

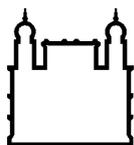
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Vigilância e Controle de Vetores –
PGVCV

LEVANTAMENTO DA FAUNA E INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP EM
FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) NA LOCALIDADE DE
CATIMBAU GRANDE MUNICÍPIO DE RIO BONITO ESTADO DO RIO
DE JANEIRO

ELAINE SANTANA MENDONÇA

Rio de Janeiro
Janeiro de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em "Vigilância e Controle de Vetores – PGVCV"

ELAINE SANTANA MENDONÇA

Levantamento da fauna e infecção por *Leishmania* spp em flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Catimbau Grande município de Rio Bonito estado do Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Vigilância e Controle de Vetores.

Orientador (es): Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Prof. Dr^a. Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2022

Santana Mendonça, Elaine .

Levantamento da fauna e infecção por *Leishmania spp* em flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Catimbau Grande município de Rio Bonito estado do Rio de Janeiro. / Elaine Santana Mendonça. - Rio de Janeiro, 2022.

60 f.; il.

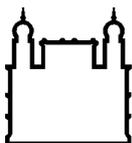
Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 2022.

Orientador: Reginaldo Peçanha Brazil.

Co-orientadora: Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Levantamento. 2. Fauna. 3. Flebotomíneos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

AUTOR: ELAINE SANTANA MENDONÇA

LEVANTAMENTO DA FAUNA E INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP EM FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) NA LOCALIDADE DE CATIMBAU GRANDE MUNICÍPIO DE RIO BONITO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Prof. Dr^a. Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues**

Aprovada em: 25/01/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Maurício Luiz Vilela - Presidente (IOC)

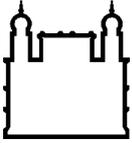
Prof. Dr. Gabriel Eduardo Melim Ferreira (Fiocruz-RO)

Prof. Dr^a. Vanderleia Cristina de Oliveira (SESA-RJ)

Prof. Dr. Israel de Souza Pinto (IFPA)

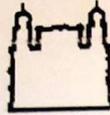
Prof. Dr^a. Thaís de Araújo Pereira (IOC)

Rio de Janeiro, 25 de janeiro de 2022



Ministério da Saúde

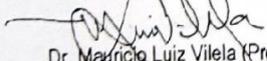
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

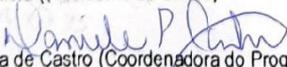


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado profissional em Vigilância e Controle de Vetores de Elaine Santana Mendonça, sob orientação do Dr. Reginaldo Peçanha Brazil e coorientada pela Dr^a. Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues. Ao vigésimo quinto dia do mês de janeiro de dois mil vinte e dois, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado profissional intitulada: "**Levantamento da fauna e infecção por *leishmania spp* em flebotomíneos (díptera: psychodidae) na localidade de Catimbau-Grande município de Rio Bonito estado do Rio de Janeiro.**", no programa de Pós-graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Vigilância de Vetores, na linha de pesquisa: Epidemiologia e vigilância de vetores. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Mauricio Luiz Vilela – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Gabriel Eduardo Melm Ferreira – FIOCRUZ/RO, Dr^a. Vanderleia Cristina de Oliveira – SES/RJ e como suplentes: Dr. Israel de Souza Pinto - IFPA/PA e Dr^a. Thais de Araujo Pereira - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela ~~aprovacao~~ *aprovacao* da defesa da dissertação de mestrado profissional. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr^a. Daniele Pereira de Castro, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 25 de janeiro de 2022.


Dr. Mauricio Luiz Vilela (Presidente da Banca)


Dr^a. Daniele Pereira de Castro (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Scanned by TapScanner

Dedico este trabalho ao meu esposo
Alexandre e as minhas filhas Lorena e
Jéssica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Deus, o Grande incentivador que nos momentos mais difíceis sempre esteve ao meu lado me fortalecendo e indicando o melhor caminho a seguir, sem Ele certamente não teria chegado ao final desta etapa da minha vida;

Ao meu esposo e colaborador Alexandre, minhas filhas Lorena e Jéssica, minha família, que sempre estiveram ao meu lado, e que juntos formaram os pilares que me apoiaram;

A minha amiga e chefia direta Cristina Maria Giordano, pela confiança ao permitir minhas ausências no setor de trabalho;

Ao meu orientador, Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, pela calma e tranquilidade, pelas sugestões, ensinamentos, oportunidade, pelo acolhimento no seu laboratório e pela amizade. Obrigado por tudo.

À minha co-orientadora, Dr^a. Andressa Alencastre Fuzari pela amizade, carinho e muita paciência, além do grande empenho ao me ajudar na elaboração deste trabalho;

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, que sempre estiveram presentes, numa só corrente, em especial ao meu colega/amigo José Carlos, pelas caronas no retorno à Rio Bonito;

Ao Dr. Cristian Ferreira de Souza, pela paciência e auxílio na obtenção dos dados para detecção de PCR;

Ao casal Claudinei e Eliane Antunes pelo acolhimento em sua propriedade “Sítio Nossa Senhora Aparecida-Catimbau Grande-Rio Bonito-RJ”, local onde foi realizado o estudo;

Ao Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz pelo suporte na realização deste trabalho;

À coordenação do Programa de Mestrado Profissional em Vigilância e Controle de Vetores (PGVCV), seus professores e pesquisadores pelos preciosos ensinamentos e conselhos dispensados.

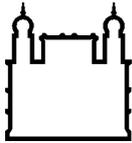
Aos funcionários do Pavilhão Arthur Neiva, pela atenção;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, essa conquista é nossa!

“Aqueles que passam por nós,
não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um
pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

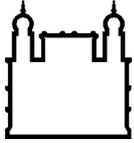
LEVANTAMENTO DA FAUNA E INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP EM FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) NA LOCALIDADE DE CATIMBAU GRANDE MUNICÍPIO DE RIO BONITO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM VIGILÂNCIA E CONTROLE DE VETORES

Elaine Santana Mendonça

As leishmanioses (tegumentar e visceral) são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* apontadas como doenças negligenciadas. São endêmicas em 98 países e consideradas neste contexto como um grande problema de saúde pública global. Fatores como desmatamento, migração e urbanização desordenada alteram os habitats dos flebotomíneos, além de provocar a mudança e distribuição de hospedeiros e reservatórios em seus nichos originais. O conhecimento da biologia dos flebotomíneos e o estudo da sua presença em determinada área é de extrema importância para elucidar a epidemiologia local da doença. O objetivo do estudo foi realizar um levantamento da fauna flebotomínica e o diagnóstico de infecção natural de fêmeas de flebotomíneos por *Leishmania* spp. A área de estudo foi Catimbau Grande, um povoado do município de Rio Bonito no Estado do Rio de Janeiro. Os insetos foram capturados com armadilhas luminosas HP (tipo CDC) instaladas aproximadamente a 1m do solo no peridomicílio e no extradomicílio, no período de janeiro a julho de 2019, as capturas foram realizadas a cada 15 dias em média. Foram registrados em fichas de campo dados como altitude, temperatura, umidade e fase lunar. No laboratório foi realizada a triagem dos insetos capturados e os flebotomíneos separados para montagem em lâmina e identificação. Foram identificados 157 flebotomíneos (67 fêmeas e 90 machos), duas espécies foram identificadas: *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia migonei*. Nenhuma das fêmeas analisadas para infecção natural apresentou positividade para *Leishmania* spp.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

FAUNA SURVEY AND *LEISHMANIA* SPP INFECTION IN PHLEBOTOMINEES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) IN THE LOCATION OF CATIMBAU GRANDE MUNICIPALITY OF RIO BONITO STATE OF RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN VIGILÂNCIA E CONTROLE DE INSETOS

Elaine Santana Mendonça

Leishmaniasis (tegumentary and visceral) are anthroponosis caused by protozoa of the genus *Leishmania* identified as neglected diseases. They are endemic in 98 countries and considered in this context as a major global public health problem. Factors such as deforestation, migration and disorderly urbanization alter the sandfly habitats, in addition to causing the change and distribution of hosts and reservoirs in their original niches. Knowledge of the biology of sandflies and the study of their presence in a certain area is extremely important to elucidate the local epidemiology of the disease. The aim of the study was to carry out a survey of the sandfly fauna and the diagnosis of natural infection of female sandflies by *Leishmania* spp. The study area was Catimbau Grande, a village in the municipality of Rio Bonito in the State of Rio de Janeiro. Insects were captured with HP light traps (CDC type) installed approximately 1m from the ground in the peridomicile and extradomicile, from January to July 2019, the captures were carried out every 15 days on average. Data such as altitude, temperature, humidity and moon phase were recorded in field records. In the laboratory, the selection of captured insects and the sandflies separated for slide mounting and identification was performed. A total of 157 sand flies were identified (67 females and 90 males), two species were identified: *Nyssomyia intermedia* and *Migonemyia migonei*. None of the females analyzed for natural infection showed positivity for *Leishmania* spp.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1.INTRODUÇÃO	18
1.1.Flebotomíneos	19
1.1.1.Biologia e morfologia dos flebotomíneos	19
1.1.2.Taxonomia dos flebotomíneos	27
1.1.3.Importância epidemiológica dos flebotomíneos	29
1.2.Agente etiológico das leishmanioses	29
1.3.Leishmanioses	32
1.3.1.Leishmaniose visceral	33
1.3.2.Leishmaniose tegumentar americana	34
1.4.Justificativa	36
2.OBJETIVOS	37
2.1.Objetivo Geral	37
2.2.Objetivos Específicos	37
3.MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1.Descrição da área de estudo	38
3.2.Captura e montagem dos flebotomíneos coletados	40
3.3.Georreferenciamento	43
3.4.Obtenção dos dados climáticos	44
3.5.Detecção de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp em flebotomíneos por reação em cadeia da polimerase	44
4.RESULTADOS	47
4.1.Resultado da infecção natural por <i>Leishmania</i> spp	51
5.DISSCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Árvore de raiz tabular, potencial abrigo natural dos flebotomíneos, possíveis vetores dos agentes etiológicos das leishmanioses. Mangaratiba, RJ. Fonte: Mendonça, 2014. 20
- Figura 2: Ambiente silvestre, característico para o desenvolvimento do ciclo de vida dos flebotomíneos. Grotão, Eucaliptal, Volta Redonda, RJ. Fonte: Mendonça, 2012. 20
- Figura 3: Ambiente peridomiciliar, Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019. 21
- Figura 4: Ovos de flebotomíneos mantidos em colônias (potes de confinamento), no insetário, sob condições ideais para sua criação, no laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ). Fonte: Fuzari, AA. 22
- Figura 5: Larvas de flebotomíneos mantidos em colônias (potes de confinamento), no insetário, sob condições ideais para sua criação, no laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ). Fonte: Barbosa AF. 23
- Figura 6: Pupa de flebotomíneo, em 4^o estágio de desenvolvimento, mantidos em colônias (potes de confinamento), no insetário, sob condições ideais para sua criação, no laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ). Fonte: Fuzari, AA. 24
- Figura 7: Flebotomíneo fêmea da espécie *Phlebotomus. papatasi*. Imagem capturada durante sua alimentação. Fonte: <http://www.sciencephoto.com/media/151983/enlarge>, 2012. 25
- Figura 8: Dimorfismo sexual em flebotomíneos adultos. a, visão geral da morfologia externa da fêmea (esquerda) e macho (direita); b, a seta indica as espermatecas de uma fêmea; c, genitália externa de um macho. Fonte: Fotografias: a Fuzari, AA (IOC/FIOCRUZ); b e c: Barbosa, AF (IOC/FIOCRUZ). 26
- Figura 9: Corte entre os 8 e 9 segmento do abdome de uma fêmea da espécie *Nyssomyia intermedia*, possibilitando a visualização da espermateca. Fonte: Mendonça, ES; Gonçalves, I. 2019. 27

- Figura 10: Formas evolutivas encontradas no ciclo da *Leishmania* spp. Fonte: <https://www.bing.com/images/search>. 30
- Figura 11: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. - Fonte: adaptado de CDC (2015). 31
- Figura 12: Paciente com LV com sangramento, de Kapoeta, Sudão do Sul, 2013. Fonte: © OMS. 34
- Figura 13: Mapa da divisão do Estado do Rio de Janeiro em municípios, destacando a localização do município de Rio Bonito, área onde foi realizado o trabalho. Fonte: <http://www.emater.rj.gov.br/riobonito.asp>. 39
- Figura 14: Sede do Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019. 39
- Figura 15: Armadilha luminosa HP (tipo CDC), modificada de acordo com Fuzari (2011) utilizadas para captura de flebotomíneos. Fonte: Mendonça, 2019. 40
- Figura 16: Marcação dos pontos estabelecidos para coletas (P1, P2 e P3) no Sítio Nossa Senhora Aparecida na localidade de Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Google Earth. 41
- Figura 17: Ponto de coleta P1 (plantação de coqueiros e bananeiras), Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019. 41
- Figura 18: Ponto de coleta P2 (moinho abandonado), Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019. 42
- Figura 19: Ponto de coleta P3 (pequena elevação, sob uma árvore), Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019. 42
- Figura 20: Microtubos de polipropileno (1,5ml) contendo fêmeas para realização da extração de DNA. Fonte: Mendonça, 2019. 44

Figura 21: Realização de centrifugação das promastigotas de <i>Leishmania</i> , durante a preparação do experimento. Fonte: Mendonça, 2019.	47
Figura 22: Percentual de flebotomíneos machos e fêmeas coletados no período de janeiro a julho de 2019, em Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ	47
Figura 23: Percentual de espécies flebotomíneos coletados no período de janeiro a julho de 2019, em Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ.	48
Figura 24: Número de espécimes de flebotomíneos, machos e fêmeas, distribuídos por ponto de coleta, no período de janeiro a julho de 2019 em Catimbau Grande, município de Rio Bonito, RJ.	48
Figura 25: Número de espécimes de flebotomíneos, machos e fêmeas, distribuídos por ponto de coleta, no período de janeiro a julho de 2019 em Catimbau Grande, município de Rio Bonito, RJ	49
Figura 26: Número de flebotomíneos machos e fêmeas, por espécies, distribuídos nos ambientes de coleta (peridomicílio e extradomicílio), no período de janeiro a julho de 2019 em Catimbau Grande, município de Rio Bonito, RJ.	50
Figura 27: Proporção de flebotomíneos capturados durante as fases lunares no período de janeiro a julho de 2019 na localidade de Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ.	50
Figura 28 Proporção de flebotomíneos capturados durante as fases lunares no período de janeiro a julho de 2019 na localidade de Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ.	51
Figura 29: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp em fêmeas de flebotomíneo coletadas em Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ, no período de janeiro a julho de 2019.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de flebotomíneos, por espécies, distribuídos por sexo (fêmeas e machos) coletados no período de janeiro a julho de 2019, em Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Pontos de Coleta.

43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLA	DESCRIÇÃO
CDC	Centers for Disease Control and Prevention.
DNA	Desoxyribonucleic acid.
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz.
GPS	Global Positioning System.
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana.
HP	Hoover Pugedo.
ITS	Internal Transcribed Spacers.
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana.
LV	Leishmaniose Visceral.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PBS	Tampão fosfato-salino.
PCR	Polymerase Chain Reaction.
RNase	Ribonuclease.
WHO	World Health Organization.

1 INTRODUÇÃO.

Os flebotomíneos são insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, e gêneros variados. São conhecidos popularmente, como mosquito palha, birigui, tatuquira, frebóti, entre outros dependendo da posição geográfica. São de pequeno porte medindo de 2 a 3 mm, apresentando em seu corpo intensa pilosidade, sua locomoção é caracterizada pelo voo saltitante e, ao contrário do restante dos dípteros, mantêm suas asas eretas quando em repouso (FORATTINI, 1960). Os primeiros registros de dípteros da subfamília Phlebotominae datam do Cretáceo Inferior (LEWIS, 1974) e o nome foi dado a partir do gênero *Flebotomus* Rondani, 1840. Estes insetos têm sido encontrados em ambientes silvestres (solo florestal e folhas caídas, tronco e raízes de árvores, tocas de animais, rochas ou mesmo dentro dos detritos das fendas rochosas e no chão das cavernas), ambientes domésticos (porões, fendas na parede/chão, sótãos) e peridomésticos (pocilgas, currais, galinheiros) preferindo locais úmidos e sombrios para o seu criadouro ou em detritos ricos em matéria orgânica (FORATTINI, 1960). O que não significa que os flebotomíneos não possam se domiciliar, devemos considerar também a capacidade de adaptação desses insetos a mudanças ambientais, o que os leva cada vez mais perto do homem (FORATTINI, 1960), caracterizando assim a antropofilia.

Algumas espécies de flebotomíneos são envolvidas na transmissão das *Leishmanias*, agentes causadores das leishmanioses (tegumentar e visceral) como: *Nyssomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia wellcomei*, *Nyssomyia umbratilis*, *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi*. (BRAZIL et al, 2015).

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leishmanioses estão situadas entre as seis doenças tropicais de maior relevância mundial. Com relatos de transmissão endêmica, atinge um total de 98 países, entre estes a França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal. Sua incidência vem aumentando para cerca de dois milhões de casos mundiais ao ano (ALVAR et al, 2012). No Brasil, especificamente na região amazônica a incidência das leishmanioses é considerada

muito alta, com novos casos acrescidos anualmente (ALVAR et al. 2006; ALVAR et al. 2012).

1.1. Flebotomíneos.

Scopoli, em 1786 na Itália, descreveu pela primeira vez um flebotomíneo quando reportou a espécie *Bibio papatasi*, alterando sua nomenclatura algum tempo depois para *Phlebotomus papatasi* (DEDET et al., 2003), esta espécie é considerada de amplo interesse em medicina veterinária pois causa problemas sanitários nos continentes Europeu, Asiático e Africano (COLACICCO-MAYHUGH et al., 2010).

Coquillett (1907) descreveu os primeiros flebotomíneos das Américas como *Flebotomus vexator*, do estado de Maryland (USA), e *Flebotomus cruciatus*, de Alta Vera Paz, Guatemala. No Brasil os responsáveis pela primeira descrição de flebotomíneos foram Lutz & Neiva (1912).

1.1.1. Biologia e morfologia dos Flebotomíneos.

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte medindo de 2 a 3 mm, apresentando em seu corpo intensa pilosidade, sua locomoção é caracterizada pelo voo saltitante e, ao contrário do restante dos dípteros, mantêm suas asas eretas quando em repouso (FORATTINI, 1960).

São insetos holometábolos, suas larvas desenvolvem-se e alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo, no entanto a forma adulta (macho e fêmea) se alimenta de açúcares de plantas (carboidratos). Apenas as fêmeas nesta fase se alimentam de sangue sendo tal fato, de vital importância para a maturação dos ovos. (BRAZIL & BRAZIL, 2018)

Os flebotomíneos possuem atividades crepusculares, tipicamente são encontrados em mata (SANTOS-DEMARCO, 1997). Entretanto, com a diminuição das matas nativas, seus habitats naturais foram modificados, sendo assim determinadas espécies que de alguma forma resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais do peridomicílio (GOMES & GALATI, 1986; SANTOS-DEMARCO, 1997).

Os conhecimentos disponíveis sobre os criadouros naturais de flebotomíneos são ainda deficientes face às dificuldades de isolá-los do substrato onde se desenvolvem sendo representado, de maneira geral, pelo solo (FORATTINI, 1960).

Apesar de mencionada escassez sobre os dados de criadouros existentes, podemos apontar que a maioria reporta ao ambiente extradomiciliar silvestre, vivendo preferencialmente no solo, próximos a vegetação em raízes e/ou troncos de árvores, podendo ser encontrados em tocas de animais, rochas, solo florestal e folhas caídas. Gostam de lugares com pouca luz, úmidos, sem vento e que tenham alimento por perto (FORATTINI, 1960). Vale a pena ressaltar, que diferenças na composição específica e abundância relacionadas às faunas flebotomínicas imatura e adulta de bases de árvores indicam criadouros localizados distantes do local de agregação e/ou repouso dos adultos (ALENCAR, 2003). (Figura 1 e figura 2).



Figura 1: Árvore de raiz tabular, potencial abrigo natural dos flebotomíneos, possíveis vetores dos agentes etiológicos das leishmanioses. Mangaratiba, RJ. Fonte: Mendonça, 2014.



Figura 2: Ambiente silvestre, característico para o desenvolvimento do ciclo de vida dos flebotomíneos. Grotão, Eucaliptal, Volta Redonda, RJ. Fonte: Mendonça, 2012.

Em relação ao ambiente domiciliar e peridomiciliar, os flebotomíneos podem ser encontrados em locais como: tronco e raízes de árvores frutíferas e abrigos de animais, como, currais de equinos, bovinos, caprinos, pocilgas e galinheiros e frestas de paredes dos domicílios (FORATTINI, 1960). (Figura 3).



Figura 3: Ambiente peridomiciliar, Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019.

Segundo Scorza et al. (1968a, 1968b, 1968c), a temperatura influi tanto na sobrevivência das formas imaturas quanto nas das adultas, em período seco, a temperatura do biótopo é mais elevada do que a do meio externo. No período chuvoso, quando a temperatura externa se eleva, no biótopo, diminui ligeiramente. De um modo geral, para seu desenvolvimento, os flebotomíneos requerem temperaturas entre 20° C e 30° C, umidade a 80%, em média, e para os estádios imaturos, solo rico em matéria orgânica, essencial para o desenvolvimento das

larvas. Sendo assim, a umidade relativa do ar é um o fator determinante à manutenção desses insetos em seus abrigos.

Os flebotomíneos costumam depositar seus ovos em micro-habitats terrestres, ricos em matéria orgânica (ALEXANDER, 2000). Os ovos são elípticos, alongados e um tanto encurvados (Figura 4). Tal curvatura faz com que a face dorsal seja convexa e a ventral, côncava, são de coloração escura, medindo segundo a espécie, cerca de 300 a 500 micrômetros de comprimento por 70 a 150 micrômetros de largura (FERRO et al., 1998; BRAZIL & BRAZIL, 2018). A fêmea adulta de flebotomíneos realiza postura (02 a 80 ovos) com média 28 ovos por fêmea (MORALES et al., 2005), sendo realizada isoladamente ou em pequenos grupos de ovos, ficando aderidos ao substrato devido à substância produzida pelas glândulas acessórias, os mesmos levam em torno de 8 dias e meio para realizar a eclosão (FERRO et al., 1998).



Figura 4: Ovos de flebotomíneos mantidos em colônias (potes de confinamento), no insetário, sob condições ideais para sua criação, no laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ). Fonte: Fuzari, AA.

Quanto à dessecação, são dotados de baixa capacidade de resistência necessitando de elevado teor de umidade para se desenvolverem normalmente. (MONTEIRO, 2012).

As larvas de flebotomíneos (Figura 5) são muito vorazes, possuem aspecto vermiforme, sendo pequenas, brancas e ao nascer já se alimentam de matéria orgânica em decomposição eliminando grande quantidade de fezes sob a forma de pequenas bolotas. A alimentação só é interrompida pouco tempo antes das mudas, reiniciando cerca de 2 horas após, quando já ocorreu o necessário endurecimento

do exoesqueleto quitinoso, principalmente o tocante às partes bucais (LEITE & WILLIAMS, 1997). Seu corpo é dividido em cabeça, três segmentos torácicos e nove segmentos abdominais. A cabeça é recoberta de espinhos, possui um par de antenas e as peças bucais são do tipo triturador. No último segmento abdominal, existem implantadas longas cerdas caudais responsáveis pela fixação da larva no momento da muda. Como são de hábitos terrestres, não possuem sifão respiratório, mas apresentam pseudópodes na face ventral dos segmentos do abdome que se dedicam à locomoção que ocorre logo após o endurecimento da quitina, algum tempo depois da ecdise. Decorrido um tempo variável, entre 15 e 70 dias, formam-se as pupas (LEITE & WILLIAMS, 1997).



Figura 5: Larvas de flebotomíneos mantida em colônias (potes de confinamento), no insetário, sob condições ideais para sua criação, no laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ). Fonte: Barbosa AF.

Em condições de temperatura acima do nível ótimo, os efeitos sobre as larvas são prejudiciais, tendo como consequência o aumento da mortalidade dessas formas. Em situações térmicas inferiores, o desenvolvimento larval vai-se retardando, com duração cada vez maior, até que, atingindo nível mínimo, o desenvolvimento é interrompido. Existem indícios que mostram que os limites dessa faixa podem ser fixados entre 25° e 30°C (BRAZIL & BRAZIL, 2018).

Vale a pena ressaltar, que os estádios larvares de flebotomíneos podem diferenciar dos outros psicodídeos, pois ocorrem fora d'água, são saprófagas, anfipneusticas, do tipo eruciforme (BRAZIL & BRAZIL, 2018). Porém, se ovos ou larvas de primeiro estágio ficarem imersos em água, podem sobreviver em torno de cinco dias, e as larvas de quarto estágio sobrevivem por 14 dias. Entretanto, se

forem retiradas da água antes desse prazo, podem seguir com seu desenvolvimento naturalmente (ADLER & THEODOR, 1957).

No que se refere à iluminação, admite-se, de maneira geral, que a escassez ou a ausência dela, constitui fator favorável para o desenvolvimento das larvas de flebotomíneos. Porém, não podemos deixar de pontuar a ação nociva da luz intensa, especialmente a de origem solar com seus raios caloríficos. (BRAZIL & BRAZIL, 2018).

Nos flebotomíneos as formas pupais são mais ou menos cilíndricas, composta de 13 segmentos e de coloração amarelada, sendo dividida em cefalotórax e abdome, que escurece progressivamente à medida que se aproxima o momento da muda, ficando aderido a um substrato endurecido, o período pupal leva em média 15 dias (FERRO et al., 1998). Possuem pequenas dimensões, cerca de dois ou menos milímetros de comprimento. As pupas são mais resistentes às variações do teor de umidade, do que as larvas e ovos (FORATTINI, 1960) (Figura 6).



Figura 6: Pupa de flebotomíneo, mantida em colônias (potes de confinamento), no insetário, sob condições ideais para sua criação, no laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ). Fonte: Fuzari, AA.

Não ocorre alimentação nas formas pupais e sua respiração é aérea. Comparando com o que ocorre com o período de incubação dos ovos, a temperatura tem influência marcante no tempo de evolução das pupas (BRAZIL & BRAZIL, 2018).

Na alimentação dos flebotomíneos adultos, é a saliva que possibilita o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas. Assim como ocorre em outros insetos

hematófagos, ela possui substâncias anticoagulantes e indutoras de vasodilatação. As fêmeas dão início a sua alimentação sanguínea entre 24 e 48 horas após a sua emergência, e como possuem peças bucais relativamente curtas, realizam um procedimento diferenciado para conseguir se alimentar (Figura 7). Inicialmente laceram a pele e os capilares sanguíneos ali presente, fazendo com que se forme uma pápula subcutânea, onde é capaz de sugá-la. Este processo pode levar cerca de 1 a 5 minutos para que a fêmea possa realizar seu repasto completo (BRAZIL & BRAZIL, 2018).



Figura 7: Flebotomíneo fêmea da espécie *Phlebotomus papatasi*. Imagem capturada durante sua alimentação. Fonte: <http://www.sciencephoto.com/média/151983/enlarge>, 2012.

Os flebotomíneos adultos apresentam dimorfismo sexual (Figura 8) expresso não apenas nas diferenças das formas do corpo, mas também no comportamento alimentar que se expressa na hematofagia exclusiva da fêmea. Morfologicamente, as principais diferenças entre sexo estão nos últimos segmentos abdominais, que são modificados para constituir a genitália: no macho está presente um conjunto de apêndices bem desenvolvidos e ornamentados (estruturas com valor taxonômico), enquanto na fêmea os segmentos menores e discretos dispõem-se como estrutura telescópica, as quais conferem aspectos arredondados à genitália do inseto, e nas probócides, que na fêmea é adaptada para picar e sugar (BRAZIL & BRAZIL, 2018).

Logo após emergirem da pupa, os adultos mantêm-se inertes. Os machos que no interior da pupa permanecem com seus apêndices genitais dobrados sobre o

corpo, precisam de 24 horas para que aconteça uma rotação de 180°, período após o qual, acredita-se, que estarão aptos para a cópula (ADLER & THEODOR, 1957).

Sobre o acasalamento dos flebotomíneos, sabemos que acontece durante a noite, na natureza, período em que ocorre a maior atividade destes insetos. Podemos acrescentar a este comportamento o ato de vibrar as asas e a presença de glândulas abdominais, estas capazes de excretar feromônios ao qual, presumivelmente, tem a função de atração dos insetos envolvidos (BRAZIL & BRAZIL, 2003). No que tange a longevidade dos adultos, em condições naturais, os dados existentes são insipientes, entretanto, em laboratório foram observados que tanto os machos quanto as fêmeas de flebotomíneos podem sobreviver entre 20 e 30 dias.

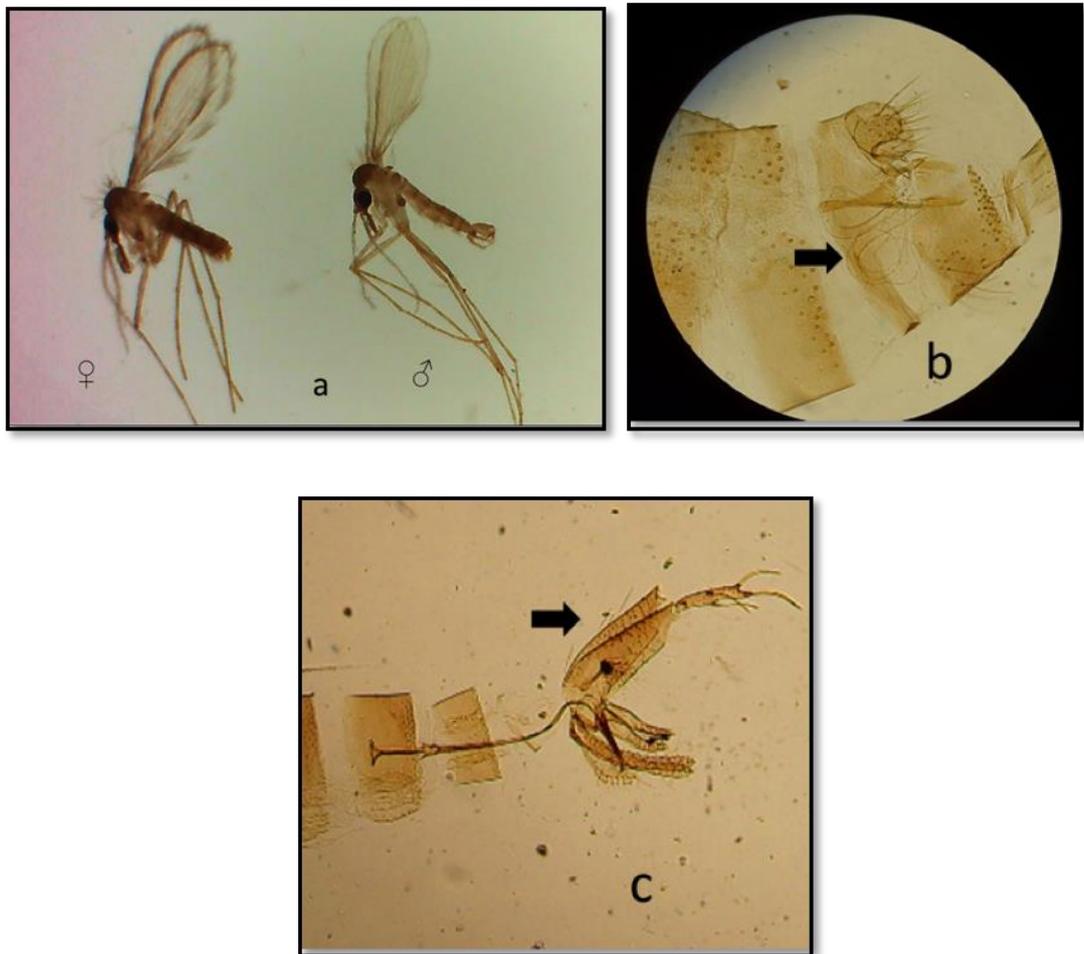


Figura 8: Dimorfismo sexual em flebotomíneos adultos. a, visão geral da morfologia externa da fêmea (esquerda) e macho (direita); b, a seta indica as espermatecas de uma fêmea; c, genitália externa de um macho. Fonte: Fotografias: a Fuzari, AA (IOC/FIOCRUZ); b e c: Barbosa, AF (IOC/FIOCRUZ).

Vários fatores podem contribuir para o aumento e/ou diminuição da longevidade dos adultos de flebotomíneos, a queda de umidade parece ser um dos fatores que mais afetam a sua sobrevivência (NASCIMENTO, 2013).

1.1.2. Taxonomia dos flebotomíneos.

O estudo da morfologia tem por objetivo identificar e diferenciar as espécies existentes de flebotomíneos em dada localidade, tendo por base as estruturas visíveis do inseto após a preparação em lâmina e observação com auxílio de microscopia (YOUNG & DUNCAN, 1994).

A identificação taxonômica dos flebotomíneos é considerada complexa, sendo, por isso, necessário o estudo da sua morfologia interna, no caso das fêmeas, principalmente, pela visualização e reconhecimento da faringe, cibário e espermatecas (Figura 9). No caso dos machos, pela morfologia externa por meio da terminália genital (BRAZIL & BRAZIL, 2018).



Figura 9: Corte entre os 8 e 9 segmento do abdome de uma fêmea da espécie *Nyssomyia intermedia*, possibilitando a visualização da espermateca. Fonte: Mendonça, ES; Gonçalves, I. 2019.

Os sexos são identificados através dos últimos segmentos abdominais, no macho está representado por um conjunto de apêndices bem desenvolvidos e ornamentados, enquanto na fêmea as estruturas conferem aspectos arredondados. As probóscidas entre machos e fêmeas também se distinguem morfologicamente, sendo mais curta no macho em relação à fêmea, que se apresenta um pouco mais longa e adaptada para picar e sugar (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Atualmente existem duas chaves de identificação dos flebotomíneos das Américas. A primeira chave de classificação é atribuída a YOUNG & DUNCAN (1994) onde o autor, subdivide o gênero *Lutzomyia* em 15 subgêneros e 11 grupos, sendo que apenas o grupo *Verrucarum* possui subdivisões (CACERES, 1993). Esta chave de identificação é considerada prática, pois opta pela classificação a partir da observação de estruturas morfológicas essenciais tais como a ligação entre a, tamanho dos ascóides, do lábio, dos palpos, da extensão da sutura interocular, do cibário, da presença ou ausência de espinhos femurais, genitália masculina e feminina além da espermateca e o do tamanho dos segmentos da antena (CACERES, 1993).

Uma segunda fonte passou a ser utilizada na taxonomia de flebotomíneos do Novo Mundo, sendo apresentada por GALATI (2003), onde a autora baseada na filogenia utiliza 88 caracteres morfológicos, valorizando a quetotaxia (estudo das cerdas ao longo da estrutura do inseto) além das outras estruturas contribuindo assim para uma melhor distribuição entre os grupos. Fêz a divisão de Phlebotomini em 6 subtribos: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina. Sendo as espécies americanas distribuídas entre as quatro últimas (GALATI, 2018). Também subdividiu os Phlebotominae em duas tribos: Phlebotomini e Hertigini; Hertigini, sem espécie de interesse médico, possui duas subtribos: Idiophlebotomina para o Velho Mundo e Região Australiana e Hertigiina para a América (GALATI, 2003).

Muitos subgêneros, da subtribo Psychodopygina foram elevados ao nível de gênero (*Viannamyia*, *Psathyromyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia*), acarretando como resultado uma completa mudança organizacional (GALATI, 2018).

Atualmente, no mundo, são aceitos 1047 táxons do grupo das espécies (espécies ou subespécies) descritos (1016 atuais e 31 fósseis). Nas Américas somam 549, sendo 532 atuais e 17 fósseis. A atualização das espécies de flebotomíneos foi realizada segundo a base de dados do Catalogue of Life (Bánki et al. 1921) (GALATI, 2021).

As informações referentes à classificação e ecologia das espécies de flebotomíneos é fundamental para a vigilância epidemiológica das leishmanioses. A

investigação e o registro dos flebotomíneos contribuem para a definição do risco de transmissão dos patógenos por eles transmitidos (CUTOLO & VON ZUBEN, 2008).

1.1.3. Importância epidemiológica dos flebotomíneos.

Entre as doenças causadas por flebotomíneos, a leishmaniose assume um singular destaque. Diante disso, em 1950, quando ainda era desconhecida a verdadeira importância dos vetores responsáveis pela leishmaniose, os cientistas procuraram identificar nos insetos a habilidade destes cumprirem com duas condições: a primeira, a necessidade da existência do vetor na área de prevalência das doenças, e a segunda que o referido vetor deveria possuir um trato alimentar estéril, uma vez que a *Leishmania* não sobrevive na presença de bactérias (ADLER & THEODOR, 1957). Posteriormente, novas características contribuíram para consolidar tal investigação, pois foi identificada a capacidade parasitária da *Leishmania* de resistir às atividades das enzimas digestivas do inseto, onde o bolo alimentar escapa e adere ao epitélio intestinal durante a excreção do mesmo, completar seu ciclo de vida e serem inoculados em um hospedeiro vertebrado (PIMENTA et al., 2003).

1.2. Agente etiológico das leishmanioses.

A *Leishmania*, agente etiológico das leishmanioses, é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório nas células do sistema fagocítico mononuclear com duas formas principais (Figura 10): uma flagelada denominada promastigota encontrada no tubo digestório do inseto vetor e outra aflagelada denominada amastigota observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. O gênero *Leishmania* possui dois hospedeiros em seu ciclo de vida: um hospedeiro invertebrado, considerado o hospedeiro intermediário, e um hospedeiro vertebrado, o hospedeiro definitivo (NASCIMENTO, 2013; CASAGRANDE, 2018).

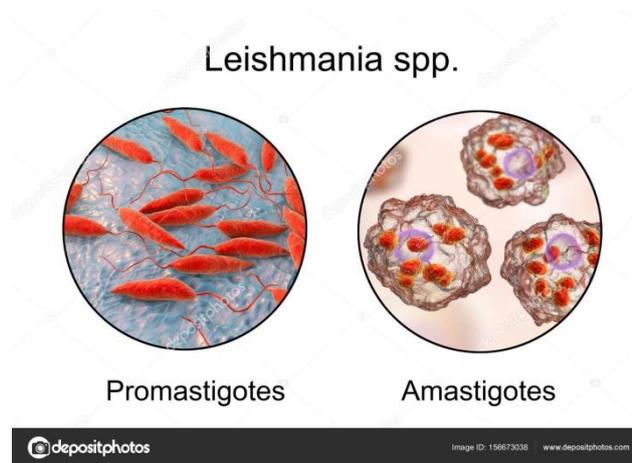


Figura 10: Formas evolutivas encontradas no ciclo da *Leishmania* spp.
Fonte: <https://www.bing.com/images/search>.

A fêmea do flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro portador da *Leishmania* se infecta com a forma amastigota, que, por sua vez se diferencia morfológica e bioquimicamente em promastigota e se multiplica no intestino do flebotomíneo. Ocorrendo dessa forma a transmissão, ao homem ou outro hospedeiro no momento do repasto sanguíneo do inseto (BRAZIL & BRAZIL, 2018) (Figura: 11).

[...] quando a fêmea for realizar o segundo repasto sanguíneo, liberando na epiderme do hospedeiro a forma promastigota que será fagocitada e no interior dos macrófagos irão se diferenciar na forma amastigota. A partir da inoculação inicia-se a interação entre o parasita e a resposta imunológica do hospedeiro que irá determinar a expressão clínica da leishmaniose. (VARIZA, p. 18, 2016).

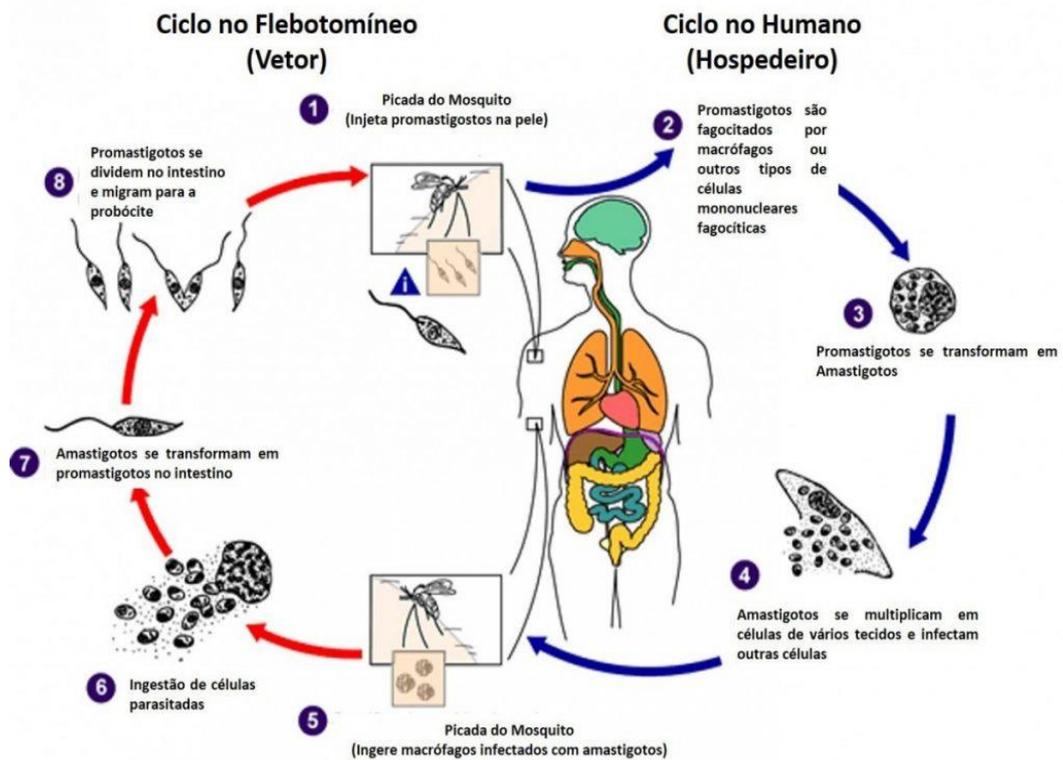


Figura 11: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. - Fonte: adaptado de CDC (2015).

As *Leishmanias* responsáveis por infectar o homem são classificadas em dois subgêneros (*Viannia* e *Leishmania*) baseado na forma de desenvolvimento dos flagelados no trato digestório dos flebotomíneos, e outros aspectos (LAISON et al, 1987). As *Leishmanias* do subgênero *Viannia* são representadas pelo complexo *Leishmania braziliensis*, das quais fazem parte as espécies no Brasil, a *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) linderbergi*, *L. (Viannia) shawi*. O subgênero *Leishmania* é representado pelas espécies *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, e no Velho Mundo a *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica* e *Leishmania (Leishmania) aethiopica* (QUARESMA, 2011; MONTEIRO, 2012). Vale a pena ressaltar, que existe especificidade das *Leishmanias* em sua área de ocorrência restrita, e conseqüentemente a relação entre os vetores encontrados nos habitats específicos de cada uma destas áreas (OLIVEIRA et al., 2003).

1.3. Leishmanioses.

As leishmanioses são antropozoonoses, não contagiosas de transmissão vetorial causada por diversas espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, todos com grau variável de especificidade pelo hospedeiro, transmitidos pela picada da fêmea infectada do inseto vetor, flebotomíneo (CHANCE, 1985). Dependendo da espécie infectante, podem causar quadros que afetam o sistema fagocítico mononuclear, particularmente a medula óssea, fígado, baço e gânglios causando a leishmaniose visceral (LV). A forma de leishmaniose que compromete o tegumento (causando lesões cutâneas e/ou mucosas) é conhecida no Novo Mundo como leishmaniose tegumentar americana (LTA).

As leishmanioses podem ocorrer também em ciclos zoonóticos, antroponóticos ou antropozoonóticos. Um aspecto importante das leishmanioses no Brasil é a adaptação comprovada de vetores de diferentes espécies de flebotomíneos em áreas urbanas (WHO, 2011). Por isso, é necessária a investigação sobre a presença de flebotomíneos nestas áreas, assim como nos parques urbanos destinados ao lazer, onde normalmente são visitados pela população, além da ausência de informações epidemiológicas que poderão contribuir certamente para a transmissão de leishmaniose nessas áreas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses podem ser divididas de acordo com o seu quadro clínico: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral, sendo a leishmaniose cutânea considerada de baixa gravidade, a forma mucocutânea pode causar lesões graves na face, enquanto a forma cutâneo-difusa tem um aspecto hanseniforme. A forma visceral resulta em elevada mortalidade quando não tratada ao atingir os órgãos do indivíduo infectado. As diferentes aparições clínicas estão sujeitas a diversos fatores, como a espécie e malignidade da *Leishmania* envolvida, além de aspectos ligados ao hospedeiro, como o seu estado imunológico, nutricional, etc. (BRASIL, 2017).

A sintomatologia da leishmaniose é bem distinta, o sintoma mais evidente da forma cutânea é caracterizado por úlceras na pele; na mucocutânea, as úlceras afetam não só a pele como também a boca e nariz. A forma visceral se apresenta tendo como sintoma inicial úlceras na pele, sendo posteriormente acrescida de

febre, diminuição do número de glóbulos vermelhos e aumento de volume do baço e fígado. Não havendo tratamento adequado, a probabilidade de óbito do hospedeiro mamífero é inevitável (BRASIL, 2014).

Atualmente pode-se dizer que, no Brasil, a LTA, considerando as formas clínicas cutânea, mucosa, mucosa difusa e a disseminada, retrata três padrões epidemiológicos distintos a saber: ocupacional e lazer (transmissão está relacionada à exploração desequilibrada da mata e derrubada de florestas para construção de estradas e usinas hidrelétricas, extração de madeira, instalação de povoados, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo), silvestre (ocorre em áreas de vegetação primária) e rural / periurbano em áreas de colonização (associada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados, em centros urbanos associados a matas residuais ou secundárias. (MS, 2010)

1.3.1. Leishmaniose visceral.

Nas Américas, a Leishmaniose Visceral (LV), é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum*, tendo como principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, podendo ser encontrado desde o México à Argentina. Ao norte da Colômbia e Venezuela, *Lu. evansi* é a espécie de flebotomíneos incriminada como o principal vetor. No Brasil, no estado de Mato Grosso do Sul, nas cidades de Corumbá e Ladário, *Lu. cruzi* foi registrado como o principal vetor e *Lu. forattinii* como papel secundário na transmissão. Ainda neste estado, na Serra da Bodoquena, juntamente com *Lu. longipalpis* a espécie *Lu. almerioi* também parece atuar na transmissão, já em Recife (PE) *Migonemyia migonei* foi evidenciado como um possível vetor (OVALLOS, 2011; CARVALHO, 2010).

É uma protozoonose cuja sintomatologia pode diversificar consideravelmente, desde manifestações clínicas discretas até as mais expressivas, onde, se não tratadas, podem levar ao óbito. Muitos infectados apresentam a forma inaparente ou assintomática da doença, sendo considerada uma doença de grande importância em saúde pública, devido principalmente à urbanização, ampla distribuição, expansão territorial e altas taxas de mortalidade nos casos não tratados (BRAZIL & BRAZIL, 2003). O parasita se desloca para os órgãos viscerais como baço, fígado e medula

óssea e, se não houver tratamento, certamente resultará na morte do hospedeiro mamífero. Tem como sinais e sintomas febre, massa corporal reduzida, anemia, além de um expressivo inchaço do fígado e baço (Figura 12). De acordo com a OMS, é problema atualmente a evolução da coinfeccção HIV/LV.



Figura 12: Paciente com LV com sangramento, de Kapoeta, Sudão do Sul, 2013. Fonte: © OMS .

A LV foi endêmica no RJ nas últimas décadas do século XX, entretanto as notificações reduziram muito entre o final do século XX e o início deste século (MS, 2010)

O estado do Rio de Janeiro está classificado como área de transmissão esporádica, tendo casos caninos e humanos diagnosticados somente no município do Rio de Janeiro, contudo, nos últimos anos foram citados casos de LV nos municípios de Angra dos Reis, Barra Mansa, Mangaratiba e Rio de Janeiro, apresentando o crescimento da doença para outras localidades do estado (MARZOCHI et al. 1985; CABRERA et al. 2003; MADEIRA et al. 2006). A partir de 2010, os casos de LV aumentaram e foram diagnosticados principalmente nas regiões Médio Paraíba e da Baía da Ilha Grande.

Constata-se que a ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral é precedida e acompanhada através da detecção de casos caninos, evento considerado sentinela para a infecção humana (BRASIL, 2014). A forma visceral resulta em elevada mortalidade quando não tratada ao atingir os órgãos (baço e o fígado) do cão infectado, tendo como sintomatologia febre ondulante, fadiga, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia (NASCIMENTO, 2013). Cabe aqui

pontuar que a LV é doença de NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA DOS CASOS SUSPEITOS (BRASIL, 2017).

1.3.2. Leishmaniose tegumentar americana.

A leishmaniose tegumentar sempre foi considerada uma zoonose, onde o parasita transitava entre os animais silvestres através dos flebotomíneos e ao adentrar na floresta, o homem acabava sendo infectado.

No continente americano, a LTA é amplamente encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (CASAGRANDE, 2006).

No Brasil, o primeiro caso de LTA registrado ocorreu a partir de uma análise de autópsia realizada em um paciente do município de Boa Esperança (Mato Grosso) no ano de 1913 (RODRIGUES, 2011). Na década de 1980, a presença de LTA foi registrada em 19 estados da federação. Em 2003, já havia casos autóctones em todos os estados, evidenciando a expansão da doença (BRASIL, 2017).

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente (FORATTINI, 1960). Diversas espécies de flebotomíneos participam da transmissão de parasitos responsáveis pela LTA. Algumas são incriminadas como vetoras de *Le. braziliensis*, como *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia neivai* e *Migonemyia migonei*. Estas espécies de flebotomíneos foram apontadas como vetoras por corresponderem aos critérios que conferem a uma determinada espécie sua competência vetorial (FORATTINI, 1960). Cabe ressaltar que a representatividade vetorial de cada uma dessas espécies será estabelecida pela espécie de *Leishmania* presente no intestino do inseto vetor (FORATTINI, 1960).

A LTA é endêmica no estado do Rio de Janeiro, tendo nos últimos anos uma considerável redução do número de casos. Pode limitar-se a lesões de pele (leishmaniose cutânea) podendo ocorrer também em pálpebras ou em áreas normalmente cobertas pelo vestuário, sugerindo que a transmissão com grande frequência ocorra no interior das habitações, ou ainda afetar mucosas, especialmente das vias aerodigestivas superiores (leishmaniose mucosa) ou,

ocasionalmente, a região genital (ALMEIDA, 1992). A leishmaniose mucosa é considerada preocupante, devido ao alto potencial de desenvolvimento de sequelas desfigurantes e destrutivas (RIO DE JANEIRO, 2014).

Os hospedeiros vertebrados são roedores, marsupiais e edentados silvestres, sendo particularmente importantes para a ocorrência de LTA no meio rural e periurbano os animais com atividade sinantrópica (gambá e roedores)(BRASIL, 2017).

No estado do Rio de Janeiro, a LTA é relatada por apresentar uma característica de transmissão peridomiciliar, fomentado basicamente pela adaptação de algumas espécies de flebotomíneos aos ambientes naturais modificados, gerando, desta feita o comprometimento de animais domésticos no ciclo de transmissão (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; BRAZIL et al. 1991; MADEIRA et al. 2006). O reconhecimento frequente de cães domésticos com altas taxas de infecção relacionadas à doença humana, associada à evidência dos mesmos padrões genotípicos do patógeno circulando nas populações caninas e humanas, revela e fortalece este envolvimento (MADEIRA et al. 2000; LOPES et al. 1984; PACHECO et al. 1986; RANGEL et al. 1990)

1.4. JUSTIFICATIVA.

Realizou-se um levantamento da fauna flebotomínica em uma localidade de Catimbau Grande no município de Rio Bonito, onde esta mesma atividade já havia sido realizada há pelo menos 20 anos atrás. Na época foram identificadas algumas espécies de flebotomíneos vetores (*Nyssomyia intermedia*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Lutzomyia longipalpis*, *Micropygomyia schreiberi*. Ao realizar a reavaliação da área, tínhamos a expectativa de avaliar se houve mudança da fauna existente e se o número de espécies vetores ou se a densidade delas foi alterada. Neste sentido, julgamos a relevância da investigação por oferecer uma identificação, mais atualizada, das espécies de flebotomíneos na localidade, além de indicar quais seriam as espécies de *Leishmania* circulantes e detectadas nas espécies de flebotomíneos. Esses dados são de grande valia para os órgãos de saúde municipais, ao fornecer informações sobre localidades onde a população estaria em maior risco de contrair a leishmaniose. Sendo assim, realizou-se um levantamento da fauna flebotomínica na área de estudo, a identificação de potenciais vetores e a

detecção de *Leishmania* circulante, contribuindo desta feita para o conhecimento sobre os aspectos epidemiológicos da leishmaniose na região.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo Geral.

- Estudar a fauna de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), na localidade de Catimbau Grande, Rio Bonito, Rio de Janeiro.

2.2. Objetivos Específicos.

- Identificar as espécies de flebotomíneos nas áreas peridomiciliar e extradomiciliar.
- Realizar pesquisa de DNA de *Leishmania* spp nas fêmeas de flebotomíneos e avaliar o papel das espécies como vetores.
- Realizar estudo qualitativo das espécies de flebotomíneos em relação ao ambiente pesquisado nas áreas peridomiciliar e extradomiciliar.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Descrição da área de estudo.

O presente estudo foi realizado no município de Rio Bonito, localizado na Região Metropolitana do estado do Rio de Janeiro, sua altitude é de 55 metros, com área territorial de 462 km², as coordenadas geográficas são: Latitude 22°42'30" sul, Longitude: 42°37'34" oeste. Possui clima tropical úmido com amplitude térmica anual relativamente alta, com a temperatura média do verão variando em torno dos 31° C. No inverno as mínimas podem chegar a até 10° C. A temperatura média durante o ano é de 26° C (ALMEIDA, 1992).

Em sua cobertura vegetal sobrevivem ainda várias espécies peculiares à Mata Atlântica nativa, árvores de madeira de lei como o ipê, a massaranduba, o tapunhoá, o vinhático, a caneleira, cedro, graúna, óleo vermelho, cabiúna e cameavata. Entretanto, sua extensão encontra-se bem devastada, devido às atividades agropecuárias e agroindustriais, ocasionadas principalmente pelas olarias que utilizam a madeira como fonte de energia. Atualmente, a vegetação com características primárias é encontrada apenas nas altas vertentes da serra do mar (ALMEIDA, 1992).

O município de Rio Bonito tem como limites norte, os municípios de Cachoeira de Macacu e Silva Jardim, ao leste, Araruama, oeste, Tanguá e ao sul o município de Saquarema (Figura 13). Sua população em 2019 foi estimada em 60.930 habitantes. O local escolhido para a realização dos estudos fica no distrito de Catimbau Grande, situado entre as vertentes das serras Amar, Querer e Catimbau, fazendo limites com o município de Saquarema e distando 14 Km da sede municipal (ALMEIDA, 1992).

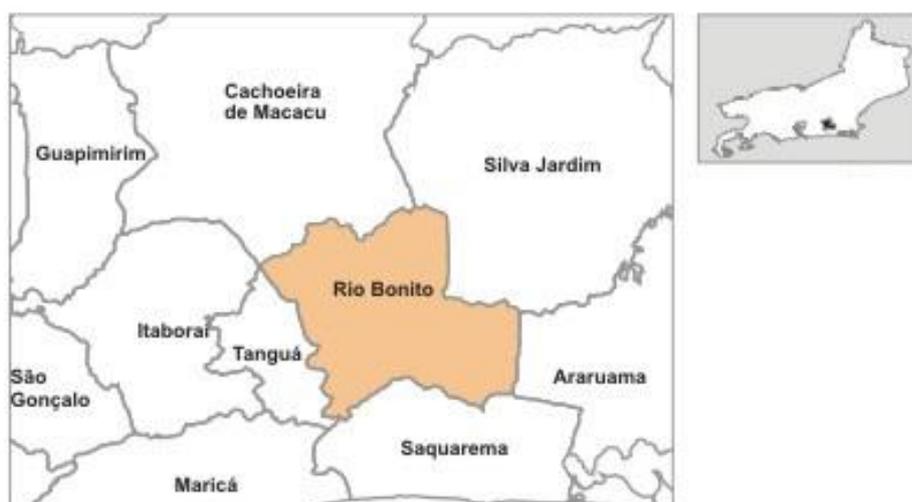


Figura 13: Mapa da divisão do Estado do Rio de Janeiro em municípios, destacando a localização do município de Rio Bonito, a área onde foi realizado o trabalho. Fonte: <http://www.emater.rj.gov.br/riobonito.asp>.

As capturas dos flebotomíneos foram realizadas na localidade denominada Sítio Nossa Senhora Aparecida (Figura 14), com aproximadamente 5.000 alqueires tendo como subsistência a criação de gado bovino. Nesta área a LTA é uma doença de ocorrência esporádica (último caso notificado de LTA na região foi no ano de 2008), independente das ações específicas de combate realizadas pela Secretaria Municipal de Saúde de Rio Bonito.



Figura 14: Sede do Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019.

3.2. Captura e montagem dos flebotomíneos coletados.

Para a realização das capturas dos insetos vetores foram utilizadas três armadilhas luminosas HP (tipo CDC), modificadas de acordo com Fuzari, 2016 (Figura 15), tal armadilha é constituída por um corpo em formato cilíndrico, confeccionado em termoplástico (PVC ou resina), tendo como fonte de luz, uma lâmpada do tipo tubular, de baixo consumo, que emite radiação luminosa de alta intensidade, acrescida por uma fonte de energia, constituída por quatro pilhas de 1,5 volts (tipo D), onde também alimenta um micro-motor (ventuinha) de baixa rotação (1400rpm) que, por sua vez, aciona uma hélice. A forma estreitada das pás na área central da hélice, em relação às bordas, ligada à rotação adequada do motor consiste num sistema de exaustão de ar, succionando os insetos vivos e íntegros, aprisionando-os dentro de um recipiente de plástico contendo álcool 80°, para posterior coleta. As mesmas foram instaladas em pontos distintos (P1, P2 e P3) (Figura 16), sendo uma armadilha instalada no peridomicílio denominada ponto P1 e localizada em uma plantação de coqueiros e bananeiras (Figura 17) as outras duas armadilhas foram instaladas no extradomicílio, nomeadas de ponto P2: moinho abandonado (Figura 18) e ponto P3: pequena elevação (Figura 19). As coletas foram realizadas quinzenalmente, durante o período de janeiro a junho do ano de 2019, totalizando 12 coletas, num período de seis meses (Quadro 1). As armadilhas foram instaladas no início às 18 horas, e permaneceram no ambiente por 48 horas. Durante o estudo de campo foram registrados dados climáticos e georreferenciadas nas localidades onde as armadilhas foram instaladas.



Figura 15: Armadilha luminosa HP (tipo CDC), modificada de acordo com Fuzari (2011) utilizadas para captura de flebotomíneos. Fonte: Mendonça, 2019.



Figura 16: Marcação dos pontos estabelecidos para coletas (P1, P2 e P3) no Sítio Nossa Senhora Aparecida na localidade de Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Google Earth.



Figura 17: Ponto de coleta P1 (plantação de coqueiros e bananeiras), Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019.



Figura 18: Ponto de coleta P2 (moinho abandonado), Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019.



Figura 19: Ponto de coleta P3 (pequena elevação, sob uma árvore), Sítio Nossa Senhora Aparecida, Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ. Fonte: Mendonça, 2019.

Em todo material coletado, foi feita uma triagem inicial utilizando um microscópio estereoscópico (lupa) para exclusão dos insetos não flebotomíneos, além da realização da sexagem dos flebotomíneos encontrados nas armadilhas. Em seguida, foram acondicionados em microtubos, para a posterior identificação taxonômica das espécies de flebotomíneos. Para tanto, utilizou-se a técnica de clarificação e diafanização: hidróxido de potássio 10% por 16 horas, para clarificação; ácido acético 10% por 15 a 20 min, para neutralizar o processo de clarificação; desidratação seriada em álcool (álcool 70%: 10 minutos, álcool 90%: 10

minutos, álcool 95%: 10 minutos e álcool 100% 10 minutos); e por fim os espécimes foram acondicionados em Eugenol (óleo de cravo) por 24 horas (para a diafanização das estruturas com valores taxonômicos). Após esta etapa, cada inseto foi colocado na lâmina sobre uma gota de bálsamo do Canadá, e com o auxílio de dois estiletos de pontas finas, separou-se a cabeça do tórax nos exemplares machos, e nas fêmeas separou-se a cabeça do tórax, e o abdome. Em seguida, uma lamínula foi inserida sobre o respectivo exemplar, sendo levado à estufa para secagem a 37° C e após 72 horas, no mínimo, colocou-se esmalte incolor em volta da lamínula para sua impermeabilização (FUZARI, 2013).

As fêmeas de flebotomíneos capturadas foram separadas para avaliação de infecção natural através da PCR (Polymerase Chain Reaction), onde foram utilizadas somente fêmeas sem resíduo de alimentação em seu tubo digestório. Estas sobre lâmina e uma gota de salina foram separadas a cabeça e os dois últimos segmentos abdominais, sendo tais estruturas montadas entre lâmina e lamínula, para a identificação da espécie em questão e o restante do corpo foi acondicionado em tubo para crio preservação para futura extração de DNA.

As lâminas, após secas, foram identificadas de acordo com a chave de identificação de flebotomíneos segundo Galati (2018) e arquivadas no próprio laboratório.

3.3. Georreferenciamento.

Cada local de captura foi georreferenciado para tal foi utilizado um aplicativo no Smartphone denominado GPS Tape Measure (coordenadas) e o “Alitmetr and evalutaion” (altitude) além do Google Earth (Quadro 1)

Quadro 1: Pontos de Coleta

PONTOS DE COLETAS			
	P1	P2	P3
COORDENADAS GEOGRÁFICAS	S 22°801'806" W 42°573'320"	S 22°801'429" W 42°574'013"	S 22°802'301" W 42°574'173"
ALTITUDE	89 m	87 m	101 m

Fonte: Dados coletados pela autora.

3.4. Obtenção dos dados Climáticos.

No momento das coletas foram registrados dados climáticos, como temperatura, umidade e fase lunar, da localidade, sendo utilizado um aplicativo no Smartphone, para a obtenção dos dados. Para tal, foram observadas as características de cada ponto, buscando identificar sinais que poderiam ter relação com a variação populacional destes insetos.

3.5. Detecção de infecção natural por *Leishmania* spp em flebotomíneos por reação em cadeia da polimerase.

Após a identificação taxonômica, as fêmeas foram introduzidas individualmente em tubo eppendorf de 1,5 ml rotulado. Os machos também foram agrupados nos experimentos de reconstituição, assim como controles negativos nos ensaios diagnósticos. As fêmeas de flebotomíneos identificadas e armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml com Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) 6% foram utilizadas para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Figura 20).



Figura 20: Microtubos de polipropileno (1,5ml) contendo fêmeas para realização da extração de DNA. Fonte: Mendonça, 2019.

Durante a extração do DNA foi utilizado o kit comercial de extração Gentra Puregene® Cell and Tissue (QIAGEN), as concentrações dos reagentes não foram especificadas pelo fabricante.

Os microtubos de polipropileno contendo as amostras foram retirados do freezer -20°C e, após o resfriamento, as amostras os insetos foram macerados, com um pistilo estéril e descartável, em seguida colocado em 100µl de solução de lise celular, contendo 1µl de proteinase K em cada microtubos. Estes microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C *overnight*. Após a incubação, foi adicionado 1 µl de RNase, e os microtubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 hora, imediatamente, incubado por 1 minuto no gelo e adicionado 100 µl de solução de precipitação de proteína. Em etapa seguinte, os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi transportado para um microtubo estéril contendo 300µl de isopropanol (100%). Os microtubos foram agitados em um homogeneizador e, novamente, centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 300 µl de etanol (70%) e 30µl de acetado de sódio (10%) em cada amostra. Os tubos foram colocados no freezer a -80 °C por 1 hora e, em seguida centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. Ao término deste processo, descartou-se novamente o sobrenadante e os tubos colocados invertidos em superfície absorvente para a evaporação do etanol. O DNA extraído foi ressuspense em 20 µl de solução de reidratação e os microtubos foram incubados a 65 °C por 1 hora para a reidratação do DNA. Em seguida, o DNA foi mantido em temperatura ambiente *overnight*, e posteriormente, guardado em freezer -20 °C até a utilização. As amostras de DNA total extraído das fêmeas de flebotomíneos chegaram a uma concentração final media de 6 ng/µl.

Este DNA extraído das fêmeas dos flebotomíneos, foi submetido à técnica de PCR para amplificação de uma região alvo do DNA de *Leishmania* spp., utilizando dois indicadores: o ITS1 (“Internal Transcribed Spacer” 1) (LITSR 5’ CTGGATCATTTTCCGATG 3’ e L5.8S 5’ TGATACCACTTATCGCACTT 3’ estes amplificam um fragmento de aproximadamente 350 pb) (SCHONIAN *et al.*, 2003), que é uma região intergênica entre os genes SSU e 5.8S, podendo separar as seguintes espécies de *Leishmania*: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamanensis* (CUPOLILLO, E *et al.*, 1998).

Na PCR (reação em cadeia da polimerase) ocorreu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 350 pb por meio da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen) e 5 µl de DNA molde, em um volume final de 25 µL. Para a realização da amplificação alternou-se 33 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto em termociclador automático de DNA (MaxyGene Gradient - AXYGENE®). Para análise dos perfis das bandas amplificadas foi usado gel de agarose 2% corado com GelRed™, concentração: GelRed 10.000 X em 500 µl de água livre de contaminações (1:500), foi aplicado 1 µl de GelRed™ diluído, 1 µl de tampão de carregamento e 5 µl de produto amplificado na PCR, e comparados com produto de PCR de cepas referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Para a utilização do DNA das cepas de referências foram adotados os seguintes procedimentos: as alíquotas de culturas de cepas referência de *Leishmania* foram adicionados a tubos contendo meio de cultura NNN (Novy e Mc Neal, 1903; Nicolle, 1908) enriquecidos com Schneider, mantidos a 25 °C ± 1 °C por aproximadamente 30 dias. Quando o número de células promastigotas alcançou 1x10⁸, foi realizada a lavagem da massa de parasitos e posterior extração do DNA. A massa de promastigotas foi obtida centrifugando um volume de 30 ml de cultura a 3000 rpm por 10 minutos (Figura 21). Em seguida, despejou-se o sobrenadante e recolheu-se o pellet, o qual foi lavado três vezes com PBS (phosphate buffered saline) 1x pH 7,2 estéril. O pellet contendo as promastigotas foi submetido à extração utilizando também o kit comercial de extração Gentra Puregene® (QIAGEN), como procedeu para as amostras coletadas. A concentração de DNA de *Leishmania* empregada como controle positivo nos experimentos de PCR foi de 100 ng/µl.

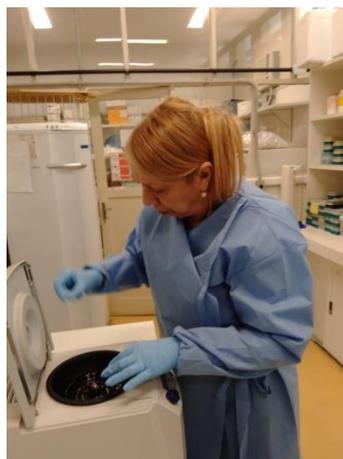


Figura 21: Realização de centrifugação das promastigotas de *Leishmania*, durante a preparação do experimento. Fonte: Mendonça, 2019.

4. RESULTADOS.

Foram realizadas 12 capturas no município de Rio Bonito, de janeiro a julho de 2019. Neste período foram coletados 157 flebotomíneos, destes 67 fêmeas (43%) e 90 machos (57%) sem diferença significativa (figuras 22 e 23), pertencentes às seguintes espécies: *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) que se apresentou como a espécie dominante com 152 exemplares (97%) e *Migonemyia migonei* (França, 1920), com 5 espécimes (3%) apenas (Figura 24 e Tabela 1)

Nossos resultados corroboram com os encontrados por Fuzari et al. 2013 e Perez et al 2014, em que a diferença na proporção entre macho e fêmea não foi significativa. Portanto, de acordo com Bastos et al 2016, ainda permanece incerto a relação entre as armadilhas tipo CDC e o sexo dos flebotomíneos capturados.

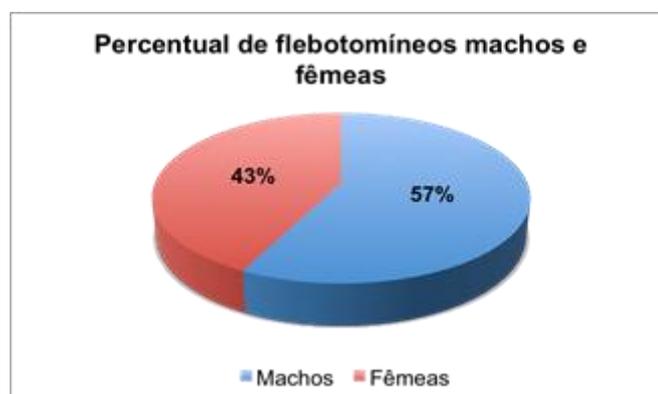


Figura 22: Percentual de flebotomíneos machos e fêmeas coletados no período de janeiro a junho de 2019, em Catimbu Grande, Rio Bonito, RJ

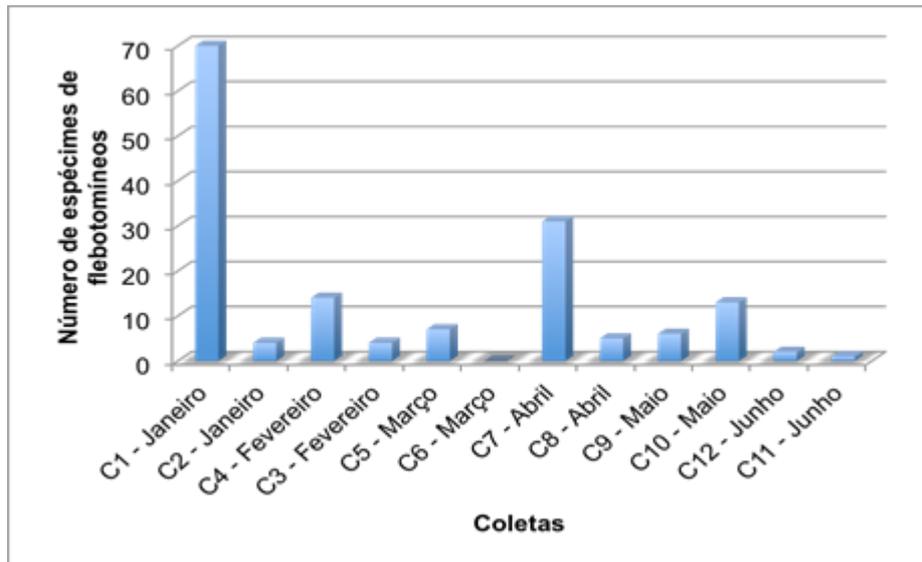


Figura 23: Número de espécimes de flebotomíneos capturados, no período de janeiro a junho de 2019 na localidade de Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ.

Na figura acima, podemos observar que no mês de março houve uma queda considerável de flebótomos coletados, tal fato, deveu-se a limpeza realizada pelo proprietário da localidade onde foi realizada o estudo, o que corrobora com a literatura (Brasil, 2017) que preconiza limpeza de terreno como controle do vetor.

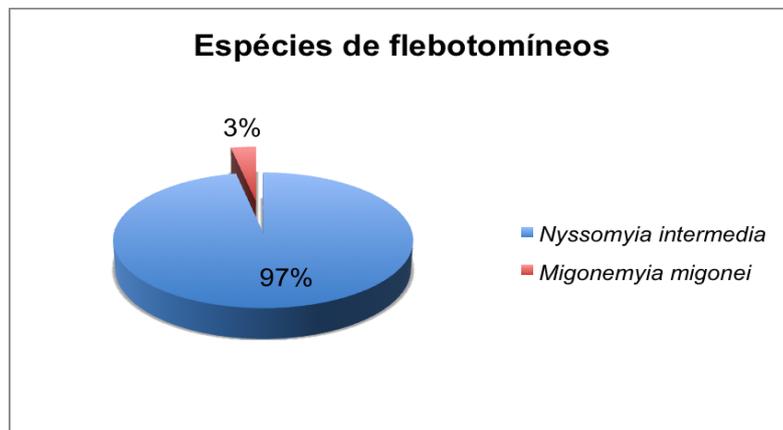


Figura 24: Percentual de espécies flebotomíneas coletadas no período de janeiro a junho de 2019, em Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ

Tabela 1: Número de flebotomíneos, por espécies, distribuídos por sexo (fêmeas e machos) coletados no período de janeiro a junho de 2019, em Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ

Espécies	Fêmeas		Machos		Total	
	Qt	%	Qt	%	Qt	%
<i>Ny. intermedia</i>	66	100	86	94,5	152	96,8
<i>Mg. migonei</i>	0	0	5	5,5	5	3,2
Total geral	66	100	91%	100	157	100

Foi observado no ponto de coleta P1, que o quantitativo de fêmeas se apresentou maior em relação aos outros pontos, e um maior número de machos foi registrado no ponto de coleta P2 (Figura 25). Também foi observado uma densidade maior de fêmeas da espécie *Ny. intermedia* no ambiente peridomicílio, enquanto que no ambiente extradomicílio o predomínio foi de machos mesma espécie (Figura 26).

Podemos considerar provavelmente, que isso se deve ao fato das fêmeas ficarem próximas a fonte alimentar obtendo assim o seu repasto sanguíneo.

Não corroborando com o que foi observado por Aguiar et al. (1985), que segundo ele, nas coletas com armadilhas luminosas o número de machos atraídos é maior, considerando que estes formam um agregado com o objetivo de acasalamento.

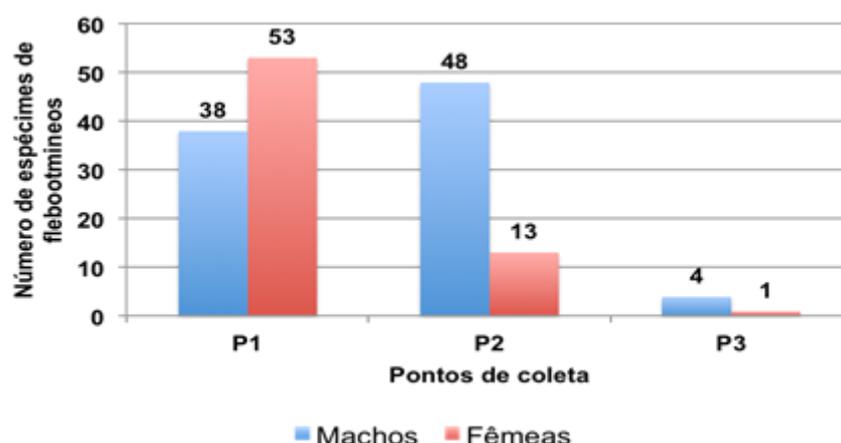


Figura 25: Número de espécimes de flebotomíneos, machos e fêmeas, distribuídos por ponto de coleta, no período de janeiro a junho de 2019 em Catimbau Grande, município de Rio Bonito, RJ

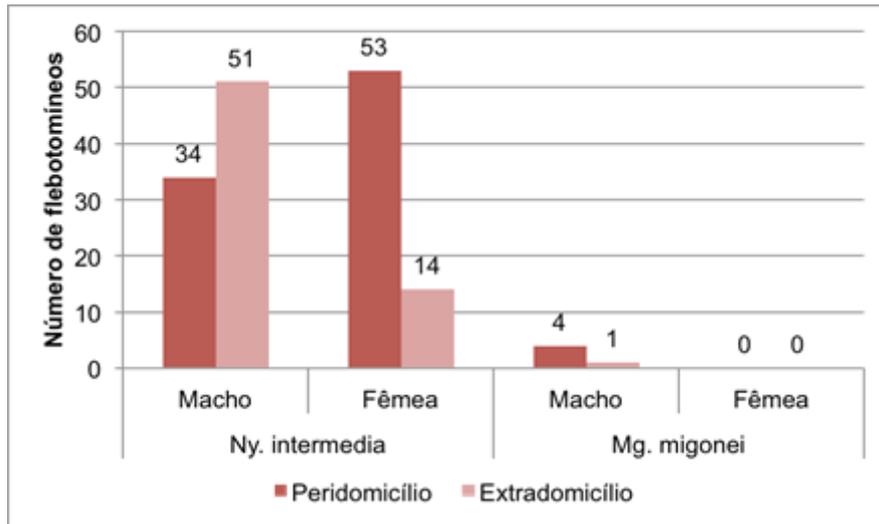


Figura 26: Número de flebotomíneos machos e fêmeas, por espécies, distribuídos nos ambientes de coleta (peridomicílio e extradomicílio), no período de janeiro a junho de 2019 em Catimbau Grande, município de Rio Bonito, RJ.

Foram aferidos, durante os meses de coletas, os valores da umidade relativa do ar, que variou entre 26% e 93% e da temperatura com uma variação de 20°C a 31°C (Figura 27). Também foi observada a fase lunar em cada coleta de insetos. Na fase de lua nova, a densidade de insetos capturados foi maior (Figura 28).

Analisando o coeficiente de Pearson entre as variáveis independentes (temperatura e umidade relativa do ar) e a densidade dos flebotomíneos, observou-se fraca correlação positiva ($r = 0,11$) com a temperatura e uma correlação negativa moderada com a umidade ($r = -0,78$).

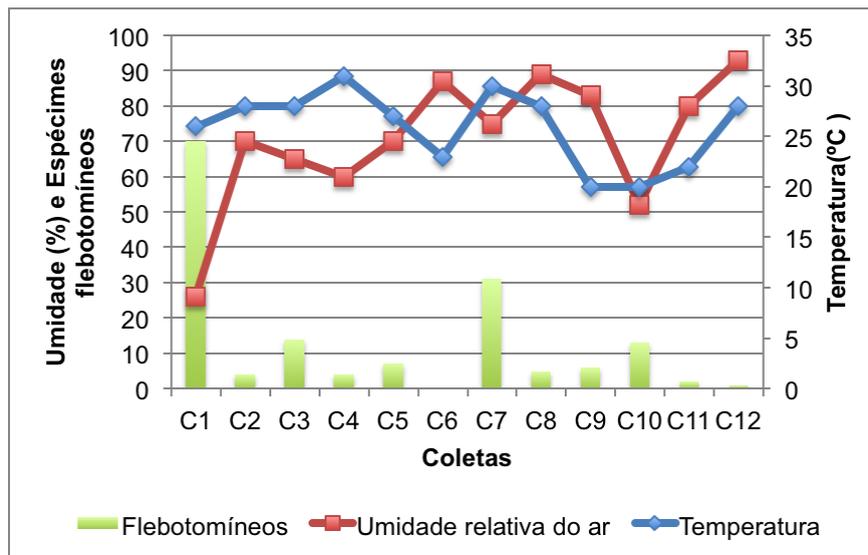


Figura 27: Medidas de umidade relativa do ar e temperatura obtidos no momento das capturas, no período de janeiro a junho de 2019, em Catimbau Grande, município de Rio Bonito, RJ

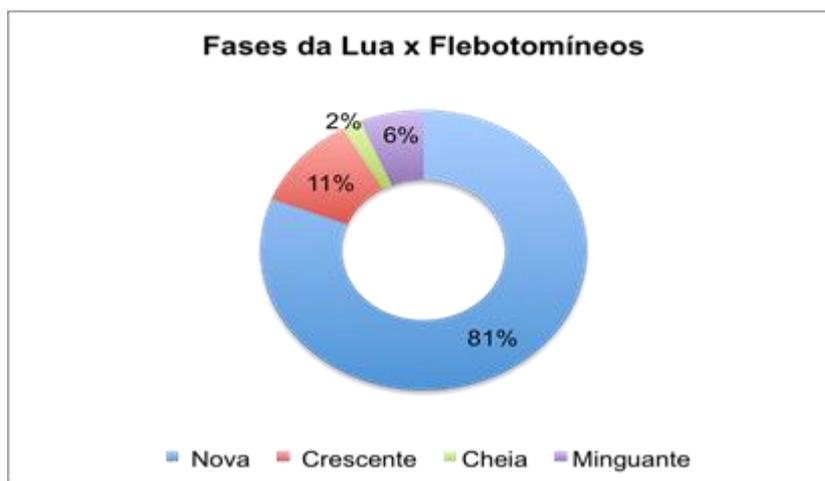


Figura 28 Proporção de flebotomíneos capturados durante as fases lunares no período de janeiro a junho de 2019 na localidade de Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ.

4.1. Resultados da infecção natural por *Leishmania* spp.

Foram analisadas, através da reação de PCR, 30 fêmeas de flebotomíneos sem resíduo de sangue no trato digestório, para diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* spp. Todas as amostras pertenciam a espécie *Nyssomyia intermedia*, cujo resultado foi negativo para infecção por este tripanossomatídeo (Figura 29).

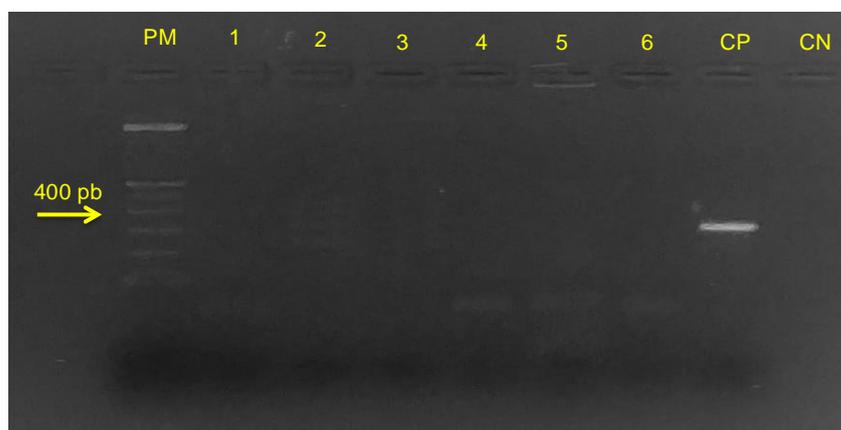


Figura 29: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp em fêmeas de flebotomíneo coletadas em Catimbau Grande, Rio Bonito, RJ, no período de janeiro a junho de 2019. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (400pb); CN: Controle negativo (água pura livre de DNA); CP: controle positivo de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); Amostras 1 a 6: fêmeas de *Nyssomyia intermedia* negativas;

5. DISCUSSÃO

A subfamília Phlebotominae no Novo Mundo pode ser dividida em duas tribos: Hertigiini, que é mais primitiva não possuindo espécies de interesse médico e Phlebotomiini, mais numerosa possuindo espécies de importância para a saúde pública. A tribo Phlebotomiini é dividida em seis subtribos onde, quatro ocorrem no Brasil. São elas: Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina. As duas primeiras, possuem, cada uma, apenas um gênero encontrado no estado do Rio de Janeiro (gêneros *Brumptomyia* e *Micropygomyia*, respectivamente). As outras duas possuem mais gêneros já descritos nesse mesmo Estado. Galati (2018), relata existir cerca de 544 espécies descritas de flebotomíneos no continente americano sendo divididas em 29 gêneros. Mais da metade ocorrendo em território brasileiro, destas, 51 espécies já foram registradas no estado do Rio de Janeiro. No atual trabalho encontramos somente o gênero *Migonemyia*, que pertencem à subtribo Lutzomyiina, além do gênero *Nyssomyia* pertencentes à subtribo Psychodopygina (GALATI, 2018; SHIMABUKURO, 2011)

O presente estudo buscou realizar um levantamento da fauna flebotomínica no município de Rio Bonito (RJ), na localidade de Catimbau Grande, onde, na década de 90, foi realizado por Almeida (1992) um estudo que identificou as seguintes espécies de flebotomíneos *Nyssomyia intermedia* (3071), *Migonemyia migonei* (228), *Pintomyia fischeri* (44), *Lutzomyia longipalpis* (2), *Micropygomyia schreiberi* (1).

Entre os meses de janeiro e junho de 2019, nesta mesma localidade, foram capturados flebotomíneos das espécies *Nyssomyia intermedia*, espécie mais abundante e *Migonemyia migonei*. Ambas as espécies consideradas vetores do protozoário *Leishmania braziliensis*, causador da LTA no Brasil. Foram utilizadas para captura dos flebotomíneos armadilhas luminosas HP (tipo CDC), modificadas de acordo com Fuzari, 2016 por ser considerada para o referido estudo como a mais adequada.

Ny. intermedia pertencente ao gênero *Nyssomyia*, é apontada como uma das espécies mais importantes na transmissão do parasito causador de LTA no Brasil. É encontrada nas regiões serranas ou litorâneas onde os focos de *Leishmania braziliensis* se apresentam em ambientes florestais com condições alteradas. Esta

espécie é mais frequente, no domicílio e peridomicílio, podendo utilizar este último como abrigo ou colonizá-los (GOMES et al 1986; BRAZIL et al., 1991a). Entende-se que junto com *Ny. neivai* constituem um complexo de espécies (MARCONDES et al, 1995) e sua disposição geográfica vai desde o Estado do Piauí até o do Rio Grande do Sul e do litoral do Brasil ao norte da Argentina e sul da Bolívia, decorrendo em áreas de altitude e clima bastante diversificados. Altamente antropofílica, apresenta alta habilidade endofílica. Rangel et al. (1984) e Forattini & Santos (1952) relatam o encontro desta espécie infectada naturalmente no norte do Estado do Paraná e Rio de Janeiro, respectivamente.

No Estado do Rio de Janeiro, *Ny. intermedia* possui uma distribuição bem ampla, sendo encontrada, na maioria das vezes, como a espécie mais frequente nos estudos (ALVES, 2007; BRAZIL et al. 1991; RANGEL et al. 1984, 1986, 1990; SOUZA et al. 2001, 2002; SOUZA et al. 2003; BRAZIL et al. 2011) Fuzari e colaboradores (2013, 2016) mostrou sua presença nos ambientes de peridomicílio.

No estudo, esta espécie esteve presente em todos os pontos de captura, tanto no peridomicílio como no extradomicílio. Por se tratar de uma área muito degradada, transformada em pasto para criação de gado, não se observa mais nenhum vestígio de vegetação, apenas algumas ilhas de matas nativas distantes consideravelmente dos pontos de coleta.

Migonemyia foi outro gênero registrado no presente estudo, representado somente pela espécie *Mg. migonei*. Falqueto (1995) demonstrou que esse flebotomíneo apresentou grande afinidade pelo homem e pelo cão no ambiente domiciliar. Esta espécie é amplamente distribuída em todas as regiões do país. No Rio de Janeiro foi registrada em praticamente todo o estado (RANGEL et al. 1986; RANGEL et al. 1990; BRAZIL et al. 1991; SOUZA et al. 2001; SOUZA et al. 2002; SOUZA et al. 2003; de SOUZA et al. 2003; BRAZIL et al. 2011; PITA-PEREIRA et al, 2005; AFONSO et al, 2007; FUZARI et al, 2013, 2016). Na área de estudo, *Mg. migonei* foi encontrado nos pontos de coleta P1 e P2, com poucos exemplares capturados.

De acordo com Almeida, 1992. Em um ano de coletas obteve-se um total de cinco espécies *Nyssomyia intermedia*, *Mg. migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Lu. longipalpis* e *Micropygomyia schereiberi*. *Ny intermedia* foi a espécie mais adaptada

aos dois ambientes estudados na época. A presença de *Ny. intermedia* e *Mg. migonei* no peridomicílio foram apontadas como as espécies mais abundantes, fato que sugere um alto nível de ação antrópica com risco de transmissão, já que estas espécies são consideradas suspeitas de transmitirem a LTA (ALMEIDA, 1992).

Em comparação com a fauna observada no estudo realizado há 20 anos, podemos sugerir uma redução na densidade de flebotomíneos e no número de espécies, provavelmente devido a degradação ambiental. As alterações ambientais provocadas pelo homem nessa localidade, podem sugerir que a espécie *Ny. intermedia* parece ter encontrado uma maior capacidade adaptativa a este ambiente modificado, transformando-a na principal espécie encontrada no estudo atual.

A espécie *Ny. Intermedia*, no trabalho de Almeida (1992) foi a que apresentou maior densidade, dado que também foi constatado pelo estudo realizado no período de janeiro a junho de 2019.

Vale a pena ressaltar que *Mg. migonei*, além de apresentar grande afinidade pelo homem e pelo cão no ambiente domiciliar, conforme Falqueto (1995), aqui nesta pesquisa, apesar dos poucos exemplares, aparecerem em maior número no peridomicílio, o que corrobora com o autor acima, e pode estar envolvida na transmissão de LTA no ambiente antrópico também.

Baseado nestas observações podemos concluir que existe uma interdependência bem definida se considerar entre o homem e o meio ambiente, onde toda ação realizada pelo mesmo de forma irresponsável poderá acarretar alterações ambientais irreversíveis levando a uma degradação ambiental. Nas áreas de ambiente modificado, a transmissão ocorre no ambiente domiciliar, atingindo de ambos os sexos, assim como, todos os grupos etários, com tendência à concentração dos casos em um mesmo foco (ALMEIDA, 1992). Sendo assim, é importante salientar que instituições e a população, compreendam a necessidade do desenvolvimento de estratégias e tecnologias para prevenir, amenizar e tratar o impacto dos desequilíbrios ambientais na saúde das populações humanas (FERNANDES, 2005).

Alguns trabalhos mostraram a interferência de fatores climáticos sobre a densidade populacional de flebotomíneos, indicando uma correlação significativa

entre o número de flebotomíneos capturados e a pluviosidade e umidade, enquanto que a temperatura não teve efeito significativo sobre estes insetos (BARATA et al 2004, ALMEIDA et al 2010; BASTOS et al 2016). No entanto, em outros trabalhos, estes fatores não constituíram fatores determinantes da densidade dos adultos (CONDINO et al 1995; DIAS et al 2007).

Embora se saiba que o estudo de sazonalidade só apresenta dados confiáveis e consistentes quando se tem uma investigação longa (no mínimo, dois anos consecutivos) para comparação dos resultados, diminuindo-se a margem de erros proporcionados por anos atípicos (DIAS et al 2007), neste estudo observou-se uma correlação, mesmo que fraca, da densidade de flebotomíneos em relação a variável temperatura.

Sabe-se que 75% das doenças transmitidas aos humanos possuem origem nos animais, onde a coexistência entre pessoas é crescente, quanto ao número de animais domesticados no ambiente domiciliar, considerando que a grande maioria deles fazem parte do êxodo rural que invadem as zonas urbanas. O costume de possuir estes animais como companhia e, frequentemente, como “membro” da família, tornou-se normal (SAÚDE, 2006). Atualmente, algumas famílias criam seus animais, com costumes muito próximos aos de seus donos, aumentando assim, o risco da transmissão de doenças, como as leishmanioses (FALQUETO, 1995).

Além da globalização associada a urbanização desenfreada, as alterações ambientais, podem ser provocadas pelo intenso processo migratório, por pressões sociais ou econômicas, o empobrecimento consequente de distorções na distribuição de renda, o processo de urbanização progressiva, o esvaziamento rural e as secas periódicas proporcionam a expansão das áreas endêmicas e o surgimento de focos vetoriais (SCARLATO, 1999).

A LTA é uma doença que retrata cadeia de transmissão complexa, estando exposta, numa mesma região, a variáveis determinantes tais como: desequilíbrio ambiental provocado pela invasão antropogênica aos nichos naturais da doença, variações sazonais e susceptibilidade da população (DOURADO et al. 1989). Vale a pena ressaltar que na área em estudo a LTA é uma doença de ocorrência esporádica (último caso notificado de LTA na região foi no ano de 2008),

independente das ações específicas de combate realizadas pela Secretaria Municipal de Saúde de Rio Bonito.

6. CONCLUSÃO:

- *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia migonei* foram as espécies encontradas no estudo, sendo *Ny. intermedia* a mais abundante;
- O maior número de flebotomíneos coletados ocorreu no mês de janeiro, coincidindo com a estação do verão, e o menor número de flebotomíneos coletados ocorreu entre os meses de maio e junho, na estação do outono;
- No diagnóstico de infecção natural, através da PCR, não foi encontrada fêmea infectada em nenhum dos espécimes coletados.
- Houve alteração da fauna existente na localidade de estudo com a redução dos flebotomíneos e espécies conforme estudo da década de 90.
- Os dados coletados são insuficientes para afirmar, mas pode sugerir que, a redução de espécies vetoras dos agentes etiológicos das Leishmanioses, foi devido às alterações ambientais provocado pelas atividades antropogênicas na localidade do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, RB. **Criadouros naturais de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em floresta de terra-firme na Vila do Pitinga**, Estado do Amazonas. 2003.

ALEXANDER, B. **Sampling methods for phlebotomine sandflies**. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.

ADLER S., THEODOR O. **Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies**. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 2, p. 203-226, 1957.

AFONSO, MM et al. **Data on sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Itatiaia National Park, Rio de Janeiro state, Brazil**. Cad Saude Publica 23: 725-730. 2007.

AGUIAR GM, et al. **Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro. IV – Frequência Mensal em Armadilhas Luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 80(4): 465-482.

ALMEIDA, PS de et al. **Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 43, p. 723-727, 2010.

ALMEIDA, DC. de. **Estudo da Fauna Flebotomínea (Diptera: Psychodidae) na localidade de Catimbau Grande município de Rio Bonito, estado do Rio de Janeiro**.1992. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biofísica – UFRJ, Rio de Janeiro. 1992.

ALVAR, J. et al. **Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence**.Plos One 7(5):e 35671.

ALVAR, J; YACTAYO, S; CARYN, B. 2006. **Leishmaniasis and poverty.** *Trends in Parasitology* 12 (22): 552-557.

ALVES, JRC. **Espécies de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) da fazenda São José, município de Carmo, estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2008. 133f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ALVES, JRC. **Espécies de Lutzomyia França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) em Área de Leishmaniose Tegumentar no Município de Carmo, RJ.** *Neotropical Entomology*. 2007 36(4): 593-596.

BARATA, RA et al. **Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 481-487, 2004.

BASTOS, TSA; LINHARES, GFC; MADRID, DMC. **Identificação morfológica de flebotomíneos capturados em área urbana.** *Ciência Animal Brasileira*, v. 17, p. 395-401, 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília, 2014, 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2^o. ed. Brasília: MS 2017; 182 p.

BRAZIL et al. **Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini Review.** *Entomol Ornithol Herpetol*. 2015, 4:2.

BRAZIL RP, et al. **The sand fly fauna (Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema, State of Rio de Janeiro, Brazil, an endemic area of cutaneous leishmaniasis transmission.** *J Vector Ecol*. 2011 Mar 36 (Suppl) 1:95-98.

BRAZIL, RP; BRAZIL, BG. **Biologia de flebotomíneos do Brasil**, In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2018. cap. 4, p.257-274.

BRAZIL, RP et al. **Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil**. In M. Maroli [ed.], proc. 1st Int. Symposium on phlebotomine Sandflies, 1991 a. Rome. Parasitologia. 33(1): 113-117.

CABRERA, MAA et al. **Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2003 45: 79-83.

CACERES, AG. **Distribucion geografica de *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector de la batonellosis humana en el Peru**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 485-490, 1993.

CARVALHO, MR et al. **Natural Leishmania infantum infection in Migonemyia migonei (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco state, Brazil**. Acta Trop 116: 108-110. 2010.

CASAGRANDE, B. **Biogeografia da saúde: distribuição espacial dos vetores e o complexo patogênico da leishmaniose tegumentar americana**. 2018. 217 f. Tese (Doutorado) - Curso de Geografia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Presidente Prudente, 2018.

CASAGRANDE, B. **Flebotomíneos encontrados no assentamento de reforma agrária Bom Jardim, município de Araguari - MG**. 2006. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Geografia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

CHANCE, ML. **The biochemical and immune taxonomy of Leishmania**. In: **Chang/ Gray** (eds). Elsevier Science Publishing Company, USA, p. 93-110, 1985.

COLACICCO-MAYHUGH, MG.; MASUOKA, PM.; GRIECO, J. P. **Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the**

Middle East. International Journal of Health Geographics, London, v. 9, n. 2, p.1-9, 2010.

CONDINO, MLF et al. **Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31: 355-360, 1998.

COQUILLET, DW. **Discovery of blood sucking Psychodidae in America.** Entomological News, Philadelphia, v. 18, p. 101-102, 1907.

CUTOLO, AA & VON ZUBEN, CJ. **Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de cerrado no município de Corumbataí, centro-leste do estado de São Paulo.** Rev Bras Parasitol Vet. 2008; 17(1):45-9.

CUPOLILLO, E et al. **Genetic Diversity in Natural Populations of New World Leishmania.** Mem, Inst. Oswaldo Cruz 93(5). Sep. 1998.

DEDET, JP; VIGNES, R; RANGEL, EF. **Morfologia e taxonomia: grupo CIPA.** In: RANGEL, EF.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. cap. 2, p. 177-184.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, Oxford, v.27, n. 5, p. 305–318, 2004.

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

DOURADO, MI et al. **Epidemiology of tegumentary American leishmaniasis and its relations with agriculture and prospecting, in a locality of the State of Bahia, Brazil.** Rev Saude Publica. 1989 Feb;23(1):2-8.

FALQUETO, A. **Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo**. 1995. 84 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1995.

FEITOSA, MAC; CASTELLÓN, EG. **Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil: II. Estratificação horizontal**. Acta Amazônica, v. 34, p. 121-127, 2004.

FERNANDES, PV. **Impacto ambiental: doutrina e jurisprudência**, São Paulo: Editora Revista dos Tribunais, 2005.

FERRO, C et al. **Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae)**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 195-199, 1998.

FORATTINI, OP. **Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae)**. Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 25, p. 209-215, 1960.

FORATTINI, OP. & SANTOS, MR. **Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912 por formas de leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana**. Arq. Fac. Hig. Saúde Públ. São Paulo, 17: 171-174, 1952.

FUZARI, AA et al . **Presence of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the Parque Estadual da Serra da Tiririca, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil**. 2016. Rev Soc Bras Med Trop 49(5): 616-619.

FUZARI, AA et al. **The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil**. 2013. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(7): 943-946.

FUZARI, AA. **Estudo da Fauna Flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil**,

2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

GALATI, EAB. 2021. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública.** Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.133p. Disponível em: < <http://www.fsp.usp.br/egalati> >

GALATI, EAB. **Phlebotomine (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos (apostila). Vol 1.** São Paulo: USP, 2018, 139 p.

GALATI, EAB. **Morfologia e taxonomia: classificação de *Phlebotominae*.** In: RANGEL, EF.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. cap. 2, p. 23-52.

GOMES, AC. & GALATI, EAB. 1986. **Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7. Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do Sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil.** Rev. Saúde Pública, 23:136 - 142.

GONTIJO, CMF; MELO, MN. **Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas.** Revista Brasileira de Epidemiologia, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, p.338-349, set. 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>

LAINSON, R; RYAN, L; SHAW, JJ. **Infective stages of *Leishmania* in the sandy vector and some observations on the mechanism of transmission.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 82, p. 200-207, 1987.

LEITE, ACR; WILLIAMS, P. **The First Instar larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, n. 2, p. 197-203, 1997.

LEWIS, DJ. **The biology of *Phlebotomidae* in relation to leishmaniasis.** Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 19, p. 363-384, 1974.

LOPES, UG et al. **Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci visceral and cutaneous Leishmaniasis.** Journal of Parasitology 1984 70:89- 98.

LUTZ, A; NEIVA, A. **Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 84-95, 1912.

MARCONDES, CB. **A study on *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 complex: Two species can be distinguished. (*L. intermedia* ST and *L. mariae* SP. N.).** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 90 (Suppl. I), 1995: 235.

MADEIRA, MF et al. **Mixed infection with *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2006. 100: 442-445.

MADEIRA, MF et al. **Canine leishmaniasis: a serological survey of 310 dogs in Itaipu, Rio de Janeiro, Brazil.** Cad Saúde Pública. 2000. 16(2): 568.

MARZOCHI, MC et al. **Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control.** Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Sep-Oct;42(5):570-80.

MARZOCHI, MC et al. **Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983).** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 Jul-Sep; 80 (3):.349-57.

MARZOCHI & MARZOCHI, **Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro.** Parasitol Today. 1994 Jan;10(1): 37-40.

MELO, C de; ORLANDO, PHK. **Acessibilidade no parque do sabiá na cidade de Uberlândia (MG)**. Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades, Tupã, v. 2, n. 9, p.34-50, 2014. <https://doi.org/10.17271/23188472292014735>

MONTEIRO, CC. **O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada**. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte.

MORALES, A; BELLO, F; CARDENAS, E. **Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia**. Revista Ciencias de La Salud, Bogotá, v. 3, n. 2, p. 129-135, 2005.

MS. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**, Brasília, 2010.

NASCIMENTO, BWL. **Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2013.

PÉREZ J et al.. **Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Feb; 109(1):80-6. doi: 10.1590/0074-0276130224. Epub 2013 Nov 4. PMID: 24271002; PMCID: PMC4005524.

PITA-PEREIRA, D et al. **Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay**. 2005. Trans R Soc Trop Med Hyg 99: 905-913.

OLIVEIRA, AG et al. **Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000.** Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 933-944, 2003.

OVALLOS, FG. **Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*** Cunha & Chagas. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade São Paulo, São Paulo.

PACHECO, RS et al. **Momen H. Schizodeme analysis of Leishmania isolates and comparisom with some phenotypic techniques.** In: J. A. Rioux. **Leishmania. Taxonomie et Phyllogenèse. Applications Écoépidémiologiques**, Montpellier: IMEEE; 1986. p. 57-65.

PIMENTA, PFP; SECUNDINO, NFC; BLANCO, EEN. **Interação leishmania-hospedeiro invertebrado.** In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. cap. 5, p. 275-290.

QUARESMA, PF. **Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores.** 2011. 167f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte.

RANGEL, EF; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. 367 p.

RANGEL, EF et al. **Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990 Jan-Mar;85(1):39-45.

RANGEL, EF et al. **Phlebotomus of Vargem Grande, a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986 Jul-Sep; 81(3):347-9.

RANGEL, EF; SOUZA, NA; WERMELINGER, ED; BARBOSA, AF. **Infecção Natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, em Área Endêmica de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 1984 79(3): 395-396.

RESENDE MC, et al. **Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais.** Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39:51-55.

REYES-URIBE, P et al. **Comparative zymographic analysis of metallopeptidase of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from Peru.** Parasitology International, Amsterdam, v. 61, n. 4, p. 513–519, 2012.

RIO DE JANEIRO (Estado). Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Informe Técnico 004/2014, GDTVZ. **Descentralização de Medicamentos Estratégicos. Tratamento das doenças: Malária, Febre Maculosa, Esquistossomose, Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral,** 2014.

RODRIGUES, EAS. **Alterações ambientais e os riscos de transmissão da leishmaniose Tegumentar Americana na Área de Influência da UHE Serra do Facão, Goiás, Brasil.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geografia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SANTOS-DEMARCO, T. **Determinantes ecológicos da flutuação populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Estado do Paraná, Brasil.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, UFMG. 67p, 1997

SAÚDE, Ministério da Secretaria de Vigilância em Saúde; **Manual de vigilância da leishmaniose visceral,** 2ª ed; Brasília – DF, 2006

SCARLATO, FC. **O ambiente urbano;** São Paulo: Atual, 1999 (Série meio ambiente).

SCORZA, JV; ORTIZ, I. & GOMEZ, I. **Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 2. Microhabitats de Phlebotomus spp. (Diptera, Psychodidae).** Acta Biologica Venezuelica, 6(1):1-27. 1968a

SCORZA, JV; ORTIZ, I. & GOMEZ, I., **Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 6. Sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomofauna de Rancho Grande.** Acta Biologica Venezuelica, 6(2): 76-83. 1968b.

SCORZA, JV; ORTIZ, I. & GOMEZ, I., 1968c. **Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 8. Sobre la fluctuación estacional de los microhabitats.** Acta Biologica Venezuelica, 6 (3-4):97-104. Secretaria de Estado de Saúde, Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) Campo Grande, MS, 2003.

SHIMABUKURO, PHF; GALATI, EAB. **Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica.** Biota Neotropica, São Paulo, v. 11, n. 1, 2011.

SHIMABUKURO, PHF; TOLEZANO, JE; GALATI, EAB. **Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo.** Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia, São Paulo, v. 51, n. 27, p. 399-441, 2011.

SOUZA, MB et al. **Fauna Flebotomínica do Município de Bom Jardim, Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** Rev. Bras. Parasitol Vet. 2003 12 (4): 150-153 (Brazil. J. Vet. Parasitol)

SOUZA, NA et al. **Seasonality of Lutzomyia intermedia and Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Sept; 97(6):759- 65.

SOUZA, NA et al. **The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic Rain Forest Reserves in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001 Apr; 96(3):319-24.

YOUNG, DG; DUNCAN, MA. **Guide to the identification and geographic distribution of lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville: Memoirs of the American Entomological Institute, n. 54, 1994. 887

VARIZA, PF. **Caracterização da fauna de flebotomíneos (Diptera: psychodidae) no sul de Santa Catarina, Brasil**. 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2016.

WHO (World Health Organization) 2011. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>