Ribeiro Martins de Souza. Palavras-chave: Sistemática; Psychodidae; Taxonomia; Phlebotominae; Diptera. Grande área: Ciências Biológicas Setores de atividade: Saúde Humana.
1979 - 1981	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aspectos taxonômicos e biogeográficos do gênero Psychodopygus Mangabeira, 1941 e sua importância epidemiológica (Diptera, Phlebotominae).Ano de obtenção: 1981. Orientador: Oswaldo Paulo Forattini. Palavras-chave: Taxonomia; Biogeografia; Diptera; Phlebotominae; Psychodopygus. Grande área: Ciências Biológicas Setores de atividade: Saúde Humana.
1978 - 1978	Especialização em Curso de Especialização Em Saúde Pública. (Carga Horária: 978h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
1972 - 1977	Graduação em Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
1972 - 1976	Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
1970 - 1970	Curso técnico/profissionalizante em Epidemiologia Médico Entomológica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Livre-docência

2008	Livre-docência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, Ano de obtenção: 2008. Palavras-chave: cavernas; dispersão; Ecologia de vetores; Fauna flebotomínea; Leishmanioses; ambiente antrópico. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Taxonomia dos Grupos Recentes / Especialidade: Entomologia Médica. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Ecologia / Subárea: Ecologia de Vetores. Setores de atividade: Saúde e Serviços Sociais.
-------------	--

Formação Complementar

1990 - 1990	Extensão universitária em Metodologia Epidemiológica Unidade II. (Carga horária: 40h). Faculdade de Saúde Pública, FSP, Brasil.
1986 - 1986	Extensão universitária em Epidemiologia Clínica. (Carga horária: 30h). Faculdade de Saúde Pública, FSP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.	
Vínculo institucional 2013 - Atual	Vínculo: , Enquadramento Funcional:
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil.	
Vínculo institucional 2012 - Atual	Vínculo: , Enquadramento Funcional:
Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Brasil.	
Vínculo institucional 2011 - Atual	Vínculo: , Enquadramento Funcional:
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.	
Vínculo institucional 2008 - Atual	Vínculo: , Enquadramento Funcional: PROFESSOR ASSOCIADO, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.
Vínculo institucional 1990 - 2008	Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professor Doutor, Carga horária: 0, Regime: Dedicção exclusiva.
Vínculo institucional 1981 - 1990	Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Professor Assistente, Carga horária: 0
Vínculo institucional 1978 - 1981	Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Ensino, Carga horária: 0
Vínculo institucional 1977 - 1978	Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Preparador em Entomologia, Carga horária: 0, Regime: Dedicção exclusiva.
Vínculo institucional 1970 - 1977	Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Técnico de Laboratório, Carga horária: 0, Regime: Dedicção exclusiva.
Atividades 2/2001 - Atual	Direção e administração, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia. Cargo ou função Suplente da categoria Professor Doutor junto ao conselho deste departamento.