

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

JEFFERSON RODRIGO FREITAS DE ALBUQUERQUE

IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS NO MUNICÍPIO DE
TIMBAÚBA/PE E CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE *Lutzomyia migonei*
(FRANÇA, 1920) (DIPTERA: PSYCHODIDAE) VETOR DE *Leishmania* spp.

RECIFE

2018

JEFFERSON RODRIGO FREITAS DE ALBUQUERQUE

**Identificação das espécies de flebotomíneos no município de Timbaúba/PE e
caracterização dos hemócitos de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) (Diptera:
Psychodidae) vetor de *Leishmania* spp.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientador: Dr. Luiz Carlos Alves

RECIFE

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A345i Albuquerque, Jefferson Rodrigo Freitas de.
Identificação das espécies de flebotomíneos no município de Timbaúba/PE e caracterização dos hemócitos de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae) vetor de *Leishmania* spp / Jefferson Rodrigo Freitas de Albuquerque. - Recife: [s.n.], 2018.

68 p. : il., graf., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Orientador: Luiz Carlos Alves.

1. Psychodidae - classificação. 2. Psychodidae - imunologia. 3. Flebótomo. 4. Hemócitos. 5. Imunidade inata. I. Alves, Luiz Carlos. II. Título.

CDU 616.993.161

JEFFERSON RODRIGO FREITAS DE ALBUQUERQUE

**Identificação das espécies de flebotomíneos no município de Timbaúba/PE e
caracterização dos hemócitos de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) (Diptera:
Psychodidae) vetor de *Leishmania* spp.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

DATA DE APROVAÇÃO: 28/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Luiz Carlos Alves
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Prof^a. Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Prof^a Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

A minha mãe Cleovaní Cássia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, ao meu Deus, pois sem Ele não poderia chegar a lugar algum. Foi Ele quem me sustentou nos momentos mais difíceis desta caminhada e colocou dentro de mim uma paz que excede todo o entendimento humano;

A minha mãe Cleovaní Cássia, uma verdadeira guerreira, por todos os seus investimentos, legados e lições que me passou;

Aos meus orientadores, Professores Luiz Carlos Alves e Fábio André Brayner dos Santos que não mediram esforços para que fosse possível concluir este trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos, correções, auxílios e por acreditarem no meu potencial;

A todos os componentes do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e do LIKA por todas as conversas e técnicas compartilhadas, em especial a Olavio Campos que esteve mais próximo durante a execução deste trabalho;

Aos meus familiares, em especial Osvaldo Fernandes pelos momentos de descontração e companheirismo;

Aos amigos que carregou de longa data que estiveram comigo nessa jornada, em especial Aline Larissa, Iany Raíssa e Aleff Cavalcante.

“E a paz de Deus, que excede todo o entendimento, guardará os vossos corações e os vossos pensamentos em Cristo Jesus.”

Filipenses 4:7

ALBUQUERQUE, Jefferson Rodrigo Freitas de. **Identificação das espécies de flebotomíneos no município de Timbaúba/PE e caracterização dos hemócitos de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae) vetor de *Leishmania* spp.** 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* cujos vetores são flebotomíneos (Ordem Diptera; Família Psychodidae; subfamília Phlebotominae). Estudos realizados em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar e visceral tem demonstrado a presença do flebotomíneo *Lutzomyia migonei* como importante vetor na transmissão da leishmaniose tegumentar e, na ausência de *Lutzomyia longipalpis*, também da leishmaniose visceral. Apesar de a literatura apresentar muitos estudos sobre a fauna flebotomínica, muitos aspectos relacionados a resposta imune dos flebotomos vetores ainda permanecem desconhecidos. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo quantificar e caracterizar os hemócitos envolvidos na resposta imune celular inata de *Lu. migonei*, assim como fazer o levantamento da fauna flebotomínica no município de Timbaúba, área endêmica de leishmaniose tegumentar de Pernambuco. Os insetos foram mantidos no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA-UFPE/PE. A coleta da hemolinfa para caracterização dos hemócitos foi realizada com um micromanipulador. As células foram quantificadas e caracterizadas através da microscopia de campo claro e da microscopia eletrônica de transmissão e foram classificadas como prohemócitos, granulócitos, adipohemócitos, plasmatócitos e eonocitóides. Já a identificação dos espécimes utilizou-se de chave taxonômica e classificou os flebotomíneos em seis espécies: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. evandroi*, *Lu. wellcomei*, *Lu. quinquefer* e *Lu. sordellii*.

Palavras chave: *Lutzomyia*. Flebotomo. Hemócitos. Imunidade inata. Classificação.

ALBUQUERQUE, Jefferson Rodrigo Freitas de. **Identification of sandfly species in the municipality of Timbaúba/PE and characterization of the hemocytes of *Lutzomyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae) vector of *Leishmania* spp.** 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

Leishmaniasis is among the most neglected diseases in the world. They are caused by protozoa of the genus *Leishmania* whose vectors are phlebotomines (Diptera Order, Family Psychodidae, subfamily Phlebotominae). Studies in endemic areas of tegumentary and visceral leishmaniasis have demonstrated the presence of phlebotomine *Lutzomyia migonei* as an important vector in the transmission of tegumentary leishmaniasis and, in the absence of *Lutzomyia longipalpis*, also of visceral leishmaniasis. Although the literature presents many studies on phlebotomine fauna, many aspects related to the immune response of the phlebotomine vectors still remain unknown. Thus, the present study aims to quantify and characterize the hemocytes involved in the innate cellular immune response of *Lu. migonei*, as well as the survey of the phlebotomine fauna in the municipality of Timbaúba, an endemic area of tegumentary leishmaniasis of Pernambuco. The insects were kept in the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami-LIKA-UFPE / PE. Hemolymph collection for haemocyte characterization was performed with a micromanipulator. Cells were quantified and characterized by light field microscopy and transmission electron microscopy and were classified as prohemocytes, granulocytes, adipohemocytes, plasmatocytes and eonocytes. The identification of the specimens was used as a taxonomic key and classified the sandflies into six species: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. evandroi*, *Lu. wellcomei*, *Lu. quinquefer* and *Lu. sordellii*.

Key words: *Lutzomyia*. Sandfly. Hemocytes. Innate immunity. Classification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	22
Figura 2 - Formas amastigotas no interior de um macrófago.	22
Quadro 1 - Principais espécies de leishmanias incriminadas com a LTA no Brasil.	23
Figura 3 - Flebotomíneo fêmea.	23
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Lutzomyia</i> spp.	26
Figura 5 - Genitália de macho de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	27
Figura 6 - Espermatecas de fêmeas de flebotomíneos	27
Figura 7 - Cibários de fêmeas de flebotomíneos.	28
Figura 8 - Esquema do ciclo de vida heteroxênico de <i>Leishmania</i> spp.	29
Figura 9 - Formas de <i>Leishmania</i> spp encontradas no inseto vetor.	30
Figura 10 - Mecanismos imunes efetores de insetos.	31
Figura 11 - Classificação dos hemócitos de acordo com a localização.	33
Figura 12 - Hemócitos mais comuns na hemolinfa de insetos.	34
Figura 13 - Limites geográficos do município de Timbaúba	36
Figura 14 - Armadilha luminosa tipo CDC	37
Figura 15 - Aspecto dos ovos de <i>Lu. migonei</i> visualizados com auxílio de estereomicroscópio	39
Figura 16 - Micromanipulador associado a estereomicroscópio	40
Figura 17 - Valores relativos das espécies de flebotomíneos de Timbaúba/PE	44
Figura 18 - Parâmeros de <i>Lu. whitmani</i> e <i>Lu. migonei</i>	45
Figura 19 - Cibários de <i>Lu. whitmani</i> e <i>Lu. migonei</i>	46
Figura 20 - Destaque em espermateca de <i>Lu. whitmani</i>	47
Figura 21 - Destaque em espermateca de <i>Lu. migonei</i>	47
Figura 22 - Percentual relativo dos hemócitos encontrados na hemolinfa de <i>Lu. migonei</i>	49

Figura 23- Hemócitos de <i>Lu. migonei</i> observados através da microscopia óptica	50
Figura 24- Plasmatócito de <i>Lu. migonei</i> observados através da microscopia óptica	51
Figura 25- Eonocitoide de <i>Lu. migonei</i> observado através de microscopia óptica	51
Figura 26- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de prohemócito de <i>Lu. migonei</i> .	52
Figura 27- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de granulócito de <i>Lu. migonei</i> .	52
Figura 28- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de adipohemócito de <i>Lu. migonei</i> .	53
Figura 29- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de plasmatócito de <i>Lu. migonei</i> .	53
Figura 30- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de eonocitóide de <i>Lu. migonei</i> .	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantitativo de flebotomíneos separados por espécie e sexo.

40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HIV -	Vírus da imunodeficiência humana
LT -	Leishmaniose Tegumentar
LTA -	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV -	Leishmaniose Visceral
LVA -	Leishmaniose visceral americana
pH -	Potencial hidrogeniônico
SINAN -	Sistema de Informação de agravos de Notificação
WHO -	World Health Organization

SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 PERGUNTA CONDUTORA	17
4 OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo geral	18
4.2 Objetivos específicos	18
5 REFERENCIAL TEÓRICO	19
5.1 Leishmanioses	19
5.2 Situação epidemiológica	20
5.3 Agentes etiológicos	21
5.4 Flebotomíneos	23
5.4.1 Ciclo biológico dos flebotomíneos	25
5.4.2 Taxonomia dos flebotomíneos	26
5.5 Ciclo de transmissão das leishmanioses	28
5.6 Sistema imune de insetos	30
5.6.1 Sistema imune humoral	32
5.6.2 Sistema imune celular	32
6 MATERIAIS E MÉTODOS	36
6.1 Local de estudo	36
6.2 Captura de flebotomíneos	36
6.2.1 Classificação dos flebotomíneos	37
6.3 Estabelecimento e manutenção da colônia de <i>Lutzomyia migonei</i>	39
6.4 Coleta de hemolinfa	40
6.5 Caracterização dos hemócitos	41
6.5.1 Microscopia de campo claro	41
6.5.2 Contagem diferencial dos hemócitos	41
6.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão	41
7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
8 RESULTADOS	44
9 DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae. De modo geral, essas enfermidades se dividem em leishmaniose tegumentar americana (LTA), que afeta a pele e as mucosas, e a leishmaniose visceral (LV), que acomete órgãos como o fígado e baço. A transmissão das leishmanioses ocorre através da picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomyia* no Novo Mundo (KENT *et al.*, 2013).

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses estão enquadradas na categoria número um, descritas como doenças emergentes e sem controle, sendo a prevenção baseada majoritariamente em 3 parâmetros, incluindo o controle vetorial, controle dos reservatórios animais e a pesquisa e desenvolvimento de potenciais candidatos a vacina (JAIN; JAIN, 2015). No entanto, as grandes lacunas existentes no que se refere a diversos aspectos relacionados a biologia dos flebotomíneos acarreta em fracasso dos métodos tradicionais de controle (MASCARI *et al.*, 2013).

Das mais de 480 espécies de flebotomíneos classificados nas Américas, aproximadamente 56 foram comprovadas ou são suspeitas em participar do ciclo de transmissão das leishmanioses no continente (GALATI, 2003; MAROLI *et al.*, 2013; SHIMABUKURO *et al.*, 2011). Entre estas, *Lutzomyia migonei* destaca-se por sua ampla distribuição no país e na América do Sul, alto grau de antropofilia e por ser capaz de vetorializar mais de uma espécie de *Leishmania* aos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2016). Estudos sobre a distribuição geográfica e prevalência das espécies de flebotomíneos em áreas endêmicas ou onde ocorreram surtos são importantes no sentido de elucidar aspectos relacionados a transmissão da doença, tais como a identificação das espécies vetoras ou o monitoramento da dispersão de espécies com importância epidemiológica, principalmente em centros urbanos (LINDHOLZ, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

O número relativamente pequeno de vetores se dá em razão de uma série de fatores fisiológicos e bioquímicos inerentes tanto aos insetos quanto aos parasitos (PIMENTA *et al.*, 2012), com o sistema de defesa do invertebrado podendo exercer papel determinante na resistência a uma infecção (HOFFMANN, 2003). Os artrópodes dependem unicamente da imunidade inata para se proteger de agentes infecciosos. De modo geral, o sistema de defesa dos invertebrados é pouco específico e se apoia sobre um sistema de defesa complexo que envolve reações celulares e humorais coordenadas (BAXTER *et al.*, 2017; LAVINE; STRAND, 2002). Na hemolinfa, que é o líquido que enche a hemocele de um inseto,

exercendo função análoga ao sangue e linfa em mamíferos, são encontrados os hemócitos, primeira linha de defesa celular em invertebrados (ROSALES, 2011).

Diversos insetos com revelância epidemiológica ou pragas agrícolas já tiveram suas células de defesa elucidadas e caracterizadas, entretanto os estudos de resposta imune celular em flebotomíneos são escassos, fazendo-se necessário uma investigação dessas células visando caracterizá-las e comparar com hemócitos de outros dípteros de importância médica.

2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são transmitidas aos hospedeiros vertebrados através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas com protozoários do gênero *Leishmania*. Nas Américas, todos os insetos vetores pertencem ao gênero *Lutzomyia* e há uma estreita relação entre as espécies vetoras com os agentes etiológicos das diferentes apresentações clínicas da doença. Assim, a identificação das espécies de flebotomíneos de uma área é de grande valia, visto que o conhecimento desta fauna específica pode auxiliar e direcionar os esforços para o controle desta moléstia.

Um flebotomíneo de grande importância é *Lutzomyia migonei* que está amplamente distribuído na América do Sul e no Brasil pode ser encontrado nas cinco regiões brasileiras. Esta espécie figura entre os principais vetores de leishmaniose tegumentar americana e mostrou-se ser permissiva ao processo de metaciclogênese de *Leishmania infantum*. Desta forma pode assumir também o papel de vetor de leishmaniose visceral, em situações específicas, como na ausência do principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*. Tendo em vista a importância de *Lu. migonei* no ciclo de transmissão das leishmanioses, a investigação da resposta imune deste vetor se faz necessário para o entendimento sobre a interação parasito-hospedeiro. Diante desse cenário, o presente estudo tem por objetivo identificar e caracterizar pela primeira vez, do ponto de vista morfométrico e ultra-estrutural os hemócitos presentes na hemolinfa de *Lu. migonei*.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais as espécies vetoras de flebotomíneos vetoras de leishmanioses no município de Timbaúba/PE e quais os tipos celulares e as características dos hemócitos presentes na hemolinfa de *Lutzomyia migonei* sob o ponto de vista morfométrico e ultra-estrutural?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificação das espécies de flebotomíneos no município de Timbaúba/PE e caracterização dos hemócitos de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae) vetor de *Leishmania* spp.

4.2 Objetivos específicos

- a) Identificação das espécies de flebotomíneos no município de Timbaúba/PE;
- b) Identificar os tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de *Lu. migonei*;
- c) Descrever a morfometria dos hemócitos de *Lu. migonei*;
- d) Realizar a contagem diferencial dos hemócitos de *Lu. migonei*.

5 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 Leishmanioses

As leishmanioses são definidas como um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). São consideradas primariamente uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose (BRASIL, 2014). As manifestações da infecção por *Leishmania* podem variar de doença assintomática a clinicamente aberta que pode permanecer localizada na pele ou se disseminar nas mucosas nasal e respiratória superior ou em todo o sistema reticulo-endotelial (PACE, 2014), sendo geralmente aceitas, quatro classificações clínicas da doença: (1) Leishmaniose cutânea (LC), (2) Leishmaniose cutânea difusa (LCD), (3) Leishmaniose Mucocutânea (LM) e (4) Leishmaniose Visceral (LV) (KEVRIC *et al.*, 2015).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) compreende as formas clínicas, LC, LCD e LM, é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários digenéticos de transmissão vetorial, que acomete pele e mucosas. A LC apresenta formas ulceradas, indolores, normalmente localizadas em áreas expostas da pele; com formato arredondado ou ovalado; base eritematosa; infiltrada e de consistência firme; bordas bem delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras. Infecções bacterianas ou fúngicas secundárias podem estar presentes, causando dor e exsudato seropurulento (MIRANDA *et al.*, 2011; REY, 2008). A forma LM da doença pode ser desfigurante e até mesmo trazer risco de vida. O tratamento é essencial para controle da doença. Em países endêmicos, a porcentagem dos casos de LM com o envolvimento mucoso gira em torno de 3 a 5% (HANDLER *et al.*, 2015). Em algumas situações, a infecção pode se desenvolver de forma atípica, produzindo as formas disseminadas ou difusas. Os pacientes de LCD respondem mal ao tratamento específico, levando a cronicidade da infecção e ao acometimento progressivo (CONCEIÇÃO-SILVA, ALVES, 2014).

A LV, por sua vez, refere-se à manifestação clínica mais grave afetando órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea dos hospedeiros (PELLISSARI *et al.*, 2011). Clinicamente, a LV apresenta-se como uma enfermidade generalizada, crônica, caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, levando à caquexia e, até mesmo, ao óbito (ALVARENGA *et al.*,

2010). Quando não tratada, a LV é fatal em mais de 95% dos casos dentro de dois anos após o início da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

5.2 Situação epidemiológica

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo, afetando em sua maioria, a população pobre, principalmente nos países em desenvolvimento. Considerada uma das dez endemias mundiais prioritárias, ocupa o segundo lugar entre as seis doenças infecto-parasitárias mais frequentes do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010), com mais de um bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas sob o risco de contrair a doença, sendo aproximadamente 616 milhões para LV e 431 milhões para Leishmaniose Tegumentar (LT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

Anualmente, são esperados ao redor do mundo entre 700 mil a 1,3 milhão de novos casos de LT. Em relação a LV, as estimativas giram em torno de 200 a 400 mil novos relatos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). No ano de 2014, mais de 90% destes novos casos relatados ocorreu em apenas seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Entre os anos de 2010 a 2015, o Ministério da Saúde (MS) registrou média anual de 20.806 mil novos casos de LTA (BRASIL, 2016). No Brasil, a LTA fica somente atrás da malária, no grupo das protozooses transmitidas por vetores (BRASIL, 2017).

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LT constitui problema de saúde pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A LTA ocorre em todas as Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. A doença é encontrada em quase todos os países latino-americanos, com exceção do Chile e Uruguai. A LTA acomete ambos os sexos e todas as faixas etárias, entretanto na média do país, predominam os maiores de 10 anos, representando 90% dos casos e o sexo masculino, 74% (BRASIL, 2010; CURTI *et al.*, 2011).

No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de agentes etiológicos e de vetores, que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle (BRASIL, 2017).

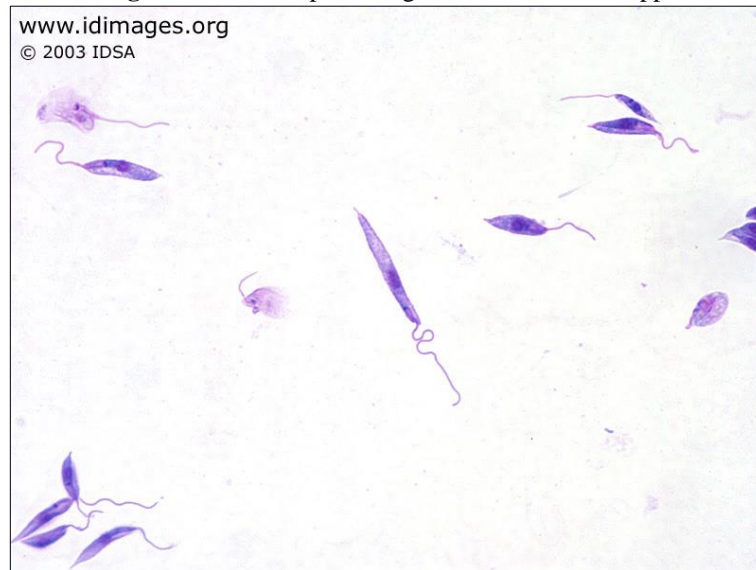
Por sua vez, a LV que era inicialmente uma doença rural passou a acometer áreas urbanas de pequeno e médio porte e, atualmente, ocorre em grandes centros urbanos. Isso se deu devido às mudanças ambientais resultantes dos processos de desmatamento, propiciando o processo de periurbanização e urbanização da doença, com estabelecimento dos flebotomíneos vetores em torno de habitações humanas e abrigos de animais, demonstrando sua adaptação aos ambientes modificados pelos humanos (AGRA *et al.*, 2016). Dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, a LV, que é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), torna-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (BRASIL, 2014). No Brasil, a média de casos de LV no período de 2010 a 2015, foi de 3.408 casos/ano, com uma taxa de letalidade de 7,8% em 2015 (BRASIL, 2017).

A Região Nordeste continua a ter maior número de casos de leishmaniose do País sendo o Estado de Pernambuco historicamente endêmico tanto para LTA como para LV, com 34% dos seus municípios endêmicos, sendo registrados casos das duas formas da doença em todas as suas regiões geográficas, a saber: Região Metropolitana do Recife (RMR), Zona da Mata, Agreste e Sertão (ARAUJO *et al.*, 2016).

5.3 Agentes etiológicos

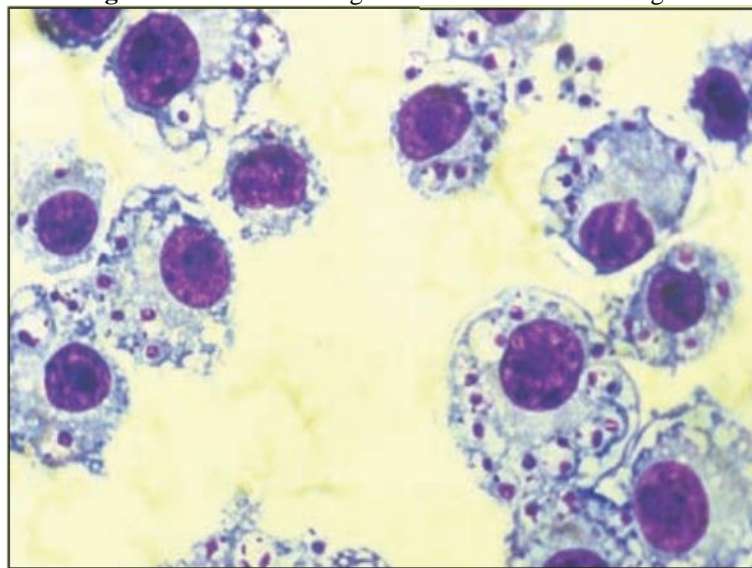
Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (flebotomíneos) (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Possuem duas formas principais; uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados; nestes são encontrados como parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (BRASIL, 2010) (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Formas promastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: Infectious Diseases Society of America (2003)

Figura 2- Formas amastigotas no interior de macrófagos



Fonte: Brasil (2006)

Nas Américas, são reconhecidas atualmente 11 espécies dermatrópicas de leishmanias causadoras de doença humana. No entanto, no Brasil só foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (Quadro1) (BRASIL, 2017).

Quadro 1- Principais espécies de leishmanias incriminadas com a LTA no Brasil.

Espécie
a) <i>L. (V.) braziliensis</i>
b) <i>L.(V.) guyanensis</i>
c) <i>L.(L.) amazonenses</i>
d) <i>L. (V.) lainsoni</i>
e) <i>L. (V.) naiffi</i>
f) <i>L. (V.) lindenberg</i>
g) <i>L. (V.) shawi</i>

Fonte: Brasil (2017)

Por outro lado, em pacientes diagnosticados com LV, no Novo Mundo, a espécie comumente isolada é *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Sinônimo: *Leishmania (Leishmania) infantum*) (BRASIL, 2014; PAZ *et al.*, 2015).

5.4 Flebotomíneos

Os flebotomíneos (Ordem Diptera; Família Psychodidae; Subfamília Phlebotominae) são os vetores das leishmanioses (BRAZIL; BRAZIL, 2014). Eles são insetos pequenos de 2 a 4 mm de comprimento, de cor palha ou castanho claro, possuem pernas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso (Figura 3).

Figura 3- Flebotomíneo fêmea

Fonte: Wilson (2009)

Têm como característica o voo saltitante e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso. São conhecidos, especialmente no Brasil, por diversos nomes populares como, anjinho, cangalhinha, mosquito palha, arrepiado, furrupa, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, ligeirinho, entre outros (BASANO; CAMARGO, 2004; DIAS, 2011). Embora seja encontrada em regiões temperadas, a maioria das espécies de flebotomíneos apresenta distribuição tropical e subtropical (BRAZIL; BRAZIL, 2014).

Os flebotomíneos diferem-se dos demais dípteros principalmente por desenvolverem todo seu estágio larval em matéria orgânica contida no solo e não em água. Quando adultos, apresentam dimorfismo sexual, alimentam-se de seiva para manter a homeostase, mas as fêmeas precisam de uma dieta sanguínea para maturação ovariana e prosseguir com a oviposição e manutenção do ciclo vital (BASTOS, 2012; TEMPONE *et al.*, 2014). São classificados como holometábolos com ciclo de vida envolvendo uma fase de ovo, quatro estádios larvais, seguindo de pupa e o estágio final de adulto alado (MONTEIRO, 2012). A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. Durante o dia, por causa do seu revestimento delgado, abrigam-se em locais que os protejam da dessecação com bom teor de umidade, matéria orgânica em decomposição, pouca ou nenhuma luminosidade e movimentação de ar (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; BRASIL, 2014).

Quanto a taxomia dos flebótomos, Lewis *et al.* (1977) utilizando-se de critérios práticos dividiram os flebotomíneos em cinco gêneros, dos quais três, a saber: *Brumptomyia* (FRANÇA; PARROT, 1921), *Warileya* (HERTIG, 1948) e *Lutzomyia* (FRANÇA, 1924) são representados no novo mundo, distribuídos em mais de 480 espécies (GALATI, 2003; SHIMABUKURO *et al.*, 2011). Destas, aproximadamente 56 espécies de flebotomíneos, todas pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, são supostos ou comprovados estarem envolvidos na transmissão de *Leishmania* spp. nas Américas (MAROLI *et al.*, 2013). A competência de uma espécie de flebotomíneo, de ser infectada e de se transformar em vetor, depende de vários fatores intrínsecos que determinarão a sua capacidade de ser susceptível ou refratário ao desenvolvimento de determinadas espécies de *Leishmania*. Esses fatores sugerem a existência de um processo de co-evolução entre as distintas espécies de *Leishmania* com os seus flebotomíneos vetores (PIMENTA *et al.*, 2003).

As principais espécies envolvidas com a transmissão da LTA no território brasileiro são: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (BRASIL, 2017).

Por outro lado, no Brasil, apenas duas espécies estão comprovadamente envolvidas com a transmissão da LV, *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*. (AGRA *et al.*, 2016), sendo *Lu.*

longipalpis o principal vetor na América Latina (SANTINI *et al.*, 2015), podendo também transmitir doenças bacterianas e virais (ALEXANDER, 1995; DA ROSA *et al.*, 1984). O flebotomíneo *Lu. longipalpis* reúne fortes evidências quanto à sua competência vetorial, assim como está intimamente ligada ao processo de expansão da doença, pois apresenta forte adaptação aos ambientes modificados pela ação antrópica (VILELA *et al.*, 2014).

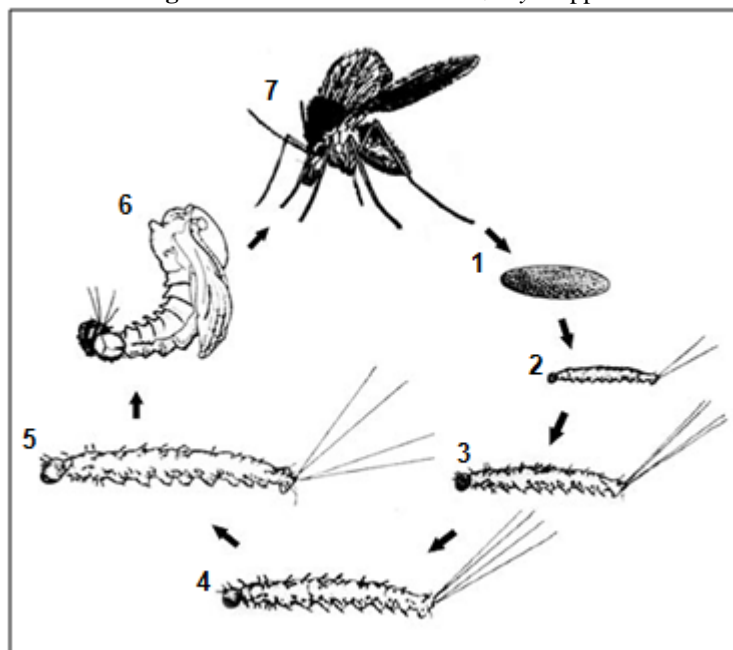
No Estado do Mato Grosso do Sul, a espécie *Lu. cruzi* foi incriminada como vetora de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, pois em regiões de surtos não ocorriam, nos períodos dos estudos, *Lu. longipalpis*, aliado ao fato de que o flebotomíneo da espécie *Lu. cruzi* foram encontrados com infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi*. (SANTOS *et al.*, 1998; MARCONDES, 2001 apud MISSAWA *et al.*, 2011). Fato semelhante foi observado com *Lu. migonei* com descrições de infecções naturais em áreas endêmicas ou com surtos de LV (MOYA *et al.*, 2015; DE CARVALHO *et al.*, 2010) assim como a correlação entre a ausência de *Lu. longipalpis* e presença de *Lu. migonei* associada positivamente com a LV (SILVA *et al.*, 2014; SALOMÓN *et al.*, 2010) até a comprovação laboratorial da capacidade de *Lu. migonei* em ser um vetor permissivo de *L. infantum* (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

5.4.1 Ciclo biológico dos flebotomíneos

Cada fêmea adulta de flebotomíneos é capaz de realizar uma postura de dois a 80 ovos, com média de 28 ovos por fêmea. Os ovos têm uma forma elipsoide e medem, dependendo da espécie, 300 a 500 µm de comprimento por 70 a 150 µm de largura. Algumas horas após a postura os ovos perdem a coloração branco-amarelada, devido ao amadurucimento da casca, e passam a apresentar uma coloração castanho-escura (TEMPONE *et al.*, 2014).

As formas larvares são pequenas, brancas, de aspecto vermiforme e, logo após a eclosão, alimentam-se das cascas dos ovos, dos corpos dos adultos mortos e de outras matérias orgânicas disponíveis (BRAZIL; BRAZIL, 2003). No gênero *Lutzomyia*, as larvas de primeira fase (L1) apresentam um par de cerdas caudais, enquanto as demais fases (L2, L3 e L4) apresentam dois pares (TEMPONE *et al.*, 2014). As larvas de quarto estágio se transformam em pupas, que se fixam no substrato e não se alimentam. Começa então a fase da metamorfose que resultará no inseto adulto (PIMENTA *et al.*, 2012) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo de vida de *Lutzomyia* spp.



Fonte: Dillon, R. (2008).

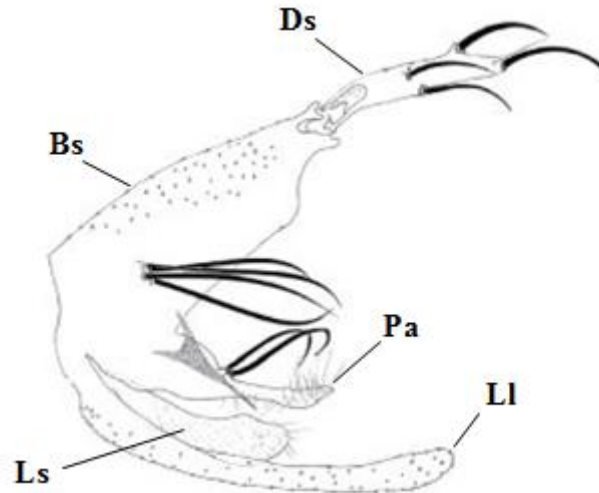
Legenda: 1: Ovo de *Lutzomyia* spp. 2: Larva de primeiro estágio ou L1. Observar a presença de apenas um par de cerdas caudais. 3: Larva de segundo estágio ou L2. 4: Larva de terceiro estágio ou L3. 5: Larva de quarto estágio ou L4. 6: Pupa de *Lutzomyia* spp. 7: Fêmea adulta de *Lutzomyia* spp.

O ciclo completo, de ovo até inseto adulto dura aproximadamente, 35 dias (TEMPONE *et al.*, 2014). Em condição térmica um pouco acima à temperatura considerada ótima para a maioria das espécies neotropicais (25°C a 27°C), o desenvolvimento do ciclo é mais rápido. À medida que a temperatura diminui, o ciclo evolutivo se torna mais lento (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

5.4.2 Taxonomia dos flebotomíneos

Segundo Galati (2003), o Abdômen de *Phlebotominae* compõem-se de 11 segmentos, sendo os três últimos modificados para constituir a terminália também chamada genitália ou hipopígio. No macho, a genitália compõe-se de três pares de apêndices: os do par superior, chamadas de gonapófises superiores ou gonóstilos, com dois segmentos, um proximal, o basistilo ou gonocoxito e outro distal o dististilo ou gonóstilo. Os do par médio, chamado de gonapófise média constituída pelos parâmeros, além de estruturas internas da porção final do abdômen, a bomba ejaculadora ou pompeta e os dutos ou espículos ejaculadores; finalmente, os apêndices do par inferior, gonapófises inferiores, os lobos laterais e as lamelas submedianas (Figura 5).

Figura 5- Genitália de macho de *Lutzomyia longipalpis*.

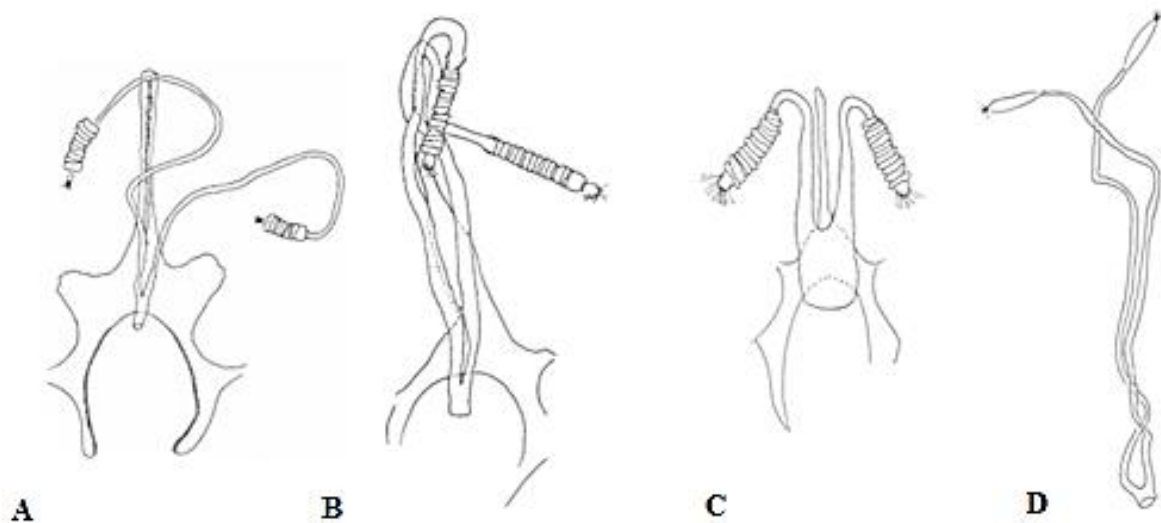


Fonte: Adaptado de Shimabukuro *et al.*, (2011).

Legenda: Ds: Dististilo. Bs: Basistilo. Pa: Parâmero. Ll: Lobo lateral. Ls: Lamela submediana

A fêmea apresenta os três últimos segmentos arredondados encaixa uns nos outros quando em repouso, o que lhes torna arredondada a extremidade do corpo. No décimo segmento encontra-se a abertura anal e nela se ligam apêndices largos e arredondados chamados cercas. Internamente nesta região encontram-se as espermatecas, órgãos pares cuja morfologia é de grande importância na identificação das espécies de flebotomíneos (Figura 6) (VILELA; AGUIAR, 2009).

Figura 6- Espermatecas de fêmeas de flebotomíneos

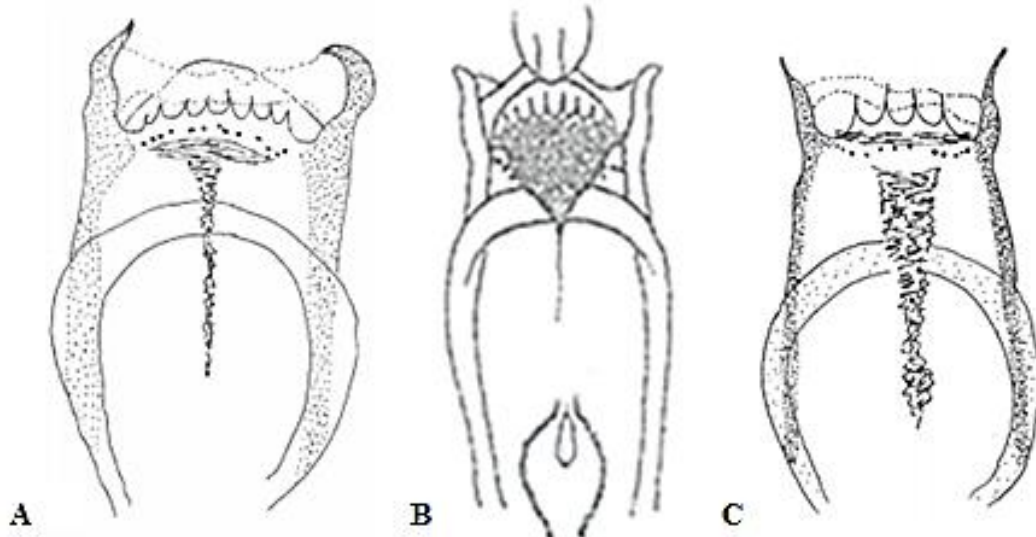


Fonte: Shimabukuro *et al.*, (2011)

Legenda: A: *Lu. longipalpis*. B: *Lu. whitmani*. C: *Lu. intermedia*. D: *Lu. migonei*

O cibário é mais uma peça com grande valor para a identificação das espécies de flebotomíneos (Figura 7). Trata-se de uma estrutura interna da cabeça formada por esclerotizações da cavidade bucal. Seus denticulos verticais e horizontais variam em número a depender da espécie (SHIMABUKURO *et al.*, 2011; VILELA; AGUIAR, 2009).

Figura 7- Cibários de fêmeas de flebotomíneos.



Fonte: Shimabukuro *et al.* (2011)

Legenda: A: *Lu. longipalpis*. B: *Lu. whitmani*. C: *Lu. migonei*

5.5 Ciclo de transmissão das leishmanioses

O ciclo de transmissão nas leishmanioses é complexo e envolve diversos vetores, reservatórios, agentes etiológicos e hospedeiros vertebrados, entre eles, o homem (BRASIL, 2017).

Na LV, em áreas urbanas, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2014).

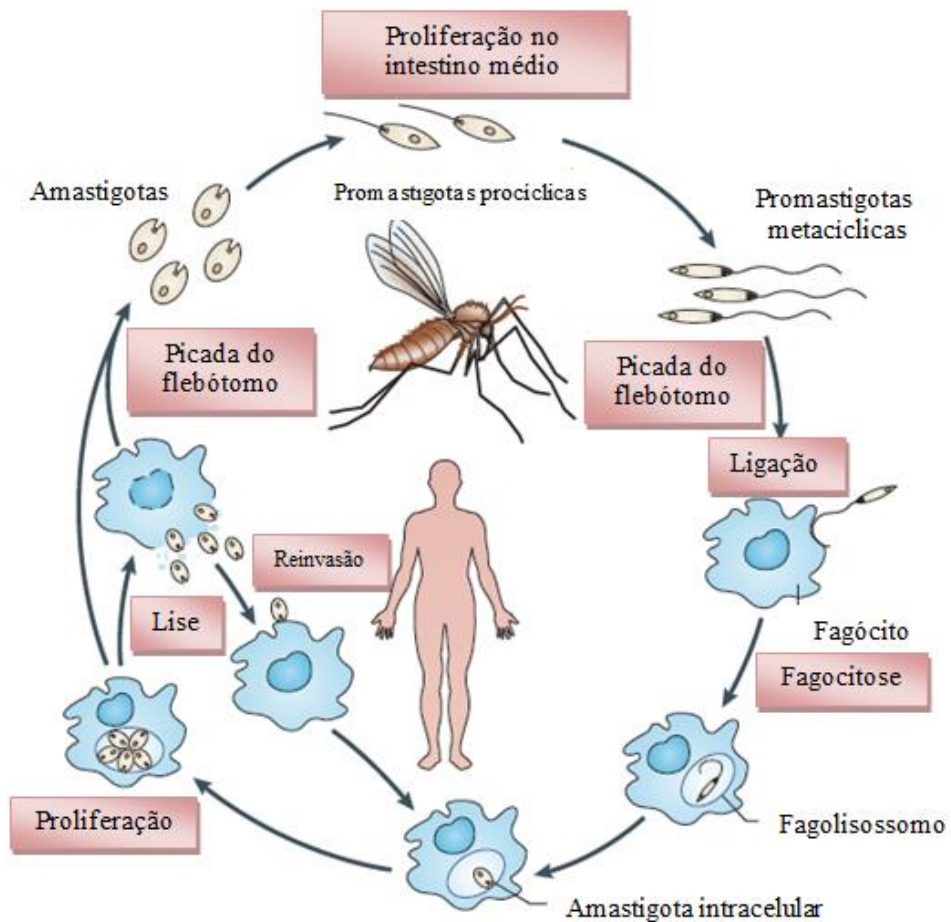
Segundo o Ministério da Saúde no Brasil há três padrões epidemiológicos característicos para a transmissão da LTA. São eles:

- a) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres);

- b) Ocupacional ou lazer – em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo (antropozoonose); e
- c) Rural ou periurbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose) (BRASIL, 2017).

No ciclo biológico das leishmanias, as formas flageladas e móveis de *Leishmania* spp. são chamadas de promastigota. Estas são encontradas no intestino do flebotomíneo e passam por vários estágios morfologicamente distintos de diferenciação para transformar-se finalmente em promastigotas metacíclicas, consideradas as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado (Figura 8) (KAYE; SCOTT, 2011).

Figura 8- Esquema do ciclo de vida heteroxênico de *Leishmania* spp.

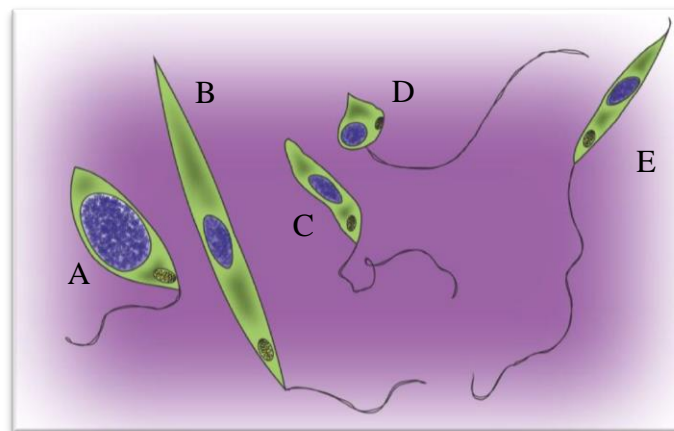


Fonte: Adaptado de Kaye e Scott (2011).

O ciclo de vida da *Leishmania* se inicia no vetor quando uma fêmea de flebotomíneo ingere as formas amastigotas juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado (PIMENTA *et al.*, 2012). As formas amastigotas ingeridas juntamente com o sangue do vertebrado são

direcionadas ao intestino médio, onde os protozoários se diferenciam em formas promastigotas procíclicas. Estas formas são pequenas, flageladas, ovoides e apresentam alta taxa de multiplicação dentro do bolo alimentar. Entre o 2° e 5° dia após a alimentação infectada, as formas procíclicas sofrem uma série de divisões que originam uma nova forma de promastigota, as nectomonas. Estas são majoritárias no tubo digestivo dos insetos nos primeiros dias após a alimentação infectada, até a passagem do bolo alimentar. Já no final da digestão, por volta de 72 horas após o repasto sanguíneo, com a degradação da matriz peritrófica, as formas nectomonas ocupam o intestino médio na porção abdominal e se ligam às microvilosidades do epitélio pelo flagelo. Após quatro a cinco dias da alimentação, as formas nectomonas migram para a porção torácica do intestino médio e se transformam em formas haptomonas e paramastigotas. Paralelamente, surgem também no intestino do vetor os promastigotas metacíclicos, as formas infectivas ao hospedeiro vertebrado (Figura 9) (LAINSON *et al.*, 1987 apud TEMPONE *et al.*, 2014).

Figura 9- Formas de *Leishmania* spp encontradas no inseto vetor.



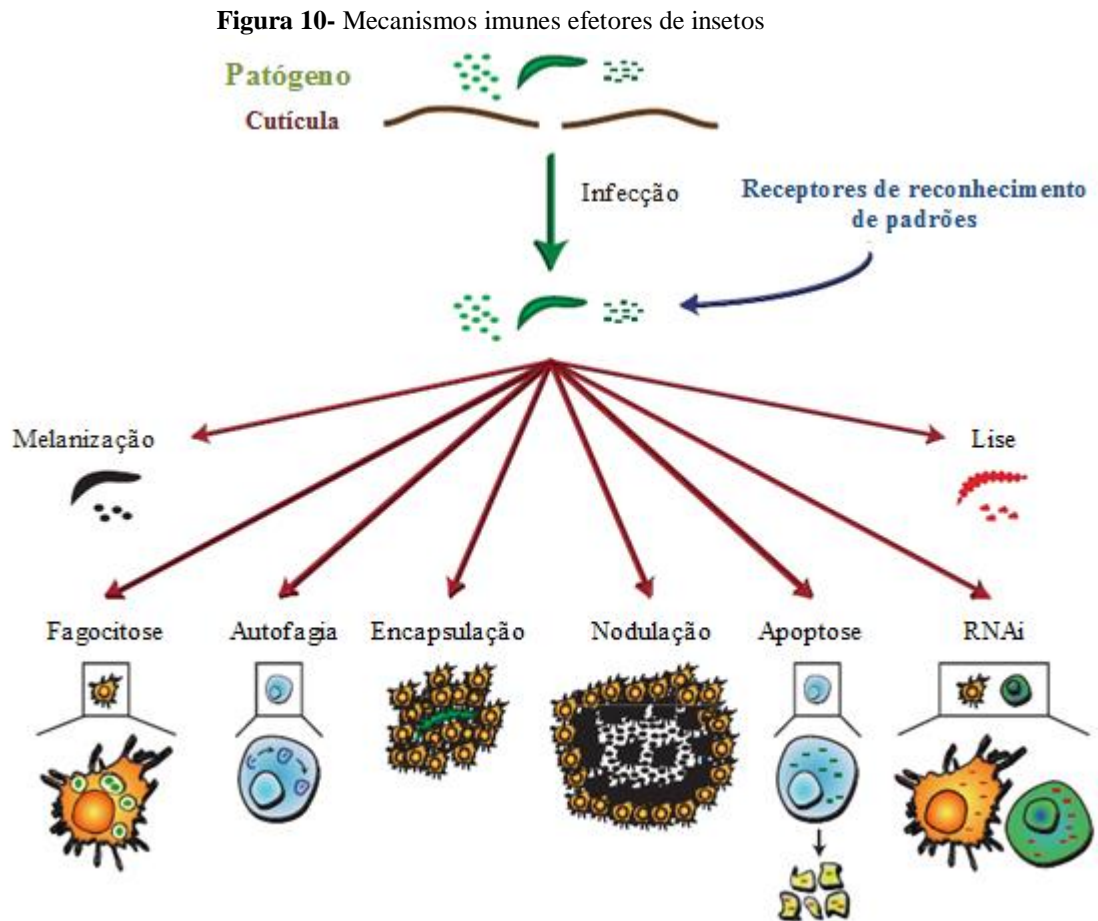
Fonte: Pimenta (2012).

Legenda: A: promastigota procíclica, B: promastigota nectomona, C: promastigota haptomona, D: promastigota paramastigota, E: promastigota metacíclica.

5.6 Sistema imune de insetos

O sistema imune inato dos insetos consiste em barreiras físicas, respostas humorais e respostas celulares (ROSALES, 2017). Esse complexo sistema é disparado após o reconhecimento de um agente invasor o que levará a ativação de proteínas efetoras na hemolinfa (para patógenos extracelulares) ou no citoplasma (no caso de patógenos intracelulares) levando a uma transdução de sinal nos tecidos circundantes através de várias

vias, resultando em transcrição múltipla de respostas conduzindo à morte de agentes patogênicos através de fagocitose, melanização, encapsulação celular, nodulação, lise, destruição de vírus mediada por RNAi, autofagia e apoptose (Figura 10) (BAXTER *et al.*, 2017; HILLYER, 2016).



Fonte: Adaptado de Hillyer (2016).

Barreiras físicas incluem o tegumento e a matriz peritrófica (ROSALES, 2017). Destas, a mais abrangente é o tegumento. Há duas formas utilizadas pelos patógenos para entrar no corpo dos insetos através desta proteção física: Aproveitando-se de feridas naturais, ou através da digestão enzimática deste material. (LUNDGREN; JURAT-FUENTES, 2012). Outra forma de entrada dos patógenos nos insetos ocorre através da ingestão, sendo imediatamente submetidos a barreiras antagonistas como o cibário ou armaduras faringianas, enzimas do sistema digestivo, pH inóspito e microbiota. Ao chegarem ao intestino médio, hemocele ou aos órgãos internos, são desencadeadas respostas imunes que evoluíram para eliminar ou controlar as infecções (HILLYER, 2016). De fato, o sucesso evolutivo dos

insetos também depende da capacidade de seu sistema imunológico combater agentes patogênicos (ROSETTO *et al.*, 2003).

5.6.1 Sistema imune humoral

As defesas humorais incluem os peptídeos antimicrobianos, as cascatas que regulam a coagulação e a melanização da hemolinfa e a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (LAVINE; STRAND, 2002).

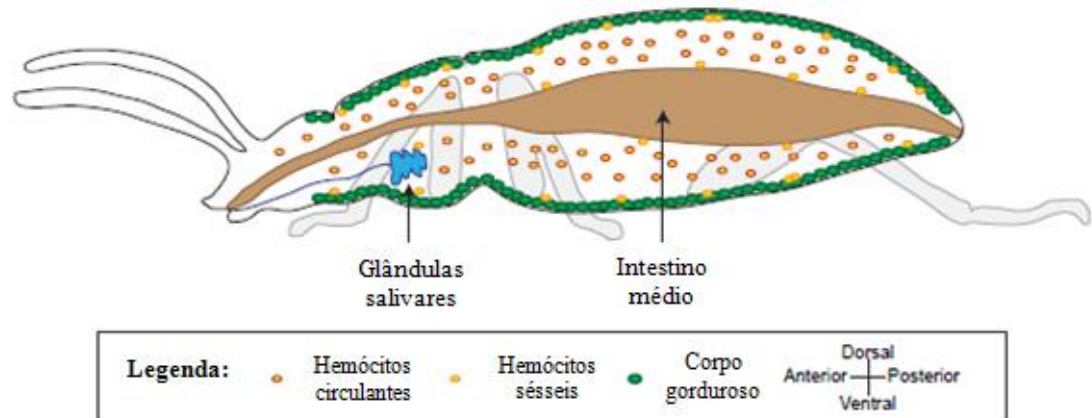
Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são componentes principais da resposta imune inata de células epiteliais. Os tecidos epiteliais são regularmente confrontados com agentes patogênicos e o epitélio intestinal é um dos principais locais de interação entre hospedeiro e patógenos no trato digestivo, sendo necessária, portanto, uma resposta imune eficiente para proteger o epitélio e para distinguir micróbios patogênicos de comensais ou simbióticos (BOULANGER *et al.*, 2004; ROSETTO *et al.*, 2003).

5.6.2 Sistema imune celular

Os hemócitos de insetos desempenham um papel importante na imunidade celular e a identificação de tipos de hemócitos é importante para a compreensão do sistema imune celular em insetos (HWANG *et al.*, 2015). Os hemócitos, que estão presentes na hemocele, direcionam processos de imunidade celular tais como fagocitose e produzem fatores humorais que conduzem à morte do patógeno por lise ou melanização (HILLYER, 2016). Fatores imunes adicionais são segregados pelo corpo gorduroso, um tecido mesodérmico distribuído ao longo do hemocele (BAXTER *et al.*, 2017).

No que diz respeito à localização, os hemócitos podem ser divididos de acordo com a sua localização anatômica com 75% circulando na hemocele (hemócitos circulantes) e 25% aderidos aos seus próprios tecidos (hemócitos sésseis). Estes são distribuídos por toda a parede abdominal, a parede torácica, a cabeça, os palpos maxilares, as pernas, o intestino médio e os túbulos de Malpighi (Figura 11) (KING; HILLYER, 2013).

Figura 11- Classificação dos hemócitos de acordo com a localização



Fonte: Adaptado de Hillyer (2016).

A fagocitose refere-se ao reconhecimento, engolfamento e destruição intracelular de patógenos invasores e células apoptóticas por hemócitos individualizados (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009). Em insetos, este mecanismo de defesa é realizado principalmente pelos plasmatócitos ou granulócitos circulantes na hemolinfa (TSAKAS, MARMARAS, 2010).

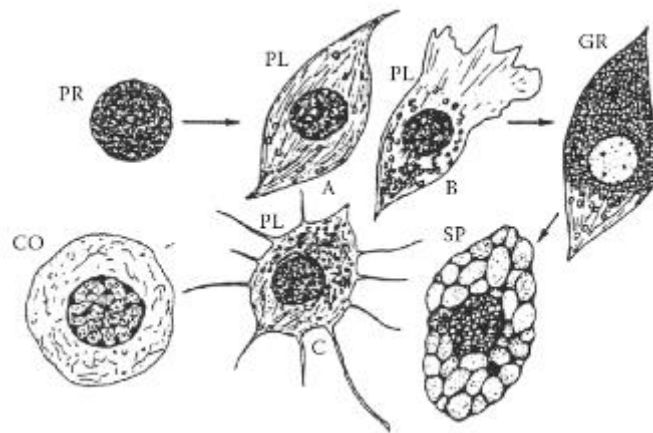
A nodulação refere-se a múltiplos hemócitos que se ligam a agregações de bactérias enquanto que a encapsulação refere-se à ligação de hemócitos a alvos maiores como parasitóides, nematódeos e pérolas de cromatografia. A formação dos nódulos, que podem ou não ser melanizados, e cápsulas parece quase idêntica ao nível ultraestrutural, o que sugere que eles são essencialmente o mesmo processo, embora contra alvos diferentes. Na encapsulação, os hemócitos formam uma cápsula multicamada ao redor do invasor, que posteriormente é acompanhada de melanização. Dentro da cápsula, o invasor é morto pela produção local de radicais livres citotóxicos, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou por asfixia (LAVINE; STRAND, 2002; TSAKAS, MARMARAS, 2010).

A melanização é o processo de formação de melanina. Ela é formada durante a cicatrização de feridas e também na formação de nódulos e cápsulas contra grandes patógenos ou parasitas em vários insetos. A enzima fenoloxidase é primordial neste processo. Após ativação da pró-fenoloxidase, a fenoloxidase ativa se liga a superfícies estranhas, incluindo membranas hemocitárias, onde inicia a formação de melanina (ROSALES, 2017). Para HOFFMAN (2003) a resistência de um inseto à infecção é resultado de um efeito combinado

da ação celular (fagocitose e encapsulação) pelos hemócitos e produção maciça de peptídeos antimicrobianos.

Os tipos mais comuns de hemócitos de insetos relatados na literatura são prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, coagulócitos e oenocitóides (Figura 12) (KWON *et al.*, 2014). Suas características diferem ligeiramente em várias espécies de insetos e seus números e tipos. São espécies-específicas e diferem com a idade do inseto, instar de desenvolvimento, sexo e estado fisiológico (KHOSRAVI, 2016).

Figura 12- Hemócitos mais comuns na hemolinfa de insetos.



Fonte: Woodring (1985).

Legenda: PR, Prohemócito; PL, Plasmatócito; GR, Granulócito; SP, Esferulócito; CO, Coagulócito (= Hialinócito). As principais diferentes formas de plasmatócitos são mostrados em A, B e C. As setas indicam transformações celulares que supostamente ocorrem.

Os prohemócitos são, hipoteticamente, células-tronco com a capacidade de se diferenciarem em um ou mais tipos de hemócitos (LAVINE; STRAND, 2002). Já os plasmatócitos e os granulócitos são considerados os protagonistas da imunidade mediada por células, embora seja provável que outros tipos de hemócitos interajam com eles e contribuam para a resposta imune (KWON *et al.*, 2014). Oenocitóides, por sua vez, são os principais produtores de enzimas necessárias para melanização (HILLYER; STRAND, 2014). Eles liberam pro-fenolaxidase que é convertida em fenolaxidase ativa, catalisando a melanização de partículas aglutinadas ou encapsuladas e cicatrização de feridas. (TSAKAS; MARMARAS, 2010). Adipohemócitos podem ser pequenas ou grandes, esféricas ou ovais e contém gotículas de gordura. Eles podem ser plasmatócitos que são preenchidos com lipídios sob certas condições fisiológicas (GUPTA, 1979). Os coagulócitos, também conhecidos como hialinócitos ou cistócitos, são células que se rompem segundos após uma lesão ou depois de tirar uma amostra de hemolinfa do inseto e iniciar o processo de coagulação já os esferulócitos

possuem formado oval ou arredondado com cerca de 25 μM de comprimento. Contém algumas ou muitas pequenas inclusões esféricas de mucopolissacarídeo (NATION, 2015).

Estudos em lepidoptera determinaram que prohemócitos e plasmatócitos estão nos órgãos hematopoiéticos e todos os tipos celulares em circulação, com exceção dos oenocitóides, dividem-se ativamente. Estes resultados também sugeriram que os prohemócitos se diferenciam principalmente em plasmatócitos nos órgãos hematopoiéticos, enquanto outros tipos de hemócitos diferenciam-se após a liberação para circulação, e a manutenção das populações de hemócitos em circulação depende fortemente da continua divisão de cada tipo de célula após diferenciação (GARDINER; STRAND, 2000).

Na ordem Diptera, os estudos concentraram-se em apenas duas famílias: Drosophilidae e Culicidae. Mesmo dentro de Culicidae, que contém aproximadamente 3500 espécies descritas (REIDENBACH *et al.*, 2009), a maioria dos estudos deu enfoque em três espécies: *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e, em menor medida, *Culex quinquefasciatus*. Desta forma, o conhecimento da imunidade dos insetos é bastante maduro em alguns táxons, mas em grande parte segue subexplorado em outros (HILLYER, 2016). Avanços na compreensão da imunidade vetorial podem ser considerados para desenvolver novas estratégias de controle para reduzir a taxa de transmissão de ameaças antigas e emergentes para a saúde global (BAXTER *et al.*, 2017).

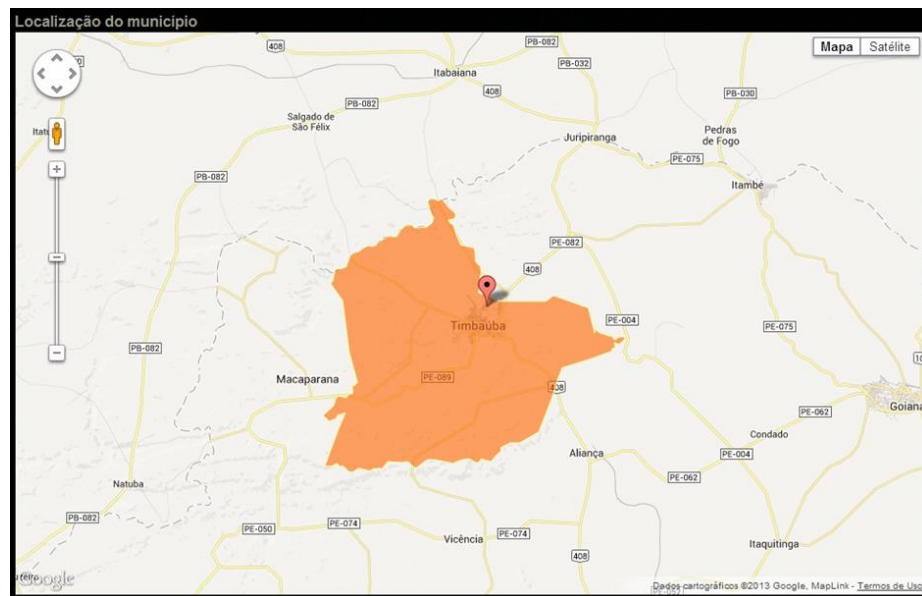
Desse modo, portanto, a caracterização da população de hemócitos circulantes, em flebotomíneos, bem como a identificação de células sabidamente responsáveis pelo reconhecimento e fagocitose é uma ferramenta importante para entender as interações hospedeiro-parasita.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Local de estudo

O município de Timbaúba está localizado na Microrregião Mata Setentrional do Estado de Pernambuco, situado a 98 km do Recife, limita-se a norte com Estado da Paraíba, a sul com Vicência, a leste com Ferreiros, Aliança e Camutanga, e a oeste com Macaparana (Figura 13) (ARAÚJO, 2014).

Figura 13- Limites geográficos do município de Timbaúba



Fonte: IBGE (2013)

Com uma população estimada em 53.083 habitantes, ocupa uma área total de 292,985 km² sendo a densidade demográfica de 184,63 hab/km² (IBGE, 2018). O município, que foi fundado em 1879, quando foi desmembrado do município de Itambé, encontra-se na unidade geoambiental do Planalto da Borborema, com altitude variando entre 650 a 1.000 metros. Os solos variam de ácidos a moderadamente ácidos e apresentam fertilidade natural média a alta. A vegetação nativa é composta por florestas subcaducifólica e caducifólica, típicas do agreste (TIMBAÚBA, 2018).

6.2 Captura de flebotomíneos

Flebotomíneos da espécie *Lutzomyia migonei* (França, 1920) provenientes de Timbaúba, Pernambuco, Brasil, (07° 30' 18" S 35° 19' 04" O) serão utilizados ao longo deste estudo. O método de captura dos flebotomíneos utiliza armadilhas luminosas tipo CDC (Center of Disease Control) (Figura 14).

Figura 14- Armadilha luminosa tipo CDC



Fonte: Log Nature (2018)

Durante as capturas, são visitadas duas casas por noite. Em cada residência duas armadilhas são colocadas, sendo uma no interior e outra no peridomicílio, totalizando 04 armadilhas por noite. As armadilhas tipo CDC são colocadas a 1,5 m de altura do solo, a partir das 18:00h e retiradas às 06:00h do dia seguinte de acordo com protocolo descrito por Carvalho *et al.* (2010). Os insetos capturados são mantidos em gaiolas com solução açucarada no Laboratório de Imunologia Keizo Asami-LIKA/UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil, sob condições descritas por Volf e Volfova (2011).

6.2.1 Classificação dos flebotomíneos

A morfologia dos flebotomíneos possibilita a identificação e diferenciação entre as espécies existentes, e tem por base o estudo das estruturas visíveis do inseto após a preparação em lâmina e observação com auxílio de microscopia (YOUNG & DUNCAN, 1994). Para se obter uma avaliação morfológica mais profunda, podendo visualizar órgãos internos como o cibário e espermateca, antes da montagem do inseto em lâmina é utilizada a técnica de diafanização do espécime, o que torna translúcidas as estruturas córneas, e permite uma maior

facilidade de avaliar as estruturas internas com o auxílio de microscopia (YOUNG; DUNCAN, 1994).

A preparação e montagem dos flebotomíneos são realizadas utilizando-se bálsamo do Canadá para os machos e líquido de Berlese para as fêmeas (LANGERON, 1949). A utilização do bálsamo para montagem dos machos se justifica pela durabilidade da preparação, enquanto o líquido de Berlese para fêmeas possibilita o exame das estruturas internas com maior nitidez, devido a sua menor refringência (RÊGO, 2013).

Para classificação dos machos a estrutura utilizada foi a terminália que apresenta, a depender das espécies notificadas, inúmeras diferenças, tais como a quantidade e o formato das espículas assim como diferenças no formato do edeago. As fêmeas foram identificadas após visualização do cibário, que varia sua quantidade de dentículos, além de possuir estruturas mais ou menos discretas que, após preparação da lâmina, podem se apresentar enegrecidas ou transparentes. As espermatecas, estruturas que recebem o líquido espermático dos machos durante a cópula, também foram utilizadas na classificação. Os aspectos avaliados consistiram na presença ou ausência de anéis, número de anéis, quando presentes, tamanho relativo dos anéis, presença ou ausência de outros ornamentos. A visualização destas estruturas pôde ser realizada com microscópio de luz na objetiva de 40x. Na impossibilidade de visualização destas estruturas, o espécime foi classificado como *Lutzomyia* spp. de acordo com suas características genéricas.

Os insetos foram armazenados em solução preparada com álcool 70% e 5% de glicerina, a fim de evitar o ressecamento dos espécimes. Após esse procedimento, os flebotomíneos foram transferidos para placas de Petri contendo potassa a 10% (KOH) e então permaneciam 3 horas para que houvesse o amolecimento da quitina. Após esse período, os flebotomíneos eram transferidos para placas de Petri com ácido acético 10% onde ficaram por 20 minutos com o objetivo de retirar o excesso de hidróxido de potassa. Em seguida, os insetos são lavados em placas de Petri contendo água destilada. A lavagem acontece em 3 séries de 20 minutos cada. A seguir, os flebotomíneos são colocados em placas de Petri com lactofenol¹, onde permanecem por 24 horas, para que se processe a diafanização das estruturas quitinizadas. Finalmente, os flebotomíneos estão prontos para serem montados em líquido de Berlese entre lâmina e lamínula e visualizados em microscópio de luz. (VILELA, 2003).

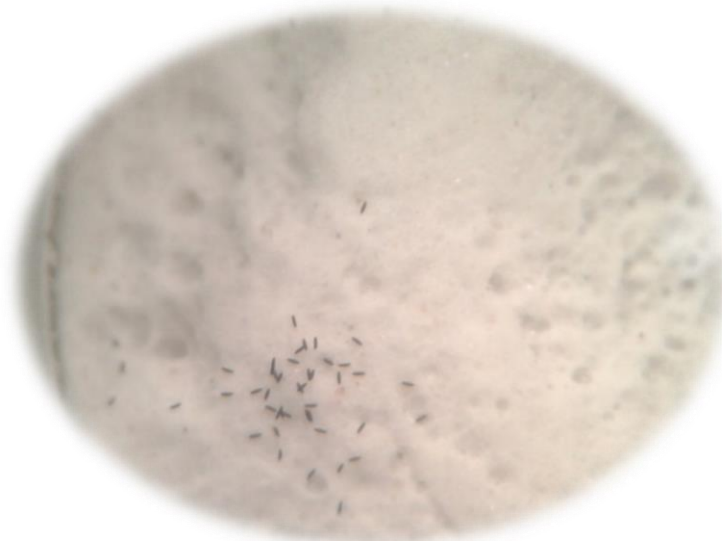
¹ Nota: Formulações: Lactofenol- Fenol cristalizado (100 mg), ácido láctico (100 ml), glicerina (100 ml) e água destilada (100 ml). Berlese- Goma arábica (08g), hidrato de cloral (74g), xarope de glicose (5 ml) e água destilada (10 ml), ácido acético (3 ml). Todos estes ingredientes são misturados e aquecidos, sem deixar a solução ferver. Manter o Berlese em frasco âmbar.

6.3 Estabelecimento e manutenção da colônia de *Lutzomyia migonei*

A iniciação de novas colônias de flebotomíneos é mais difícil do que a manutenção de rotina de colônias já estabelecidas no laboratório por muitas gerações. Além das particularidades de adaptação de cada espécie às condições laboratoriais, as principais dificuldades encontradas se relacionam à alta mortalidade nos primeiros estágios evolutivos, canibalismo entre as larvas, proliferação de fungos, dieta larvar inadequada e o alto índice de mortalidade das fêmeas grávidas antes e durante a oviposição (BRAZIL; BRAZIL, 2003; VOLFF; VOLFOVA, 2011).

A metodologia utilizada neste estudo foi adaptada de Volf e Volfova (2011). Flebotomíneos fêmeas engurgitadas capturadas no campo através das armadilhas luminosas do tipo CDC eram individualizadas, com auxílio de capturadores manuais, em recipientes destinados à oviposição. Estes recipientes eram tubos de plástico revestidos de gesso, sendo a umidade necessária obtida por gotejamento de água destilada, antes de a fêmea ser transferida para o pote. A alimentação destas fêmeas foi feita através de algodão embebido em solução 1:1 de água destilada e sacarose colocado em cima do pote. As fêmeas não são perturbadas por 24 horas sendo mantidas em total escuridão. Após esse período, as fêmeas que colocaram ovos são removidas (mortas ou ainda vivas) para identificação da espécie. Os ovos dos potes (Figura 15), para os quais as fêmeas foram identificadas como *Lu. migonei*, foram transferidos para um recipiente maior, o pote de criação de larvas, apenas quatro dias após a oviposição, visando não atrapalhar os períodos iniciais de desenvolvimento.

Figura 15- Aspecto dos ovos de *Lu. migonei* visualizados com auxílio de estereomicroscópio



Fonte: O Autor, 2017

O pote de criação deve ser verificado duas vezes ao dia e após a eclosão das primeiras larvas deve ser adicionada a ração. A ração utilizada foi preparada seguindo o protocolo de Volf e Volfova (2011) sendo composta por uma mistura 1:1 de fezes de coelho e ração de coelho.

O pote deve ser observado três vezes por dias para evitar principalmente a proliferação de fungos e a colonização de ácaros. A oferta de alimento deve ser cortada após a visualização das primeiras pupas, que não se alimentam. Os primeiros a emergir são os machos, que devem ser transferidos para gaiola de manutenção de adultos, onde é ofertado algodão embebido em solução 1:1 de água destilada e sacarose para homeostase do inseto. Após 24 horas, os machos estão sexualmente maduros e prontos para o acasalamento. As fêmeas receberam o mesmo tratamento após completarem a metamorfose.

6.4 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa contendo hemócitos foi coletada a partir de uma incisão na região do abdômen do flebótomo, após perfusão no tórax do inseto com solução anticoagulante (NaOH 0,098 M, NaCl 0,186 M, EDTA 0,017 M e ácido cítrico 0,041 M, pH 4,5), utilizando uma microcapilar de vidro siliconizado acoplado a um micromanipulador (Figura 16), posteriormente, a hemolinfa obtida foi utilizada nos experimentos de caracterização morfométrica, funcional, contagem total e diferencial dos hemócitos.

Figura 16- Micromanipulador associado a estereomicroscópio



Fonte: Gazzonni (2016)

6.5 Caracterização dos hemócitos

6.5.1 Microscopia de campo claro

A hemolinfa foi obtida perfurando o tórax do inseto com uma agulha muito fina. A hemolinfa (1 μL) de cada inseto foi derramada diretamente sobre uma lâmina de vidro e os esfregaços foram deixados secar à temperatura ambiente durante 10 min. Os hemócitos foram então coradas com Giemsa (diluído a 1: 9 em água destilada) durante 15 min, em seguida, lavado rapidamente em água destilada e observada sob um microscópio óptico. As medições de comprimentos e larguras de células e núcleos foram feitas com uma lente objetiva digital de microscópio de luz (Olympus BX51). Um mínimo de 30 células de cada um dos tipos morfológicos foi medido, conforme Khosravi *et al.* (2016).

6.5.2 Contagem diferencial dos hemócitos

Um volume total de 10 microlitros de hemolinfa diluída fresca em meio GRACE (1:1) coletados através de um microcapilar de vidro siliconizado. A amostra foi imediatamente colocada em um hemocitômetro estéril e descartável (Neubauer, iNCYTO C-Chip DHC-N01, www.incyto.com com 10 μL de capacidade). O número de células em quatro quadrados foi contado através de um microscópio de luz (objetiva 40X), e o número total de hemócitos por flebotômico foi determinado. A contagem dos tipos de células individuais foi realizada simultaneamente, e as proporções em percentagens serão determinadas por flebótomos individuais. A contagem dos hemócitos foi confirmada em três experimentos independentes. Para cada experimento, grupos de quarenta flebótomos foram analisados individualmente e o número total de células ou a proporção de cada população de células foi expresso através de média aritmética.

6.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A hemolinfa total de 300 flebótomos foi fixada em uma solução de formaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M em pH 7,2. A amostra foi lavada em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixada com tetróxido de ósmio (1%) em tampão cacodilato por duas horas. Em seguida, realizou-se a desidratação em uma série crescente de acetona. As

amostras foram incluídas e emblocadas em resina Epon (KHOSRAVI *et al.*, 2016). Posteriormente, cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e depois contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para serem observados e fotografados em um microscópio eletrônico TecNai G2 Spirit TEM.

7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho não envolve diretamente pesquisa com seres humanos e animais de laboratório. Sendo assim não se fez necessário obter o parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

8 RESULTADOS

8.1 Classificação dos flebotômicos

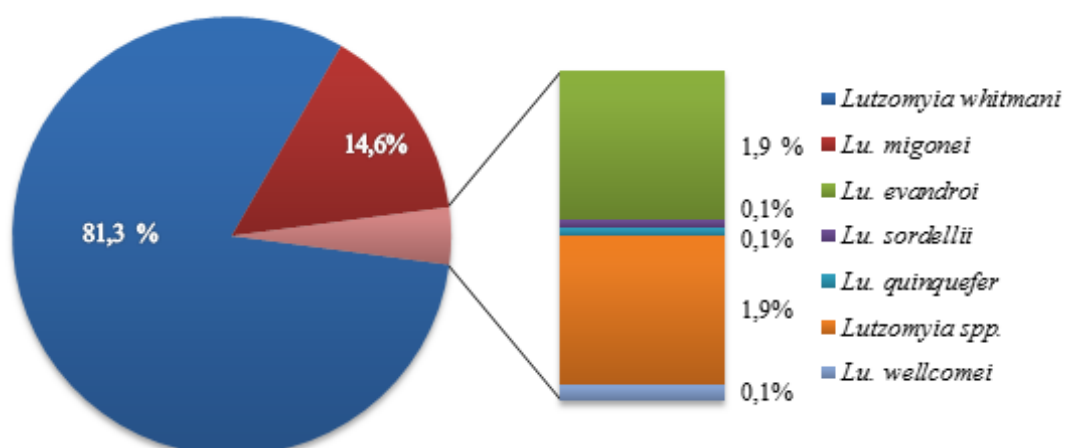
As armadilhas instaladas capturaram um total de 1760 espécimes de flebotomíneos, destes 480 (27,27%) eram fêmeas. (Tabela 1). O levantamento das espécies de flebotomíneos no Município de Timbaúba-PE revelou a presença de seis espécies: *Lutzomyia whitmani* (81,3%), *Lu. migonei* (14,6%), *Lu. evandroi* (1,9%), *Lu. wellcomei* (0,2%), *Lu. quinquefer* e *Lu. sordellii* representaram 0,1%. *Lutzomyia* spp. representou 1,9% do total dos insetos classificados (Figura 17).

Tabela 1- Quantitativo de flebotomíneos separados por espécie e sexo.

Espécie	Machos	Fêmeas	Total por espécie
<i>Lutzomyia whitmani</i>	1039	393	1432
<i>Lu. migonei</i>	203	54	257
<i>Lu. evandroi</i>	31	03	34
<i>Lu. wellcomei</i>	00	03	03
<i>Lu. quinquefer</i>	00	01	01
<i>Lu. sordellii</i>	00	02	02
<i>Lutzomyia</i> spp.	07	24	31
Total	480	1280	1760

Fonte: O Autor, 2017.

Figura 17- Valores relativos das espécies de flebotomíneos de Timbaúba/PE



Fonte: O Autor, 2017

Dos espécimes classificados, *Lu. whitmani* e *Lu. migonei* são as espécies mais representativas (95.9%). Para a classificação dos flebotômíenos machos observou-se o parâmero (Figura 18 AB) e a quantidade de espinhos presentes no dististilo.

Figura 18- Parâmeros de *Lu. whitmani* e *Lu. migonei*

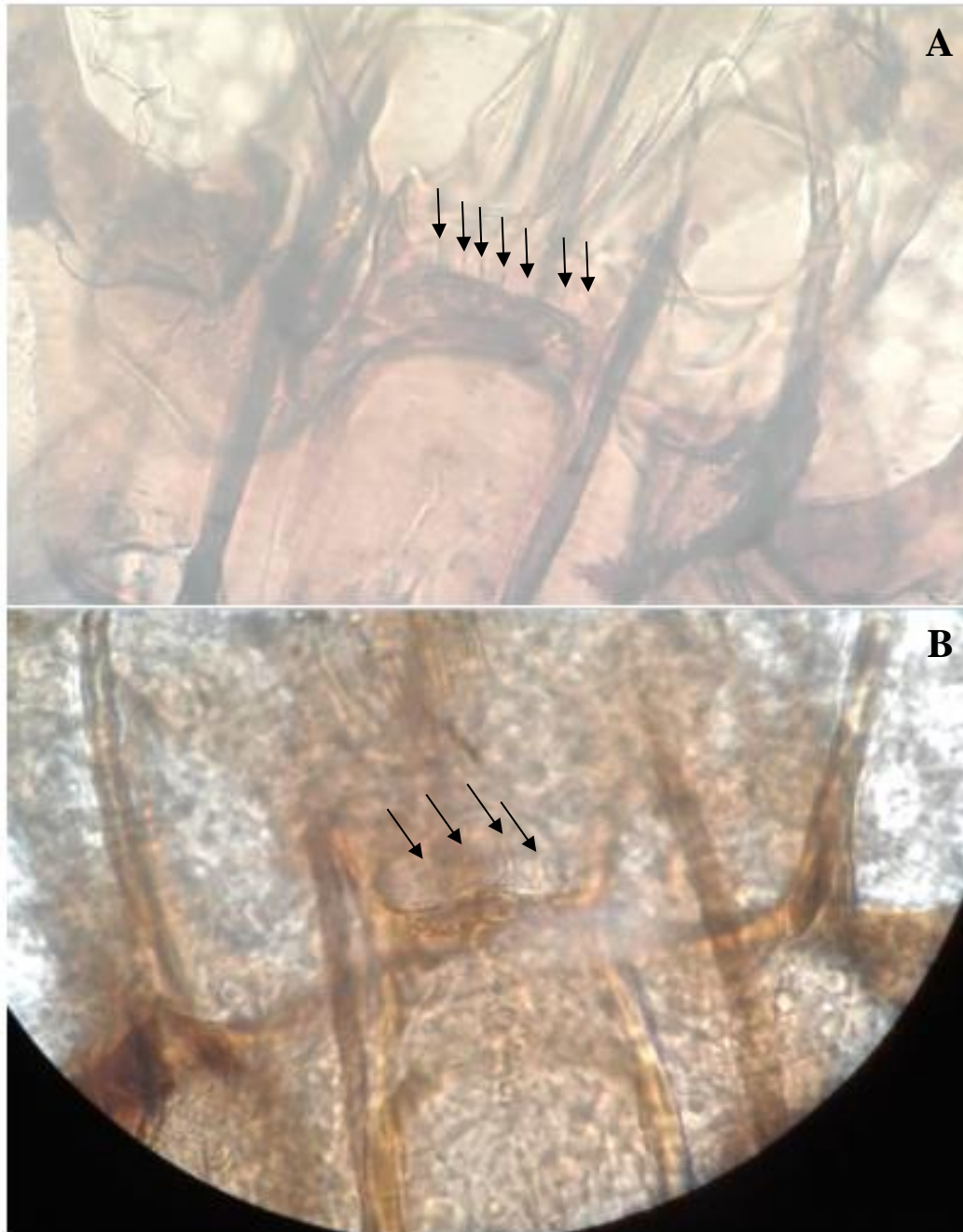


Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Os destaques evidenciam a diferença no formato das estruturas das espécies. Enquanto *Lu. whitmani* (14. A) apresenta o parâmero retilíneo, a mesma estrutura em *Lu. migonei* (14. B) apresenta-se curvada.

Já a identificação das fêmeas utilizou-se do cibário (Figura 19 AB) e das espermatecas (Figuras 20 e 21).

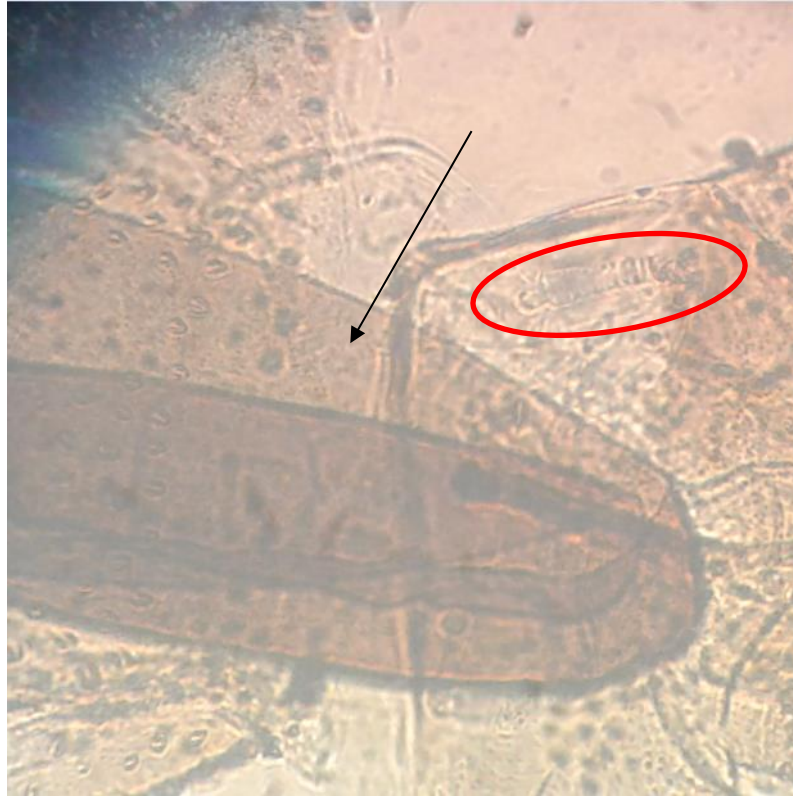
Figura 19- Cibários de *Lu. whitmani* e *Lu. migonei*



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Visão posterior da cabeça de espécies de flebotomíneos. As setas indicam a quantidade de denticulos presentes no cibário de *Lu. whitmani* (16. A) e *Lu. migonei* (16.B).

Figura 20- Destaque em espermateca de *Lu. whitmani*



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Detalhe da porção terminal do abdômen de fêmea de *Lu. whitmani*. A seta indica a presença de ovo e a elipse em vermelho, a espermateca do inseto. Notar a presença de anéis e ornamento na extremidade do órgão.

Figura 21- Destaque em espermateca de *Lu. migonei*



Fonte: O Autor, 2018

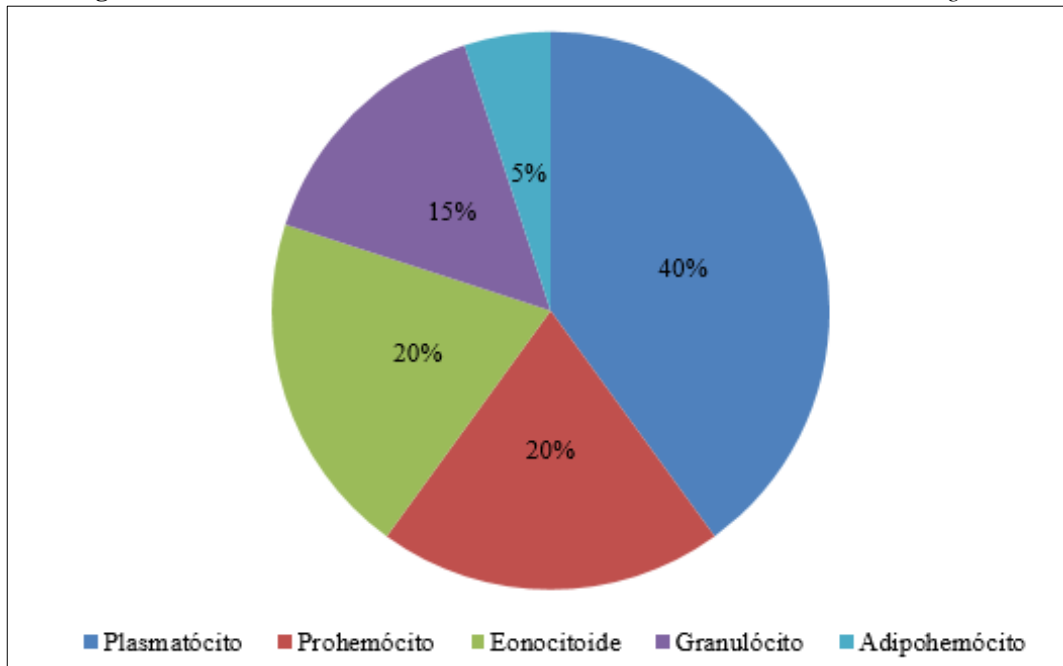
Legenda: O círculo evidencia duas partes da espermateca de *Lu. migonei*. Observar a ausência de anéis e aspecto discreto do órgão.

8.1 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos hemócitos de *Lutzomyia migonei*

Em nossos estudos utilizando microscopia óptica e eletrônica de transmissão, foram identificados cinco tipos morfológicos de hemócitos circulantes na hemolinfa de *Lu. migonei*. São eles:

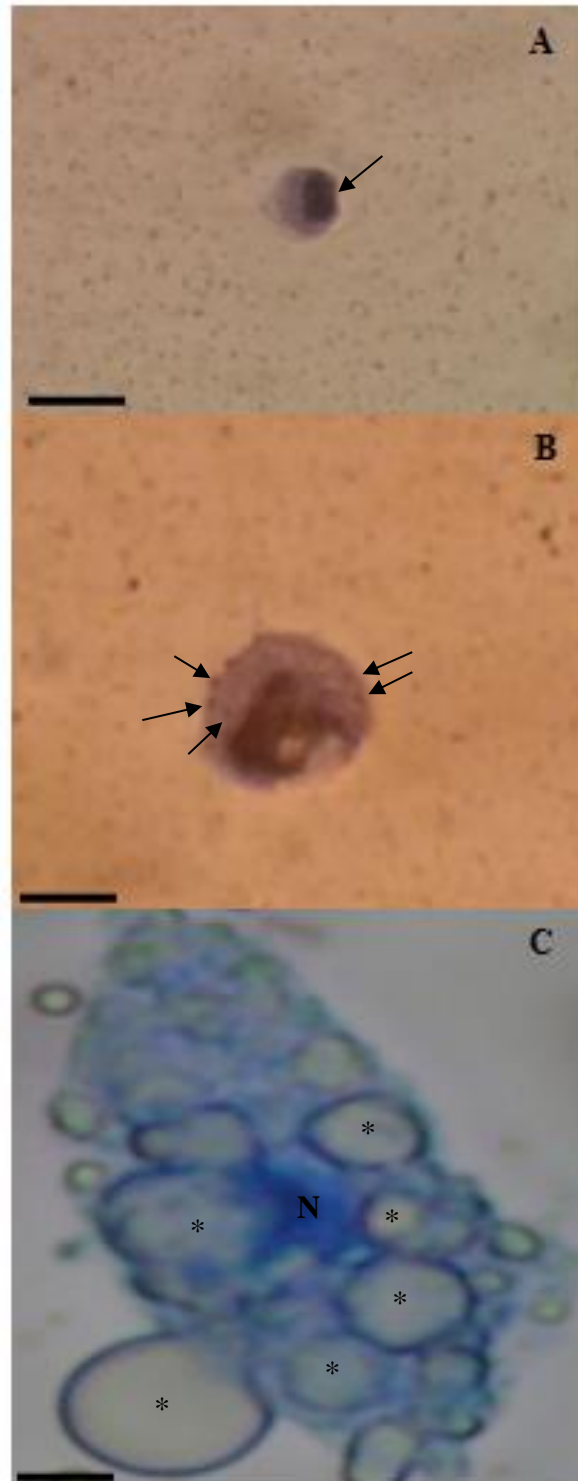
- a) **Prohemócitos** - Os prohemócitos são as menores células encontradas em circulação na hemolinfa de *Lu. migonei*. Seu diâmetro varia de 5-8 μm e correspondem a 20% do total de hemócitos (Figura 22). Caracterizam-se pelo seu formato esférico ou oval e pelo seu grande núcleo localizado no centro da célula ocupando quase todo espaço celular (Figura 23A). À microscopia eletrônica é possível observar poucas organelas como mitocôndrias, vesículas e perfil de retículo endoplasmático (Figura 26);
- b) **Granulócitos** - Os granulócitos correspondem a células esféricas ou ovais com grânulos no citoplasma. Medem de 8-15 μm de diâmetro e representam aproximadamente 15% da população dos hemócitos de *Lu. migonei* (Figura 23 B). Fotomicrografias eletrônicas revelaram a presença de nucléolos, grânulos no citoplasma, além de mitocôndrias, vesículas, retículo endoplasmático espaçado e aparelho de Golgi e (Figura 27).
- c) **Adipohemócitos** - Os adipohemócitos são representados por células polimórficas e irregulares cuja principal característica é a notória presença de inclusões lipídicas no citoplasma. Medem 15-30 μm de diâmetro. São os hemócitos mais raros correspondendo a 5% da população celular na hemolinfa (Figura 23 C). Através da técnica de MET é possível observar o núcleo celular deslocado e contíguo a uma pequena área, sendo maior parte do citoplasma ocupado por inclusões lipídicas eletrônicas (Figura 28).
- d) **Plasmatócitos** - Os plasmatócitos são células polimórficas com projeções citoplasmáticas e citoplasma heterogêneo (Figura 24). Seu diâmetro varia de 8 a 22 μm e correspondem às células mais comumente detectadas com aproximadamente 40% da população dos hemócitos. São células com várias mitocôndrias e vesículas de diferentes tamanhos e formas, além de retículo endoplasmático (Figura 29).
- e) **Oenocitóides** - Os oenocitóides são células arredondadas ou ovais cuja principal característica é o núcleo pequeno e excêntrico (Figura 25). Medem de 8 a 12 μm de diâmetro e representam 20% da população dos hemócitos circulantes. Relata-se também a presença de retículo endoplasmático, poucas mitocôndrias e várias vesículas (Figura 30).

Figura 22- Percentual relativo dos hemócitos encontrados na hemolinfa de *Lu. migonei*



Fonte: O Autor, 2018

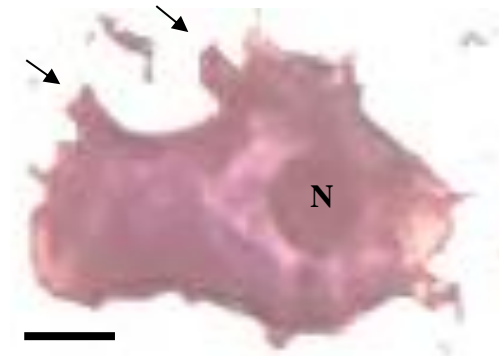
Figura 23- Hemócitos de *Lu. migonei* observados através da microscopia óptica



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: **A.** Um prohemócito com núcleo ocupando a maior parte do citoplasma (Seta fina). **B.** Um granulócito com citoplasma contendo diversos grânulos (Ponta da seta). **C.** Um adipohemócito com citoplasma repleto de inclusões lipídicas (Estrelas) e núcleo centralizado (N). Barras A, B= 10 μm ; C= 20 μm .

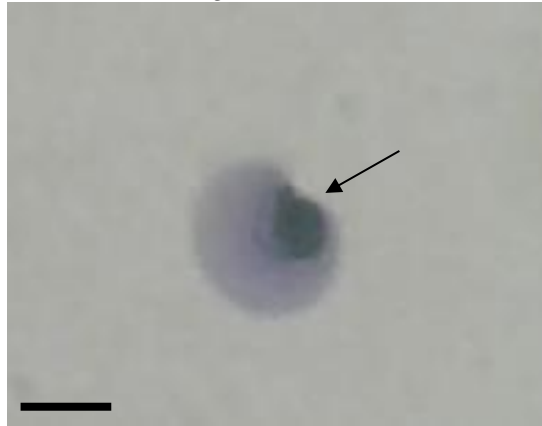
Figura 24 - Plasmatócito de *Lu. migonei* observados através da microscopia óptica



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Um plasmatócito exibindo núcleo centralmente localizado (N) e projeções citoplasmáticas (Seta fina). Barra =10 μ m.

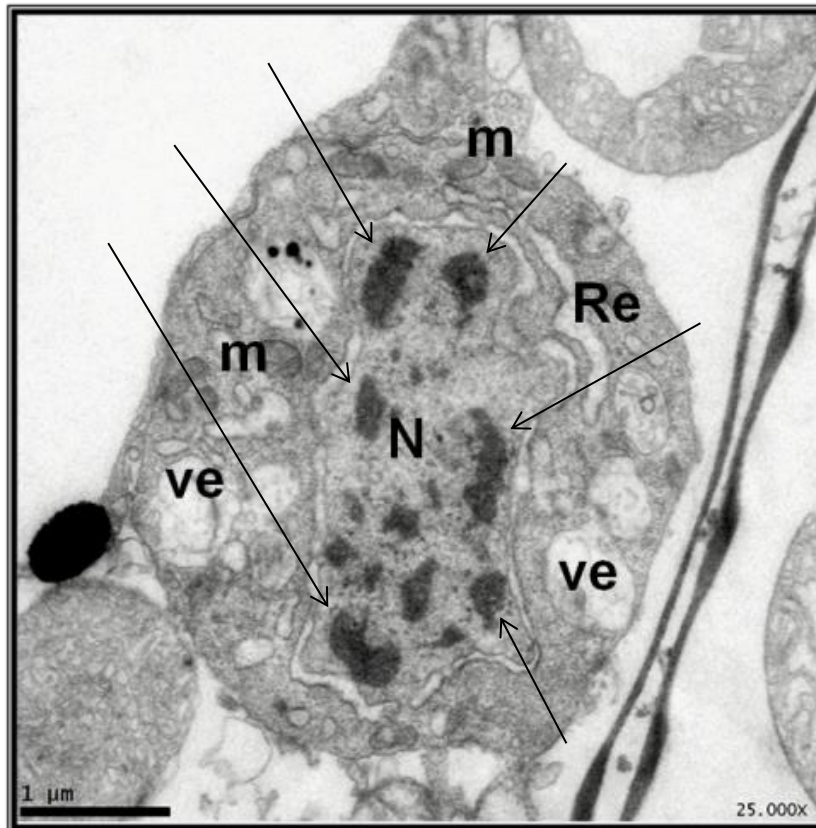
Figura 25- Eonocitoide de *Lu. migonei* observado através de microscopia óptica



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Um eonocitoide com núcleo excêntrico (Seta fina). Barra = 10 μ m

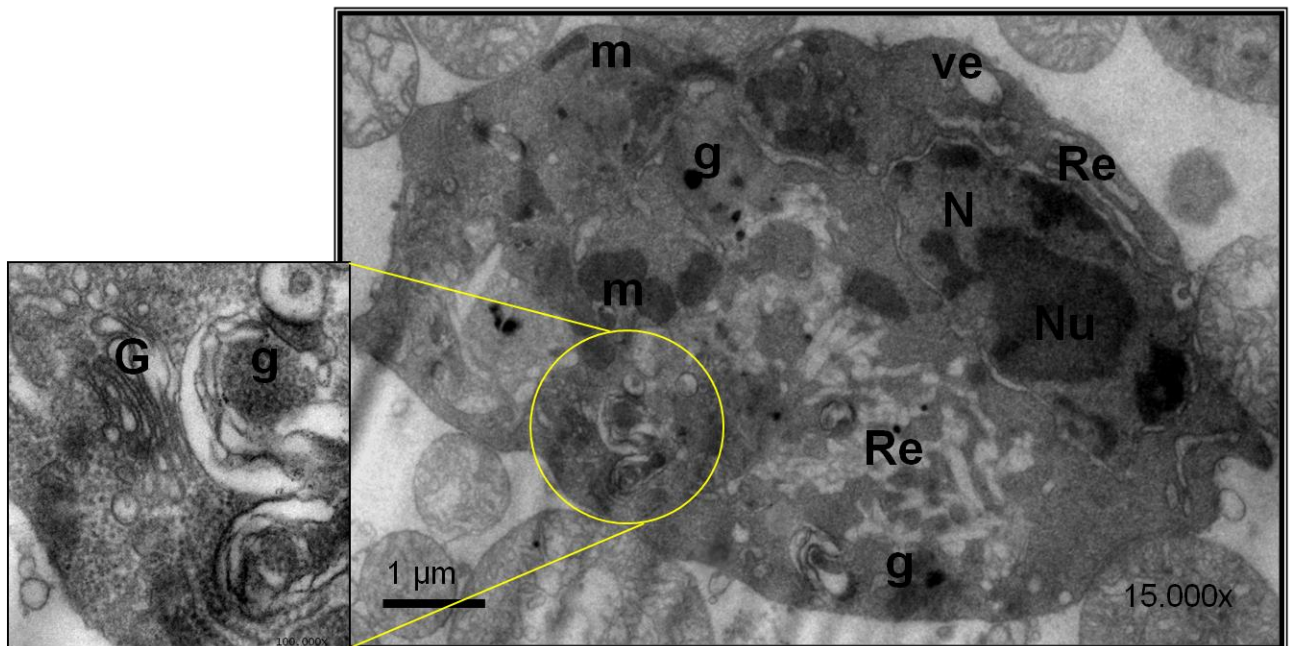
Figura 26- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de prohemócito de *Lu. migonei*.



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Prohemócito exibindo perfil esférico com núcleo volumoso (N) e heterocromatina (setas). Fino citoplasma com poucas organelas. Note a presença de mitocôndrias (m), Retículo Endoplasmático (RE) e vesículas (Ve).

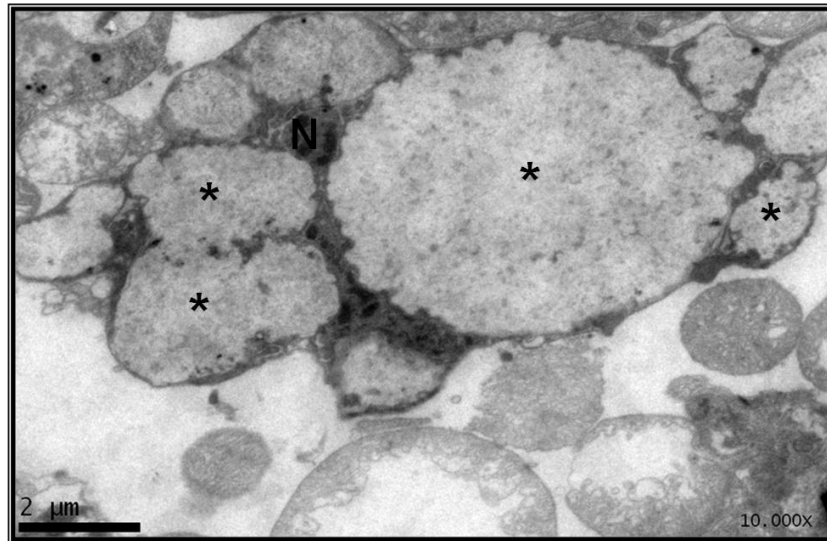
Figura 27 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão de granulócito de *Lu. migonei*.



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Granulócito com núcleo excêntrico (N) e presença de nucléolo (Nu). O destaque evidencia aparelho de Golgi bem desenvolvido (G) participando da formação de grânulos (g). É possível observar ainda mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (Re) e vesículas (Ve).

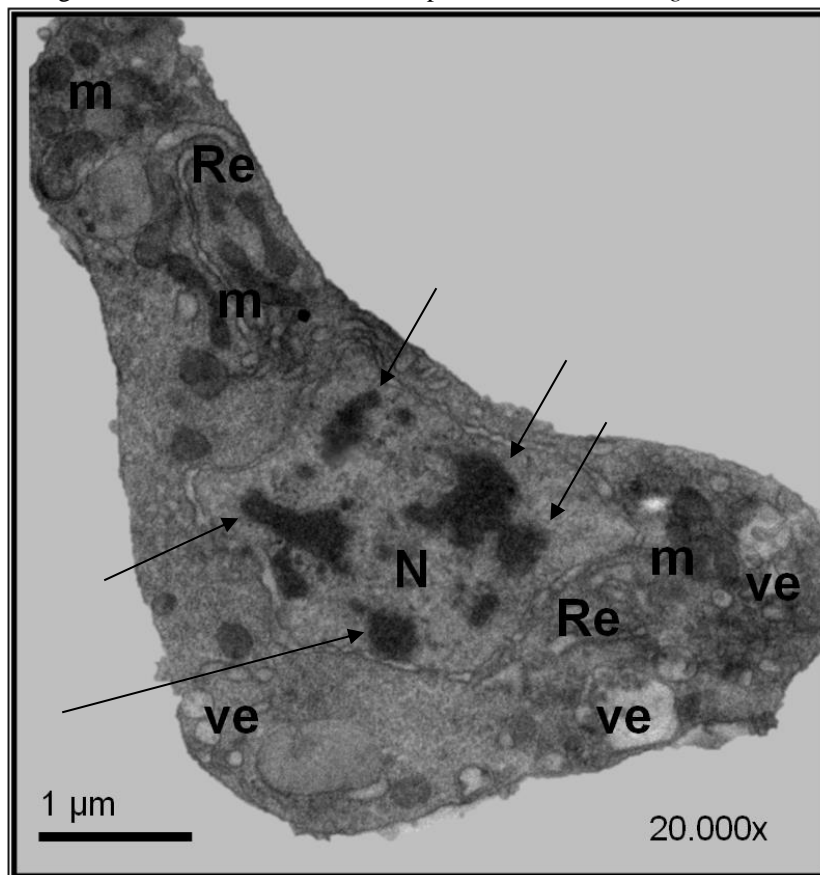
Figura 28- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de adipohemócito de *Lu. migonei*.



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Adipohemócito com núcleo espremido (N) entre inclusões lipídicas (estrelas).

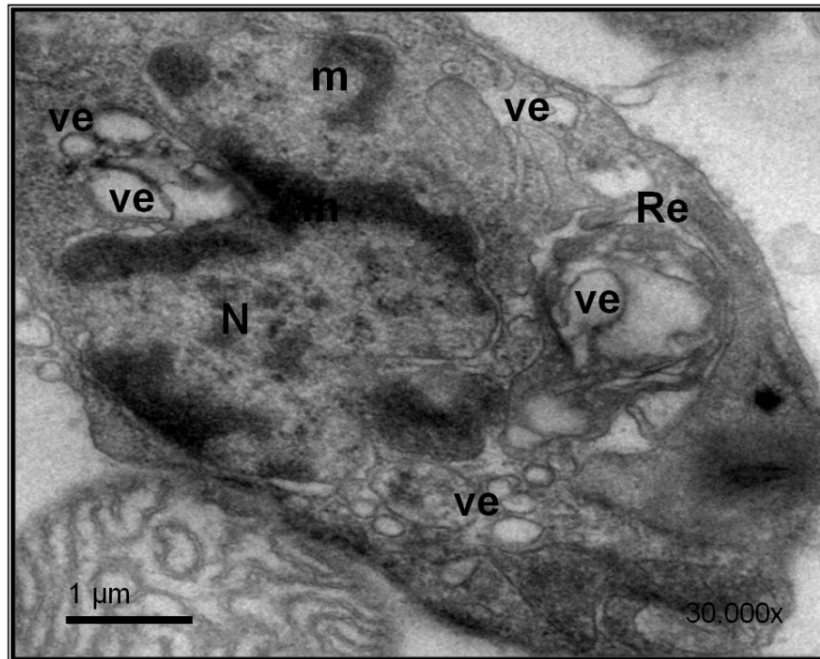
Figura 29 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão de plasmatócito de *Lu. migonei*.



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Plasmatócito exibindo núcleo (N) e heterocromatina (Setas), citoplasma com mitocôndrias (m), vesículas (ve) e perfil de retículo (Re).

Figura 30- Fotomicrografia eletrônica de transmissão de eonocitóide de *Lu. migonei*.



Fonte: O Autor, 2018

Legenda: Eonocitóide exibindo núcleo excêntrico (N) com heterocromatina. Mitocôndrias (m) e vesículas (Re) estão presentes.

9 DISCUSSÃO

O conhecimento da fauna flebotomínica é extremamente importante no sentido de gerenciar estratégias para o controle das leishmanioses. Diversos trabalhos são realizados com o objetivo de identificar que espécies estão presentes em áreas endêmicas. No Estado de Pernambuco, a Zona da Mata concentra a maior parte dos casos da doença. Por conta disso, a maioria das pesquisas sobre flebotomíneos, em Pernambuco, se concentra nesta região.

Brandão-filho *et al.* (1994) relataram quatro espécies de flebotomíneos em área endêmica para LTA na Zona da Mata Pernambucana. As espécies encontradas foram: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. quinquefer*, *Lu. evandroi* e *Lu. aragaoi*. Tão como nosso estudo *Lu. whitmani* foi a espécie predominante. O estudo infere que *Lu. whitmani* seja o principal vetor responsável pela disseminação da LTA na área de estudo. De igual modo, nossos dados sugerem que em Timbaúba, a mesma espécie, *Lu. whitmani*, seja protagonista na manutenção da LTA no município. Das quatro espécies detectadas pelos autores, apenas *Lu. aragaoi* não foi detectada em nossas coletas, o que pode ser atribuído ao grau de interferência antrópica no meio, uma vez que a espécie em questão foi detectada apenas em ambientes extradomiciliares.

Anos mais tarde, em 1998, Brandão-filho *et al.* realizaram outro estudo na Zona da Mata de Pernambuco. As espécies encontradas foram: *Lutzomyia choti* (89,9%), *Lu. longispina*, *Lu. schreiberi*, *Lu. wellcomei*, *Lu. barretoii*, *Lu. ayrozai*, *Lu. evandroi*, *Lu. sordellii*. Das oito espécies relatadas, apenas três foram encontradas no nosso estudo: *Lu. wellcomei*, *Lu. evandroi* e *Lu. sordellii*. Este fato se justifica pela área de estudo. As coletas foram realizadas em área de mata destinada a treinamentos militares e as espécies que não foram detectadas no presente estudo são primordialmente coletadas apenas em áreas preservadas.

Carvalho *et al.* (2007) também trouxeram contribuições acerca da fauna flebotomínica do Estado. Estudo realizado no município de São Vicente Férrer, Zona da mata Norte, relatou a coexistência de 17 espécies: *Lutzomyia complexa*, *Lu. migonei*, *Lu. evandroi*, *Lu. sordellii*, *Lu. naftalekatzi*, *Lu. shannoni*, *Lu. capixaba*, *Lu. whitmani*, *Lu. tupinamboi*, *Lu. quinquefer*, *Lu. furcata*, *Lu. fescheri*, *Lu. walkeri*, *Lu. brasiliensis*, *Lu. oswaldoi*, *Lu. choti*, *Lu. schreiberi*. Destaca-se pelos autores a presença constante de *Lu. migonei* e *Lu. evandroi* em construções humanas e em abrigos de animais. Fato observado também em nosso estudo, onde capturamos estas espécies em armadilhas instaladas no domicílio e no peridomicílio, corroborando com a consolidação destas espécies como antropofílicas. *Lutzomyia complexa*, apesar de muito representativa nos valores absolutos, praticamente não foi encontrada próxima de seres

humanos, se restringindo aos remanescentes florestais (99,8%). Nosso estudo não avaliou esse tipo de ecossistema.

Dantas-Torres (2010) publicou um estudo com a distribuição espacial das espécies encontradas no Estado de Pernambuco. A fauna flebotomínica de Timbaúba aparece representada por *Lutzomyia (nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (nyssomyia) whitmani*. Entretanto, nossos dados demonstram uma diversidade maior no número de espécies de flebotomíneos. Relata-se aqui, pela primeira vez, a ocorrência de *Lu. migonei*, *Lu. sordellii*, *Lu. quinquefer* e *Lu. wellcomei* para o município de Timbaúba-PE.

Segundo o Ministério da Saúde das seis espécies detectadas neste estudo, três são potenciais vetores de LTA no Brasil: *Lu. whitmani*, *Lu. migonei* e *Lu. wellcomei*. Enquanto que a importância de *Lu. quinquefer* e *Lu. sordellii* na transmissão das leishmanioses é desconhecida (BRASIL, 2017).

O principal vetor de LV no Brasil é *Lu. longipalpis*. Entretanto, a ausência de *Lu. longipalpis* em área com casos autóctones da doença demonstra a existência de outras espécies envolvidas na transmissão. Segundo Ximenes *et al.* (2001) *Lu. evandroi* pode ser capaz de atuar na transmissão de *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da LV, a cães. No Rio Grande do Norte, *Lu. evandroi* é amplamente distribuída e está presente em áreas de leishmaniose visceral e mucocutânea, tanto no peridomicílio como no domicílio. De maneira análoga, fortes evidências correlacionaram a ausência de *Lu. longipalpis* e a presença de *Lu. migonei* com casos autóctones de LV. Silva *et al.* (2014) relataram infecção natural de *Lu. migonei* por *L. infantum chagasi* em São Vicente Férrer-PE. Somado ao fato da capacidade laboratorial de *Lu. migonei* em permitir o desenvolvimento de formas metacíclicas de *L. infantum chagasi*. Assim, *Lu. migonei*, além de vetor comprovado de LTA pode ter importância secundária na transmissão da LV no Brasil. Apesar de Timbaúba-PE não ter nenhum caso registrado de LV, nossos dados atentam para essa possibilidade, pois mesmo não possuindo em sua fauna flebotomínica o vetor reconhecido como principal (*Lu. longipalpis*), possui outras duas espécies investigadas como possíveis transmissoras, *Lu. migonei* e *Lu. evandroi*, demandando atenção contínua por parte dos serviços de saúde.

No que diz respeito a caracterização celular, relata-se aqui pela primeira vez a morfometria dos hemócitos de fêmeas adultas do flebotomíneo *Lu. migonei*. A partir das técnicas de microscopia óptica e eletrônica de transmissão foi possível caracterizar cinco tipos celulares na hemolinfa desta espécie, sendo classificados como: prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, adipohemócitos e oenocitóides.

Brazil e Brazil (1996) utilizando pupas de outra espécie do gênero *Lutzomyia*, o flebotômico *Lu. longipalpis*, descreveram quatro tipos de hemócitos: Prohemócitos, plasmócitos, oenocitóides e adipohemócitos. As descrições acerca das células encontradas por esses autores são semelhantes as que são feitas no presente estudo: Prohemócitos sendo relatados como células pequenas e com grande núcleo em relação ao citoplasma; Plasmócitos/plasmatócitos como células polimórficas; oenocitóides observados com núcleo excêntrico e relato da presença de pequenos vacúolos no citoplasma e adipohemócitos como células grandes com muitas inclusões lipídicas. Diferentemente do presente estudo, a população hemocitária predominante foi de prohemócitos e não foi relatada a presença de granulócitos. Entretanto, não foram mencionadas as medidas celulares ou quaisquer imagens dos hemócitos. Dessa forma, o presente estudo é pioneiro na apresentação das microfotografias e eletromicrografias dos hemócitos de flebotômicos do gênero *Lutzomyia*. A escassez de trabalhos na literatura científica focando o sistema imune celular em flebotômicos é justificado pela grande dificuldade em se extrair a hemolinfa do inseto, uma atividade altamente laboriosa.

Os prohemócitos, sem dúvida, estão entre as células mais comumente encontradas em circulação na hemocele. Diversos trabalhos de caracterização envolvendo inúmeras ordens de insetos têm evidenciado a presença desta célula. Khosravi *et al.* (2016) relatam prohemócitos na hemolinfa do himenóptero *Arge ochropus*, assim como Brayner *et al.* (2005) ao investigar as células de defesa do mosquito vetor da filariose linfática, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) e Araújo *et al.* (2008) ao estudar a resposta celular de *Ae. Aegypti* (Diptera: Culicidae). Prohemócitos também foram detectados em Hemiptera (CASELÍN-CASTRO *et al.*, 2010; BARRACCO *et al.*, 1987), Coleoptera (KWON *et al.*, 2014), Lepidoptera (BLANCO *et al.*, 2017) e Orthoptera (YU *et al.*, 2016), assim como em outras classes de Arthropoda, tal como Arachnida (WILCZEK *et al.*, 2018). Em todos estes trabalhos, os prohemócitos são células reconhecidas como células com grande relação núcleo/citoplasma e dito por alguns autores como células totipotentes (LAVINE; STRAND, 2002). Para outros, os prohemócitos são resultados de divisões assimétricas de granulócitos (KING; HILLYER, 2013).

Os granulócitos são células amplamente dispersas dentro de Insecta e consideradas, juntamente com os plasmatócitos, como células protagonistas na resposta imune inata. Kwon e colaboradores (2014) ao caracterizar os hemócitos de *Protaetia brevitarsis seulensis*, um Coleoptero que possui uma fase da vida no solo, se alimentando de diversas fontes de celulose em decomposição, semelhantemente aos flebotômicos, determinou que os granulócitos

participam ativamente do processo de fagocitose e que a ativação da autofagia poderia ser uma maneira eficiente de eliminar patógenos. As descrições feitas acerca dos granulócitos são compatíveis às realizadas neste estudo, relatando, através da microscopia eletrônica, que estas células possuem retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, complexo de Golgi, mitocôndrias e grânulos grandes eletrodensos.

Os granulócitos também são os principais fagócitos no lepidóptero *Galleria mellonella* (WU *et al.*, 2016) e correspondem de 80 a 95% da população hemocitária em mosquitos (HILLYER; STRAND, 2014).

Em relação aos plasmatócitos, são células sempre referenciadas como polimórficas e a observação de projeções citoplasmáticas é comum. Kwon e colaboradores (2014) relata filopodia em vários plasmatócitos desafiados por diferentes patógenos. As descrições realizadas neste trabalho são conduzintes às feitas por Araújo *et al.* (2008) ao caracterizar os hemócitos de *Aedes aegyptis* e por Brayner *et al.* (2005) ao avaliar o sistema imune inato celular de *Culex quinquefasciatus* onde são observados retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, complexo de Golgi e vacúolos no citoplasma para as duas espécies. Assim como em *Culex quinquefasciatus*, os plasmatócitos representam a maioria das células de defesa do invertebrado. O que também pode ser observado em *Drosophila*, onde os plasmatócitos representam aproximadamente 95% dos hemócitos circulantes. Neste gênero são considerados os fagócitos profissionais mais parecidos com a linhagem de monócitos / macrófagos de mamíferos (WILLIAMS, 2007).

Os eonocitóides encontrados neste estudo são similares aos descritos por outros autores (KHOSRAVI *et al.*, 2016, GIGLIO *et al.*, 2007) que relata pobreza de organelas no citoplasma destas células em *Arge ochropus* e *Carabus lefebvrei*. Perfil de retículo, poucas mitocôndrias e vesículas de diferentes tamanhos foram observados nesta caracterização. À microscopia de luz, é possível ver o núcleo excêntrico e um citoplasma homogêneo. Sua característica definidora é que eles são os principais produtores de fenoloxidase, enzima imprescindível para o processo de melanização (HILLYER; STRAND, 2014). Em larvas de larvas de *Cetonischema aeruginosa*, Giulianini *et al.* (2003) identificaram que eonocitóides também podem estar envolvidos diretamente da resposta fagocítica.

Os adipohemócitos em *Lu. migonei* são células polimórficas caracterizados por possuírem vesículas contendo material lipídico, às vezes grande o suficiente para deformar a célula. Suas características são semelhantes às observadas em outras espécies de insetos (ARAÚJO *et al.*, 2008, BRAYNER *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2002). Apesar de alguns autores não considerem adipohemócitos como hemócitos, mas como células pertencentes ao

corpo gorduroso dos insetos (HILLYER; CHRISTENSEN, 2002) ou variantes de granulócitos (PRICE; RATCLIFFE, 1974; KAAYA *et al.*, 1986) características como o número e a diversidade de organelas são marcadamente diferentes destes grupos celulares. A função aparente dessas células para ser o armazenamento de energia na forma de lipídios e glicogênio (HILLYER; CHRISTENSEN, 2002).

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. C. R. *et al.* Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an urban area of Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 49, n. 6, p. 698-702, nov./dez. 2016.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição e habitats: Distribuição Regional e Habitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 3, p. 207-255.
- ALEXANDER, B. A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 354-359, Apr. 1995.
- ALVARENGA, D. G. *et al.* Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Brasília, v. 43, n. 2, p.194-197, mar./abr. 2010.
- ARAÚJO, A. C. *et al.* Visceral leishmaniasis in Petrolina, state of Pernambuco, Brazil, 2007-2013. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. São Paulo, v. 58, n. 29, abr. 2016.
- ARAÚJO A. R. *et al.* Risk factors associated with american cutaneous leishmaniasis in an endemic area of brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** São Paulo, v. 58, n.86, dez. 2016.
- ARAÚJO, H. C. R. *et al.* Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron**. Oxford, v. 39, n. 2, p. 184-189, Jan. 2008.
- BARRACCO, M. A.; OLIVEIRA, R.; SCHLEMPER-JR, B. The hemocytes of *Panstrongylus megistrus* (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 431-438. Jul./Sep. 1987.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Rev. Bras. Epidemiol.** São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, set. 2004.
- BASTOS, T. S. A. **Estudos introdutórios sobre flebotomíneos**. 2012. (Seminário). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- BAXTER, R. H. G.; CONTET, A.; KRUEGER, K. Arthropod Innate Immune Systems and Vector-Borne Diseases. **Biochemistry**. Washington, v. 56, n.7, p. 907-918, Feb. 2017.
- BLANCO, L. A. A. *et al.* Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell Tissue res**. Berlim, v. 370, n.1, p.153-168, Oct. 2017.
- BOULANGER, N. *et al.* Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect. immun.** Washington, v. 72, n.12, Dec. 2004.
- BRAYNER, F.A. *et al.* Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). **Micron**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 359-367, Feb. 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SIVEP- Malária - Sistema de informação de vigilância epidemiológica- Notificação de casos**. Disponível em: <<http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb;jsessionid=0BA0CD2F4D60D4668960F725C1B57206?evt=2048001&hiddensections=header%2Cpath%2CdockTop%2CdockLeft%2Cfooterr&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&Server=srvbipdf03&Project=DMMalaria&>> Acesso em: 29 mar. 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação SINAN/SVS/MS**. Disponível em <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 10 nov.2016.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. 5. reimp. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

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

BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G. Vetores na Leishmaniose Americana. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., ALVES, C.R. **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. Cap.11, p. 193-200.

BRITO, M. E. F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo, v. 45, n.4, p. 425-429, Jul./Ago. 2012.

CANTANHÊDE, L. M. *et al.* Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania RNA Virus 1* and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 9, n. 9. Sept. 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004079>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

CASELÍN-CASTRO, S.; LLANDERAL-CÁZARES, C.; MÉNDEZ-GALLEGOS, S.J. Hemocytes of the cochineal insect: ultrastructure. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.** New York, v. 73, n. 3, p. 176–192, Mar. 2010.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. Leishmanioses: uma apresentação. In: _____. **Leishmanioses do Continente Americano.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. p. 17-26.

CURTI, M. C. M. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of cutaneous leishmaniasis and their relationship with the laboratory data, south of Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** Salvador, v.15 n.1, p.12-16. jan./fev. 2011.

DA ROSA A. P. T. *et al.* Carajas and Maraba viruses, two new vesiculoviruses isolated from phlebotomine sand flies in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v. 33, n. 5, p. 999–1006. Sept. 1984.

DE CARVALHO, M. R. *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.** Basel, v. 116, n. 1, p. 108–110, Oct. 2010.

Dillon, R. Life Cycle. **Sand fly & Leishmania Research Group.** Disponível em <http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle__habitats.htm>. Acesso em: 14 jul. 2017

DIAS, E.S. Psychodidae. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana.** 12. ed. São Paulo: Atheneu 2011. cap. 42, p. 377-385.

GALATI, E.A.B. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F.; Lainson, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil.** Fiocruz: Rio de Janeiro. cap. 2 p. 23-51. 2003.

GARDINER, E. M. M.; STRAND, M.R. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includes* and *Spodoptera frugiperda*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** New York, v. 43, n. 4, p. 147–164. Mar./Apr. 2000.

GAZZONNI, G. **Micromanipulador associado a estereomicroscópio.** Recife, 2016. 1 fotografia.

GIGLIO, A. *et al.* Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. **Micron.** Oxford, v. 39, n.5, p. 552–558, Jul. 2008.

GIULIANINI, P. G. *et al.* Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. **Tissue and Cell.** Edinburgh, v. 35, n. 4, p. 243-251, Aug. 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** São Paulo, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan./fev. 2003.

GUIMARÃES, V. *et al.* *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasit. Vectors.** London, v. 9, n.1. Mar. 2016.

GUIMARÃES-E-SILVA, A. S. *et al.* Leishmania infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS ONE**. San Francisco, v.12, n.8, p. 1-19, Aug. 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179052>>. Acesso em: 23 nov. 2017

GUPTA, A. P. Haemocyte types: their structure, synonyms, interrelationship and taxonomic significance. In: _____ . **insect Haemocytes, Development, forms, functions, and Techniques**. London: Cambridge University, 1979. Cap. 4, p. 85-127.

HANDLER, M. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **J. Am. Acad. Dermatol.** St. Louis, v. 73, n. 6, p. 897-908. Dec. 2015.

HILLYER, J. F. Insect immunology and hematopoiesis. **Dev. Comp. Immunol.**, Elmsford, v. 58, p. 102-118, May 2016.

HILLYER J.F.; CHRISTENSEN, B.M. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Histochem. Cell. Biol.** Berlin, v. 117, p. 431–440, May 2002.

HILLYER, J. F.; STRAND, M. R. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. **Curr. Opin. Insect Sci.**, Amsterdam, v. 3, p. 14-21, July 2014.

HOFFMANN, J.A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**. London, v. 426, n. 6962, p. 33-38, nov. 2003.

HWANG, S. *et al.* Circulating Hemocytes from Larvae of the Japanese Rhinoceros Beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the Cellular Immune Response to Microorganisms. **PLoS ONE**. San Francisco, v.10, n.6, June 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128519>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Culture growth of *Leishmania donovani* from bone marrow aspirate. **Partners infectious disease images**. Disponível em <<http://www.idimages.org/m/atlas/organism/?atlasentryID=64&organism=Leishmania>>. Acesso em: 01 abr. 2017

IVES, A. *et al.*, *Leishmania* RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Science**, Washington, v. 331, n. 6018, p. 775-778, Feb. 2011.

JAIN, K; JAIN, N. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **J. immunol. methods**. Amsterdam, v. 422, p. 1-12, July 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 9, n.8, p.604-615, Jul, 2011.

KENT, A. D. *et al.* Studies on the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in high-transmission areas of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Suriname. **Parasit. Vectors**. London, v. 6, n. 318, p. 1-8, Nov. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029572/pdf/1756-3305-6-318.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2017

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatol. Clin.** Philadelphia, v. 33, n.3, p. 579–593, July 2015.

KHOSRAVI, R. *et al.* Hemocytes of the Rose Sawfly *Arge ochropus* (Gmelin) (Hymenoptera: Argidae) **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v. 45, p. 58–65, Fev. 2016.

KING, J. G.; HILLYER, J. F. Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. **BMC Cell. Biol.** London, v. 11, n. 55, Apr. 2013. Disponível em: <<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-11-55>>. Acesso em: 30 set. 2017.

KWON, H.; BANG, K.; CHO, S. Characterization of the hemocytes in larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: Involvement of granulocyte-mediated phagocytosis. **PLoS ONE.** San Francisco, v. 9, n. 8, Aug. 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103620>>. Acesso em: 30 set. 2017.

LAVINE, M.D., STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** Oxford, v. 32, n.10, p. 1295–1309, Oct. 2002.

LEWIS, D. J. *et al.* Proposals for a stable classification of phlebotomine sandflies. **Syst. Entom.** Oxford, v. 2, n.4, p.319-332, Oct. 1977.

LINDHOLZ, C. G. **Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), infectadas por Leishmania spp., na localidade Praia das Pombas, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2015.

LOG NATURE. **Armadilha CDC.** Disponível em: <<https://www.lognature.com.br/produto/armadilhas/CDC>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

LUNDGREN, J.G., JURAT-FUENTES, J.L. Physiology and ecology of host defense against microbial invaders. In: VEGA, F.E.; KAYA, H.K. (Eds.), **Insect Pathology**, 2º Ed. Academic Press, London, 2012, cap.15, p. 461- 480.

MACHADO, V.E. **Estabelecimento de colônia de *Lutzomyia (L.) longipalpis* (Diptera:Psychodidae) e testes de túnel de vento para avaliação de substâncias atrativas para flebotomíneos.** 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica). Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Faculdade De Ciências Farmacêuticas Araraquara, São Paulo, 2014.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária.** São Paulo: Atheneu; 2001.

MARMARAS, V. J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity Cellular Signalling. **Cell. Signal.**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 186-195, Feb. 2009.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med. Vet. Entomol.** Oxford, v. 27, n.2, p.127-147, June 2013.

MASCARI, T. M. *et al.* Ecological and Control Techniques for Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Associated with Rodent Reservoirs of Leishmaniasis. **Plos Negl. Trop. Dis.** San Francisco, v. 7, n. 9, Sept. 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002434>>. Acesso em: 17 set. 2017

MIRANDA, T. M. *et al.* Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Pan-Amazônica Saúde.** Ananindeua, v. 2, n.1, Mar. 2011.

MISSAWA, N. A. *et al.* Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Brasília, v. 44, n.1, p.76-78, jan./fev. 2011.

MONTEIRO, C. C.; **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. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte. 2012.

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. **Rev. cienc. salud,** Bogotá, v. 3, n. 2, p. 129-135, Ago. 2005.

MOYA, S. *et al.* First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. **Acta Tropica,** Basel, v. 152, p. 181–184, Dez. 2015.

NATION, J. L. Circulatory System. In: _____. **Insect Physiology and Biochemistry.** 3. ed. New York: Kindle Edition, 2015. cap. 15, p. 405- 432.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of the leishmaniasis:** report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Epidemiological situation.** Disponível em <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acesso em 31/08 2017

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Wkly. epidemiol. rec.,** Geneva, n. 22, June 2016.

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

PACE, D. Leishmaniasis. **J. infect.** London, v. 69, n. 1, p.S10-S18, Nov. 2014.

PELISSARI, D.M. *et. al.* Treatment of Visceral Leishmaniasis and American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n.1, p. 107-110, jan./mar. 2011

PIMENTA, P. F. P. Os morfotipos de *Leishmania* encontrados dentro dos flebotomíneos vetores. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, 2012. Disponível em <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_12_A_Interacao_do_Protozoario_Leishmania_com_seus_Insetos_Vetores.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2017

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N.F.C.; A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: **TÓPICOS Avançados em Entomologia Molecular** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2012. Cap.12. Disponível em <<http://inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1/capitulo-12-a-interacao-do-protozoario-leishmania-com-seus-insetos-vetores/view>>. Acesso em: 28 out. 2016

PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N.F.C.; BLANCO, E.E.N. Interação Vetor-Hospedeiro: Interação *Leishmania*-Hospedeiro invertebrado. In: RANGEL, E.F., LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. Cap.05, p. 275-289.

RÊGO, F.D. **Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.** 2013. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Fev. 2013.

REIDENBACH, K.R. *et al.* Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. **BMC Evol. Biol.** London, v. 9, n. 298, Dec. 2009.

REY, L. (Org.). O complexo “*Leishmania braziliensis*” e as leishmaníases tegumentares americanas. In: _____. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 26, p. 372-383.

ROGERS, M.E.; CHANGE, M.L.; BATES, P.A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania Mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**. London, v. 124, n.5, p.495-507, May 2002.

ROGERS, M. E. *et al.* Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of PPG. **Nature**. London, v. 430, n. 6998 p. 463-467, May 2004

ROSALES, C. Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. **Insect. Physiol. Ecology**. London, v. 3, Apr. 2017.

ROSALES, C. Phagocytosis, a cellular immune response in insects. **ISJ.**, Modena, v. 8, n.1, p. 109–131, Jun. 2011.

ROSETTO, M. *et al.* Antimicrobial activities in the haemolymph of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). **Ital. J. Zool.**, Florença, v. 70, p. 221–224, jan. 2003.

SALOMÓN, O. *et al.* *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Trop.**, Basel, v. 113, n. 1, p. 84–87, Jan. 2010.

SANTINI, M.S. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* presence and abundance distribution at different microspatial scales in an urban scenario. **Plos Negl. Trop. Dis.** San Francisco, v. 9, n.8 Aug. 2015. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4537120/pdf/pntd.0003951.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2017.

SERAFIM, T. D. *et al.* *Leishmania* Metacyclogenesis Is Promoted in the Absence of Purines. **Plos Negl. Trop. Dis.** San Francisco, v. 6, n.9, Sept. 2012. Disponível em <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001833>>. Acesso em 04 abr. 2017.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Washington, v. 89, n.20, p.9944-9948, Oct. 1992.

SILVA, J.E.B., BOLELI, I.C., SIMÕES, Z.L.P. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *anastrepha obliqua* (diptera, tephritidae) larvae. **Braz. J. Biol.** São Paulo, v. 62 n.4A, p. 689-699, nov. 2002.

SILVA, L.B. *et al.* Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos urbanos de leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil. **Rev. Patol. Trop.** Goiania, v. 44, n.2, p. 181-193. Abr./Jun. 2015.

STIERHOF, Y.D. *et al.* Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **Eur. J. Cell. Biol.** Stuttgart, v. 78, n. 10, p. 675-689, Oct 1999.

TEMPONE, A.J., PITALUGA, A.N., TRAUB-CSEKÖ, Y.M. Aspectos Moleculares da Interação Flebotomíneo-*Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., ALVES, C.R. **Leishmanioses do Continente Americano.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. Cap.09, p. 159-180.

TINOCO-NUNES, B. *et al.* The sandfly *Lutzomyia longipalpis* LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*. **Parasit Vectors.** London, v. 9, n.222, Apr. 2016. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839078/>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

TSAKAS, S.; MARMARAS, V.J. Insect Immunity and Its Signalling: An Overview. **ISJ.** Patras, Grécia. v. 7, p. 228-238, Oct. 2010.

VILELA, M. L.; AGUIAR, G. M. **I Curso de Taxonomia dos Vetores das Leishmanioses.** [S. l.: s. n.], 2009.

VILELA, M. L. *et al.* *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*: fatores associados ao processo de expansão e urbanização da leishmaniose visceral americana. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., ALVES, C.R. **Leishmanioses do Continente Americano.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. Cap. 10, p. 183-192.

VOLF, P., VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **J. Vector Ecol.** Santa Ana, v. 36, n.1, p. S1 – S9, Mar. 2011.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v. 35, p. 926-930, Sept. 1986.

WILCZEK, G. *et al.*, Effects of food contaminated with cadmium and copper on hemocytes of *Steatoda grossa* (Araneae: Theridiidae). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 149 p. 267-274, Mar. 2018.

WILLIAMS, M. J. *Drosophila* Hemopoiesis and Cellular Immunity. **J. Immunol.** Baltimore, v. 178, n. 8, p. 4711-4716. Apr. 2007.

WILSON, R. Blood-fed *Lutzomyia longipalpis* sandfly. **PloS pathog.**, San Francisco, v. 5, n. 8, Aug. 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/image.ppat.v05.i08>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

WOODRING, J.P. Circulatory systems, In: BLUM, M. S. (Ed.). **Fundamentals of insect Physiol.** New York: John Wiley & Sons, 1985. cap. 1, p. 5-57.

WU, G. *et al.* Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue Cell.** Edinburgh, v. 48, n.4, p. 297- 304, June 2016.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). **Mem. Am. Entomol. Inst.** Florida, v. 54, p. 881, Mar. 1994.

YU, Y. *et al.* Wright-Giemsa staining to observe phagocytes in *Locusta migratoria* infected with *Metarhizium acridum*. **J. Invertebr. Pathol.** New York, v. 139, p. 19-24, Sept. 2016.

ZHANG, R. *et al.* Regulation of Antimicrobial Peptides in *Aedes aegypti* Aag2 Cells. **Front Cell Infect Microbiol.** Lausanne, v. 7, Art. 22, Feb. 2017.