



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

**FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E
CIRCULAÇÃO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS (KINETOPLASTIDA:
TRYPANOSOMATIDAE) EM ÁREA DE RISCO PARA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, AM-
BR.**

FRANCIMEIRE GOMES PINHEIRO

Manaus

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

FRANCIMEIRE GOMES PINHEIRO

FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E CIRCULAÇÃO DE
TRIPANOSSOMATÍDEOS (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) EM ÁREA
DE RISCO PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL
DA CACHOEIRA, AM-BR.

Tese apresentada ao Programa Multi-
institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito final para a
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia, área de concentração
Saúde.

Orientação: Dr^a. Antonia Maria Ramos Franco

Manaus

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Pinheiro, Francimeire Gomes

P654f Fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e circulação de Tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em área de risco para Leishmaniose cutânea no município de São Gabriel da Cachoeira, AM-BR / Francimeire Gomes Pinheiro. - Manaus: UFAM, 2013.

192 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2013.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Antonia Maria Ramos Franco

1. Leishmaniose cutânea 2. Flebotomíneos 3. Tripanossomatídeos 4. Epidemiologia 5. Vetores 6. *Leishmania* I. Franco, Antonia Maria Ramos (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 593.161+595.77:616.928.5(043.2)

Sinopse:

Apesar do conhecimento produzido sobre os diversos elementos que compõem a cadeia de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Amazonas, os estudos relacionados a tríade epidemiológica (hospedeiro, vetor e agente etiológico) desta doença nos municípios da região conhecida como Alto Rio Negro (São Gabriel da Cachoeira - Santa Izabel do Rio Negro – Barcelos – Novo Airão) ainda são escassos. Neste estudo sugere-se a participação de *L. dendrophyla* na transmissão de flagelados do gênero *Leishmania* circulando em SGC, podendo ser a região considerada como área de risco em LTA.

Palavras-chave: Leishmaniose – Sequenciamento – Flebotomíneos – Tripanossomatídeos – *Leishmania* – *Lutzomyia*

Dedicatória ...

“A minha família e amigos pelo carinho e incentivo para a realização deste trabalho”.

AGRADECIMENTOS

✚ Na realização deste trabalho, diversas pessoas e instituições deram sua parcela de contribuição e merecem nossos sinceros agradecimentos:

✚ Primeiramente à DEUS, que em todos os momentos de solidão com os artigos e o computador esteve presente como uma luz divina;

✚ À Dra. ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO, o que falar desta pessoa, para mim, foi a peça fundamental na minha jornada científica, pois foi quem lapidou o que sou hoje, pessoa que me introduziu no mundo maravilhoso das *Leishmania*. Sei que de todos os seus filhos científicos, sou a mais estressada, mas tenho o orgulho de ter sido a primeira a chegar e aprender “o estilo Antonia Franco”. Tu és para mim o espelho de pessoa integra, dedicada e ética. Obrigada chefe!;

✚ Ao meu companheiro, amigo e amor, TÚLIO, você chegou na minha vida e deu-me um porto seguro, às vezes você é mais meu pai do que meu marido, mas eu gosto. Obrigado Amor, pelo carinho, pela força e pelas noites e noites no celular. Você é sem dúvida uma pessoa iluminada por DEUS;

✚ Aos meus familiares (D. MARIA (mãe); Sr FRANCISCO (pai) [IN MEMORIAM]; meus irmãos (FRAN, PINHA, VITOR); cunhadas (MARA e ROSANGELA); cunhado (SALES) e queridos sobrinhos (MARIA CLARA, LUANA, PAULO VITOR, PAULO TIAGO, JOÃO PAULO, BISNETO E A MAIS LINDA DE TODAS AS ESTRELAS DO CÉU, BEATRIZ [IN MEMORIAM]. A agradeço a força, a fé e principalmente as orações. AMO MUITO VOCÊS!;

✚ Aos meus três mosqueteiros - irei colocá-los em ordem alfabética para não dá briga, pois o sentimento por vocês é igual: ARTÊMIO, FRANCISCO (CHICO) E LOURIVAL (LOURO). Nesta batalha a vitória é também de vocês. Meu muitíssimo obrigada!!!;

✚ Aos meus amigos do INPA (MARICLEIDE (uma grande mulher), SÔNIA, TAIS, ALANA, FABIANE, IVONEI, ROBERTINHO, CLAUDIA, PAULO EDSON, ANA CLEIDE, CARLINHOS, LUANDA) pela paciência e palavra amiga nos momentos de desespero..Muito obrigada!!;

✚ Aos meus amigos e a direção da FAMETRO (INÁCIO, ANA LÚCIA, JESSICA, KARINA, GEORGIA, PAULA FABIOLA, QUELY; MARCELO, THAIS ARRUDA e Prof^a. CINARA) pelas palavras de confiança e pela minha liberação de meu trabalho para a realização deste projeto, meu muito obrigada!!;

✚ Às minhas amigas de hoje e sempre RAQUEL BORGES E PRISCILA TREGUE, obrigada pelas palavras amigáveis e de muita fé;

✚ Ao meu amigo de todas as horas AFRÂNIO CARVALHO;

✚ Ao meu amigo e companheiro de doutorado LUIS HENRIQUE, tenho certeza que sem a sua forma calma de vê as coisas eu não teria passado todas as noites em claro, muito obrigada!

✚ Ao Sr. RUI FREITAS, pelas identificações dos flebotomíneos, este é um exemplo de dedicação ao seu trabalho, e que belíssimo trabalho!!;

✚ À minha amiga, agora Dra. LILIANE, pela força, amizade e principalmente pelas belíssimas sugestões nas correções desta tese;

- ✚ À minha mais nova amiga PAULA CRUZ, pela maravilhosa e intensa ajuda no sequenciamento, que belo trabalho conseguimos. MUITO OBRIGADA!!;
- ✚ À Dra JAQUELINE, muito obrigada pela liberação do sequenciador para as análises de minhas amostras, muito obrigada!!!;
- ✚ À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade desta Pós-Graduação;
- ✚ Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM pela minha formação;
- ✚ Ao Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas pelo apoio logístico;
- ✚ Ao Comando Militar do Amazônia, em especial a todos da 2ª Brigada de Infantaria de Selva Arariboia em São Gabriel da Cachoeira, muito obrigada;
- ✚ Ao Projeto Fronteira/ FINEP pela concessão da verba para o trabalho em São Gabriel da Cachoeira;
- ✚ À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Amazonas/FAPEAM pela concessão de bolsa e auxílio financeiro;
- ✚ Aos amigos e funcionários do Instituto Federal do Amazonas/IFAM em São Gabriel da Cachoeira, pelo apoio logístico;

“O inventor da lâmpada, não acertou logo de cara. Ele precisou de várias tentativas. Quando ele foi questionado sobre esses “fracassos”, ele respondeu:

Eu não falhei. Encontrei 10 mil soluções que não davam certo”.

Thomas Edson.

“Tudo tem a sua ocasião própria, e há tempo para todo propósito debaixo do céu”;

“Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou; tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derribar, e tempo de edificar; tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar; tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de abster-se de abraçar; tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de deitar fora; tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar; tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra e tempo de paz”.

(Eclesiastes 3: 1-8)

RESUMO

Apesar do conhecimento produzido sobre os diversos elementos que compõem a cadeia de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Amazonas, os estudos relacionados a tríade epidemiológica (hospedeiro, vetor e agente etiológico) desta doença nos municípios da região conhecida como Alto Rio Negro (São Gabriel da Cachoeira - Santa Izabel do Rio Negro – Barcelos) ainda são escassos, em particular em São Gabriel da Cachoeira (SGC), onde a região limita-se com os países da Venezuela e Colômbia. Em decorrência disso e considerando a ausência de trabalhos relacionados ao agente etiológico e vetores da LTA que se encontram circulando no município de SGC, foi realizado levantamento da entomofauna de flebotomíneos e com isto verificou-se os potenciais transmissores de tripanossomatídeos e/ou leishmânias; além disso, avaliou-se a infecção natural nestes insetos pela técnica de dissecação e Nested-PCR, e finalmente realizou-se a caracterização bioquímica e molecular para identificação das espécies de *Leishmania*, isoladas de flebotomíneos e humanos. Do total de 6832 flebotomíneos coletados e distribuídos em 50 espécies foi observado um índice de diversidade considerável ($H' = 1,19$). Destes 66% (4526/6832) correspondem a 19 espécies envolvidas na transmissão de leishmânias e/ou tripanossomatídeos de importância para a saúde pública. Foi notificado o primeiro registro de *Lutzomyia conviti* para o Brasil e para o Amazonas. A taxa de infecção natural por tripanossomatídeos foi em torno de 4,26%, sendo *L. dendrophyla* a espécie que apresentou a maior taxa de infecção, com cerca de 3,6%. Dos isolados, apenas 24 cresceram em cultivo, sendo 23 de flebotomíneo e um humano. Um total de 470 fêmeas de 13 espécies diferentes entre elas: *L. ayrozai*, *L. dendrophyla* e *L. davisii* foram testadas com os iniciadores descrito por Cruz et al. (2002). Os isolados não apresentaram perfis bioquímicos similares as cepas de referência de *Leishmania* e *Endotrypanum*. Dos fragmentos de DNA da região ITS sequenciados, verificou-se a formação de três grupos/espécies, sendo nove com características biológicas similares ao subgênero *Viannia* e dois para o subgênero *Leishmania*. Sugere-se a participação de *L. dendrophyla* na transmissão de flagelados do gênero *Leishmania* circulando em SGC, podendo ser a região considerada como área de risco em LTA.

ABSTRACT

Despite the knowledge produced about the various elements that make up the chain of transmission of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the Amazonas State, the studies related to epidemiological triad (reservoir host, vector and etiologic agent) of this disease in the municipalities of the region known as the Upper Rio Negro (São Gabriel da Cachoeira - Santa Isabel do Rio Negro - Barcelos) are still scarce, particularly in São Gabriel da Cachoeira (SGC), where the region is limited to the countries of Venezuela and Colombia. As a result and given the lack of work related to the etiologic agent of ACL and vectors that are circulating in the municipality of SGC, the survey was conducted to know the entomofauna of sandflies and the potential vectors of trypanosomatids and/or leishmanias; beyond addition, we evaluated the natural infection of these insects by dissection technique and nested PCR, and finally the biochemical characterization and molecular identification of *Leishmania* species isolated from sandflies and humans. Of the total of 6832 sandflies collected and distributed in 50 species was observed considerable diversity index ($H' = 1.19$). Of these 66% (4526/6832) account for 19 species involved in the transmission of leishmanias and / or trypanosomatids with importance to public health. It was reported the first record of *Lutzomyia conviti* to Brazil and the Amazonas State. The rate of natural infection by trypanosomatids was around 4.26%, and *L. dendrophyla* was the species with the highest infection rate, about 3.6%. Of the isolates, only 24 were grown in culture, 23 sandflies and only one from human. A total of 470 female, 13 different species including *L. ayrozai*, *L. dendrophyla* and *L. davisii* were tested with the primers described by Cruz et al. (2002). The isolates showed no biochemical profiles similar with the reference strains of *Leishmania* and *Endotrypanum*. DNA fragments of the ITS region sequenced was found to form three groups/species, nine with biological characteristics similar to the subgenus *Viannia* and two for the subgenus *Leishmania*. It is suggested the participation of *L. dendrophyla* as a vector of the genus *Leishmania* in SGC, and that this region can be considered as a risk area in ACL.

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1- Os flebotomíneos.....	05
2.2- Os tripanossomatídeos.....	07
2.3- Tripanossomatídeos transmitidos por flebotomíneos.....	13
2.4- A circulação da <i>Leishmania</i> no Amazonas.....	13
2.5- Áreas de fronteira no extremo noroeste brasileiro e a circulação de <i>Leishmania</i>	17
2.6- Vetores e <i>Leishmania</i> que ocorrem no Amazonas, Venezuela e Colômbia.....	20
2.7- Métodos de identificação de tripanossomatídeos.....	22
3. OBJETIVOS.....	26
3.1- Geral.....	26
3.2- Específico.....	26
4. CAPÍTULO I.....	27
5. CAPÍTULO II.....	52
6. CAPÍTULO III.....	81
7. CAPÍTULO IV.....	88
8. CAPÍTULO V.....	114
9. DISCUSSÃO GERAL.....	152
10. CONCLUSÕES GERAIS.....	162
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	164
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165
13. ANEXO.....	184

LISTA DE TABELAS

	Pág.
INTRODUÇÃO	
Tabela 1. Ocorrência de infecção natural em flebotomíneos por tripanossomatídeos dos gêneros <i>Endotrypanum</i> , <i>Trypanosoma</i> e <i>Crithidia</i>	14
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Número de indivíduos coletados de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de São Gabriel da Cachoeira, por meio de armadilha luminosa do tipo CDC e aspiração em base de árvore, no período de 2007 a 2011, Amazonas, Brasil.....	37
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Flebotomíneos incriminados como transmissores de tripanossomatídeos, capturados em área silvestre no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (períodos de 2007 a 2011).....	64
Tabela 2. Espécies de flebotomíneos comprovadamente e/ou suspeitas na transmissão de tripanossomatídeos já descritos na literatura.....	72
CAPÍTULO V	
Tabela 1. Origem e identificação das cepas de referência utilizadas para identificação preliminar das amostras isoladas.....	122
Tabela 2. Localização dos flagelados no tubo digestório das fêmeas de flebotomíneos infectadas coletadas na área de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil.....	126
Tabela 3. Isolados humanos de <i>Leishmania</i> sp. do município de São Gabriel da Cachoeira, AM.....	128

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	Pág.
Figura 1. Pleomorfismo nos tripanossomatídeos: A – Promastigota; B – Opistomastigota; C – Epimastigota; D – Tripomastigota; E – Coanomastigota; F – Amastigota; G – Paramastigota; H – Esferomastigota; n – núcleo; c – cinetoplasto; f – flagelo; b – bolsa flagelar (invaginação da membrana onde se insere o flagelo); m – membrana ondulante (prega da bainha do flagelo que permite a comunicação com a membrana plasmática). Fonte: NEVES et al., 2011.....	08
Figura 2. Mapa do Brasil, indicando a localização do município de São Gabriel da Cachoeira. Fonte: ISA (2005).....	18
Figura 3. Parque Nacional do Pico da Neblina, localizado no Município de São Gabriel da Cachoeira – A: Placa de entrada dos limítrofes do parque e B: Vista do Pico da Neblina. Fontes: Pinheiro, 2008 e Exército Brasileiro, 2009.....	19
Figura 4. Mapa da Tríplice Fronteira: Brasil - Colômbia - Venezuela. Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> e flebotomíneos vetores que ocorrem no Amazonas, Colômbia e Venezuela. Fonte: www.defesabr.com/abertura.htm	23
CAPÍTULO I	
Figura 1. Mapa da área de coleta com as respectivas coordenadas: Estrada de Cucuí e Camanaus - Fonte: Artêmio Coelho da Silva, 2011, INPA.....	31

Figura 2. Métodos de coleta de flebotomíneos: **(a)** armadilha luminosa tipo CDC; **(b)** aspiração em base de árvore com CDC adaptada à captura manual..... 32

Figura 3. Processo de triagem e montagem para identificação dos flebotomíneos. **(a)** retiradas dos flebotomíneos utilizando capturador de Castro; **(b)** dissecação das fêmeas e separação dos machos com a retirada das genitálias para identificação; **(c)** montagem das genitálias em lâmina com solução de Berlese. Fonte: Pinheiro, 2007..... 33

Figura 4. Comparação do (A) Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H') e o (B) Índice de Equitabilidade (J') entre os métodos de coletas (armadilha luminosa CDC e coleta em base de árvore - BA) no período de 2007 a 2011, em São Gabriel da Cachoeira, AM..... 40

CAPÍTULO II

Figura 1. Distribuição entre os municípios do Amazonas com maior número de notificações de Leishmaniose Tegumentar Americana nos anos de 2010 e primeiro semestre de 2011. Fonte: SINAN, 2011..... 55

Figura 2. Localização do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas - BR e área da BR 307 (Mapa Satelital) e dos locais onde foram realizadas as coletas dos flebotomíneos. Fonte: MapLink/Tele Atlas..... 57

Figura 3. Número de casos de Leishmaniose tegumentar no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira, AM, BR. Fonte: SINAN, 2011..... 59

Figura 4. Perfil sócio-epidemiológico dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar, no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira, AM. **A:** Etnia; **B:** Gênero; **C:** Área de moradia; **D:** Forma diagnosticada. Fonte: Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira (HGU/SGC)..... 60

Figura 5. Faixa etária dos pacientes diagnosticado para Leishmaniose Tegumentar Americana, no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira..... 61

Figura 6. Tipo de ocupação profissional dos pacientes diagnosticados para Leishmaniose Tegumentar Americana, no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira..... 62

CAPÍTULO IV

Figura 1. Gene de mini-éxon de *Leishmania*. Cada repetição contém éxon altamente conservado (39 pb), uma região moderadamente variável de íntrons (55-101 pb), e uma sequência de espaçador altamente variável não transcrita (51 a 341 pb). Fonte: Marfurt et al., 2003..... 91

Figura 2. Resultado obtido após ensaios preliminares de Ln-PCR. Gel de agarose a 1,5%, corrida de eletroforese com tampão TAE 1X, de DNA extraídos: 1- Fêmea de *Lutzomyia umbratilis* não infectado; 2- Macho de *Lutzomyia umbratilis* não infectado; 3- Fêmea de *L. umbratilis* infectado (+); 4- Fêmea de *L. umbratilis* infectado (++); 5 e 6- Machos de *L. umbratilis* com cultura de *Leishmania guyanensis*; 7 e 8- Fêmeas de *L. umbratilis* de com cultura de *L. guyanensis*; 9- Cultura de *L. chagasi*; 10- Cultura de *L. deanei*; 11- Cultura de *Endotrypanum schaudinni*; 12,13 e 14- Cultura de *L. guyanensis*; 15- Cultura de *L. amazonensis*; 16- Cultura de *Trypanosoma cruzi*; 17- Cultura de *T. rangeli*; 18- Controle positivo de *L. braziliensis* (*Viannia*) – 242pb; 19- Controle positivo de *L. amazonensis* (*Leishmania*) – 302pb; 20- Controle positivo de *L. infantum/L. chagasi* – 451pb; PM-Peso Molecular/Ladder 100pb..... 98

Figura 3. Eletroforese a 1,5% de agarose dos produtos da 2ª. amplificação de Ln-PCR de amostras de cultura de *Leishmania* quantificadas utilizando-se iniciadores sub-gênero específicos. 1-controle negativo do mix; 2-controle negativo da 1ª. PCR; 3-vazio; 4-controle positivo (*L. guyanensis*); 5-controle positivo (*L. amazonensis*); 6-vazio; 7 a 12- concentrações de 5, 11, 40, 57, 2,85 x 10² e 2,85 x 10³ promastigotas de *L. guyanensis*, respectivamente; 13 a 18- concentrações de 5, 11, 40, 57, 2,85 x 10² e 2,85 x 10³ flagelados de *L. amazonensis*, respectivamente; PM-Peso Molecular/Ladder 100pb..... 100

CAPÍTULO V

Figura 1. Lesões suspeitas para leishmaniose em pacientes de São Gabriel da Cachoeira. **a:** Lesão sob a forma de úlcera típica no membro inferior esquerdo (isolado MHOM/BR/2008/IM5742); **b:** Lesão verrucosa no membro inferior direito (MHOM/BR/2008/IM5743). Fonte: Pinheiro, 2008..... 120

Figura 2. Fotomicrografias de formas promastigotas isoladas de flebotomíneos, lâminas coradas pelo método de Giemsa (1000X) Fonte: Pinheiro, 2011..... 127

Figura 3. Lesões leishmanióticas em pacientes do Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira - HGU/SGC. A e B: paciente a MHOM/BR/08/IM5742; C: paciente MHOM/BR/08/IM5744; D: paciente: MHOM/BR/08/IM5743; E: MHOM/BR/09/IM5745; F: MHOM/BR/07/IM5741. Fonte: Pinheiro, 2007; 2008..... 129

Figura 4. Perfis isoenzimáticos (PGM, G6PDH e GPI). de cepas de referência dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* e das amostras isoladas de flebotomíneos e de humano em São Gabriel da Cachoeira, AM. La: *Leishmania amazonensis*; Lc: *Leishmania colombiensis*; Ls: *Leishmania shawi*; Lg: *Leishmania guyanensis*; Lb: *Leishmania braziliensis*; E: *Endotrypanum* sp.; Ln: *Leishmania naiffi*; Ld: *Leishmania deane*..... 131

Figura 5. Produtos da amplificação da região de mini-éxon. Gel de poliacrilamida 12% corado por nitrato de prata, corrida de eletroforese em tampão TAE 1X. 6a: 1° poço - PM- marcador de peso Molecular 100pb; 2° e 3° poços: cepas de referência (*L. braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*); 4°poço: isolado de SGC 5707; 6b: 1° poço - PM- marcador de peso Molecular 100pb; 2° ao 6° poços: isolados de SGC 5744, 5719, 5720, 5721 e 5728..... 133

Figura 6. Dendrograma do sequenciamento segundo o algoritmo de neighbor-joining (NJ) dos isolados de SGC com a formação de três grupos com características biológicas similares para os subgêneros *Viannia* (A, B) e *Leishmania* do gênero *Leishmania* (C). Abaixo mapa com a localização (em vermelho) da coleta dos isolados humanos e de flebotomíneos, nos quais foram agrupados de acordo com o sequenciamento da região de ITS..... 134

Figura 7. Dendrograma construído a partir de sequências da região ITS do rDNA dos isolados de São Gabriel da Cachoeira e de espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* depositadas no GenBank, utilizando o método *Neighbor-Joining*. Os números nos ramos se referem aos índices de *bootstrap*..... 135

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) infectarem uma variada gama de hospedeiros, apenas os gêneros *Leishmania* Ross, 1903 e *Trypanosoma* Gruby, 1843 são encontrados infectando seres humanos e considerados agentes etiológicos de importantes doenças, dentre elas: a Leishmaniose, Doença de Chagas e Tripanossomíase africana (JAN et al., 2010; FOISSNER et al., 2006; LAINSON e SHAW, 1987; MCGHEE, 1980).

Em relação ao gênero *Leishmania*, é provavelmente o que contém o maior número de espécies patogênicas para o homem (CUPOLILLO et al., 2000; ALVAR et al., 2006; DUJARDIM, 2006). Sendo dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com o desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do vetor. Portanto parasitos que se aderem à porção anterior e média pertencem ao subgênero *Leishmania* - desenvolvimento suprapylaria, enquanto os parasitos do subgênero *Viannia* aderem-se às paredes do intestino posterior (piloro e íleo) - desenvolvimento peripylaria (LAINSON e SHAW, 1979; 1987).

As leishmanioses são doenças parasitárias distribuídas no Velho Mundo (Sul da Europa, Leste Central e Oeste da África e Ásia Central) e no Novo Mundo, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (WHO, 2006). No continente americano, as formas clínicas da doença são conhecidas como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA).

Estas doenças são transmitidas por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) [SHORTT et al., 1931] e aproximadamente 800 espécies já foram catalogadas em todo o mundo. Porém, somente 32 espécies têm sido implicadas na

transmissão da leishmaniose humana (ARIAS e FREITAS, 1977; WHO, 1990; YOUNG e DUNCAN, 1994; GALATI, 2003; SALOMÓN, 2009).

A Amazônia é a região do Brasil que apresenta a maior diversidade de tripanossomatídeos isolados (RANGEL e LAINSON 2003), incluindo parasitos dos gêneros *Leishmania* (LAINSON et al., 1979; LAINSON, 1983; SILVEIRA et al., 1987; LAINSON e SHAW, 1998), *Endotrypanum* Mesnil e Brimont, 1908 (ARIAS et al., 1985; ROGERS et al., 1988), *Crithidia* Léger, 1902 (RYAN et al., 1987a; SHAW et al., 1987) e *Trypanosoma* (LAINSON e SHAW, 1972; 1979; YOUNG et al., 1987; NAIFF et al., 1989), envolvendo inúmeras espécies de vetores flebotomíneos (BAPTISTA et al., 2003).

Estudos epidemiológicos têm sugerido ou incriminado algumas espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* França, 1924 como transmissores de LTA no Amazonas (ARIAS e FREITAS, 1977a; 1982; READY et al., 1986; LAINSON e SHAW; 1989; AZEVEDO et al., 1993). A espécie *Lutzomyia umbratilis*, é o principal vetor da *Leishmania (Viannia) guyanensis*, ao norte do Rio Amazonas, predominando nas florestas primárias dessa região e a *L. anduzei*, considerada como vetor secundário deste parasito. A *L. flaviscutellata*, habita floresta primária, sendo mais abundante próximo ao solo, se adapta bem às florestas secundárias de capoeira, estudos tem comprovado a transmissão da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* por este vetor, e a *L. olmeca nociva*, vetor secundário (ARIAS e FREITAS, 1977; 1978; LAINSON, 1983). Já a espécie *L. (V.) naiffi* os incriminados como vetores são *L. ayrozai* e *L. davisii* (LAINSON e SHAW et al., 1989). Em relação a *L. (V.) braziliensis*, nenhum flebotomíneo até o momento foi sugerido como vetor desta espécie no Amazonas (LAINSON, 2010).

Dentre os 62 municípios do Amazonas, apenas de alguns (Manaus, Rio Preto da Eva, Manacapuru, Presidente Figueiredo e Tabatinga) se conhece a respeito dos componentes da cadeia de transmissão (agentes etiológicos, reservatórios e vetores) da LTA, isto pode ser devido, entre outros fatores, a grande extensão geográfica do Estado, a falta de infraestrutura de algumas regiões, as dificuldades de acessos aos municípios e a falta de investimentos em pesquisas nesta área. Por outro lado, A capital do Amazonas (Manaus) é que detém o maior numero de estudos a respeito da ecoepidemiologia da doença (LAINSON et al., 1976; 1981; ARIAS e FREITAS, 1977b; 1978; 1982).

Dentre os municípios do Amazonas, São Gabriel da Cachoeira apresenta deficiência no conhecimento da cadeia de transmissão da leishmaniose, pois até o momento, não se tem ciência de quais espécies de leishmânias e seus possíveis vetores circulam no município. Aliado a isto, trata-se de uma região de fronteira com outros países amazônicos (Colômbia e Venezuela), onde ocorrem frequentes imigrações em busca de melhores condições de vida e de serviços de saúde diferenciado, iniciando, muitas vezes, processos de desmatamento para ocupação da área, ocasionando assim um ambiente propício para infecção do homem, pois este ao invadir o habitat natural do inseto vetor, torna-se um hospedeiro acidental (Pinheiro et al., 2008; Coelho et al., 2011).

Visando auxiliar a caracterização da ecoepidemiologia da LTA no Estado do Amazonas, e principalmente em São Gabriel da Cachoeira, uma das formas é identificando a variedade de espécies de *Leishmania* que causam a doença e levam às suas diversas manifestações clínicas.

Várias metodologias são empregadas para identificação de *Leishmania*, como a análise eletroforética de isoenzimas (MILES et al., 1980; 1981; MOMEM, 1984;

CUPOLILLO, 1992; CUPOLILLO et al., 1994; FIGUEIRA et al., 2008), anticorpos monoclonais (McMAHON-PRATT, 1981; McMAHON-PRATT et al., 1982; SHAW et al., 1986; 1987; 1989; GRIMALDI et al., 1987; 1991; BONFANTE-GARRIDO et al., 1992; GRIMALDI JR e TESH, 1993; GRIMALDI JR, 1995; BRITO et al., 2009) e métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), esta última metodologia têm sido frequentemente utilizada e tem aumentado a sensibilidade e especificidade da identificação de *Leishmania* spp (ZELEDÓN et al., 1993; MARFUT et al., 2003; JORQUERA et al., 2005; PITA-PEREIRA et al., 2005; MARTIN-SÁNCHEZ et al., 2006; GARCIA et al., 2007; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2007).

A LTA tem sido registrada em todas as regiões do Estado do Amazonas, onde se verifica uma expansão progressiva nos últimos vinte anos (Guerra et al., 2006; 2011) . Diante da persistência do número de casos, esta zoonose vem causando um grande impacto na saúde pública. Apesar disso, ainda existem grandes lacunas na epidemiologia desta endemia, como em relação às populações de flebotomíneos e identificação de vetores envolvidos na transmissão.

Portanto o conhecimento a respeito da dinâmica de transmissão da LTA, aliado a identificação do parasito, assim como o(s) seu(s) provável(veis) vetor(es) que circulam em uma determinada área, são elementos importantes para a pronta instalação de uma vigilância epidemiológica, conseqüentemente contribuindo para melhorar o entendimento da doença nas regiões mais longínqua do Estado.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Os Flebotomíneos

Segundo levantamento histórico a respeito dos flebotomíneos, admite-se que a primeira descrição deste inseto ocorreu na Itália, em 1786 por SCOPOLI, quando citou a espécie *Bibio papatasi*, e que nos anos seguintes alterou sua nomenclatura para *Phlebotomus papatasi* (DEDET et al., 2003), espécie de amplo interesse em medicina veterinária e que ocasiona problemas de saúde pública na Europa, Ásia e África (COLACICCO-MAYHUGH et al., 2010).

Conforme Young e Duncan (1994), os flebotomíneos dividem-se em seis gêneros, dos quais: *Phlebotomus* Rondani e Berté, 1840 (110 espécies), *Sergentomyia* Franca, 1920 (258 espécies) e *Chinius* Leng, 1987 (três espécies) ocorrem no Velho Mundo; *Brumptomyia* França e Parrot, 1921 (24 espécies), *Lutzomyia* França, 1924 (mais de 400 espécies) e *Warileya* Hertig, 1948 (oito espécies) que estão representados no Novo Mundo.

Os primeiros flebotomíneos americanos foram descritos por Coquillett (1907), sendo que no Brasil os responsáveis pela primeira descrição de flebotomíneos foram Lutz e Neiva (1912).

Durante mais de 30 anos de conhecimento do gênero *Lutzomyia*, apenas 33 espécies americanas tinham sido registradas. No entanto, esta realidade mudou com a observação de que estes insetos são capazes de transmitir doenças a animais e humanos como: arboviroses, bartonelose, harara, tripanossomíases e principalmente as leishmanioses (ADLER e THEODOR, 1957; ALEXANDER, 2000; DANTAS-TORRES, 2009; RASSI et al., 2012).

Portanto o gênero *Lutzomyia* é o de maior número de espécies e de ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o Norte da Argentina (SALOMÓN, 2009). Em todo o Mundo são conhecidas, aproximadamente, 900 espécies de flebotomíneos, sendo 60% na região Neotropical (RANGEL e LAINSON, 2003). Das mais de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas, pouco mais de 400 pertencem ao gênero *Lutzomyia*, o qual é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (YOUNG e DUNCAN, 1994; REBELO, 1999; GIL et al., 2003).

Segundo Ready (2013), tem-se conhecimento, até o momento, de aproximadamente, 464 espécies de flebotomíneos sul-americanos, sendo que mais de 243 já foram registradas no Brasil, destas cerca de aproximadamente 52% já foram descritas na Amazônia (ARIAS e FREITAS, 1977; YOUNG e DUNCAN, 1994; RANGEL e LAINSON, 2003).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, tendo em seu ciclo vital uma fase de ovo, uma fase larval que compreende quatro estádios, uma fase pupal e, finalmente o adulto, estes, apresentam tamanho que variam de 1,5 a 3 mm, olhos grandes, muito cerdosos e de cor palha e castanho-claros, sendo facilmente reconhecíveis pela atitude que adotam quando pousados, pois as asas permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas (READY, 1986; YOUNG e DUNCAN, 1994; SILVEIRA, et al., 1996; GALATI et al., 1996).

Dependendo da localidade, estes insetos apresentam vários nomes populares, a saber: cangalha, cangalhinha, asa dura, orelha-de-veado, palha, birigui, bererê, tatuquira, murutinga, escangalho, asa branca, ligeirinho, arrupiado (REBELO, 1999; BASANO et al., 2004).

A importância dos flebotomíneos como já citado, diz respeito, principalmente, por estarem envolvidos na epidemiologia das leishmanioses (KILLICK-KENDRICK et al., 1990; 1999). A transmissão de *Leishmania* envolve diferentes espécies de flebotomíneos, associadas a mamíferos reservatórios desses parasitos, levando a diferentes ciclos e perfis de transmissão da doença no Brasil e no Mundo (RANGEL e LAINSON, 2009). Essa cadeia de transmissão (reservatório, parasito e vetor) difere de acordo com a distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos e reservatórios (KILLICK-KENDRICK et al., 1990; 1999).

2.2- Os Tripanossomatídeos

A ordem Kinetoplastida é constituída por protozoários que apresentam uma organela denominada cinetoplasto, que é uma região especializada da mitocôndria, constituída por moléculas circulares de DNA concatenadas. Junto com os Euglenóides, os Kinetoplastida representam o mais antigo grupo de organismos eucariotos contendo mitocôndria (BAKER, 1994).

Nesta ordem inserem os tripanossomatídeos, que compreende protozoários ecléticos que parasitam animais vertebrados, invertebrados e plantas, apresentando-se em diferentes formas: promastigotas, coanomastigotas, amastigotas, epimastigotas, opistomastigotas, paramastigotas, tripomastigotas e esferomastigotas (Figura 1) [HONIGBERG et al., 1964; WALLACE, 1966; LEVINE et al., 1980].

Essa alternância de formas celulares nos tripanossomatídeos é particularmente evidente na transição entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, entretanto pode ocorrer dentro de um mesmo hospedeiro, sendo uma ferramenta de

adaptação fisiológica ao ambiente ou em antecipação a próxima etapa do ciclo (VICKERMAN et al., 1976).

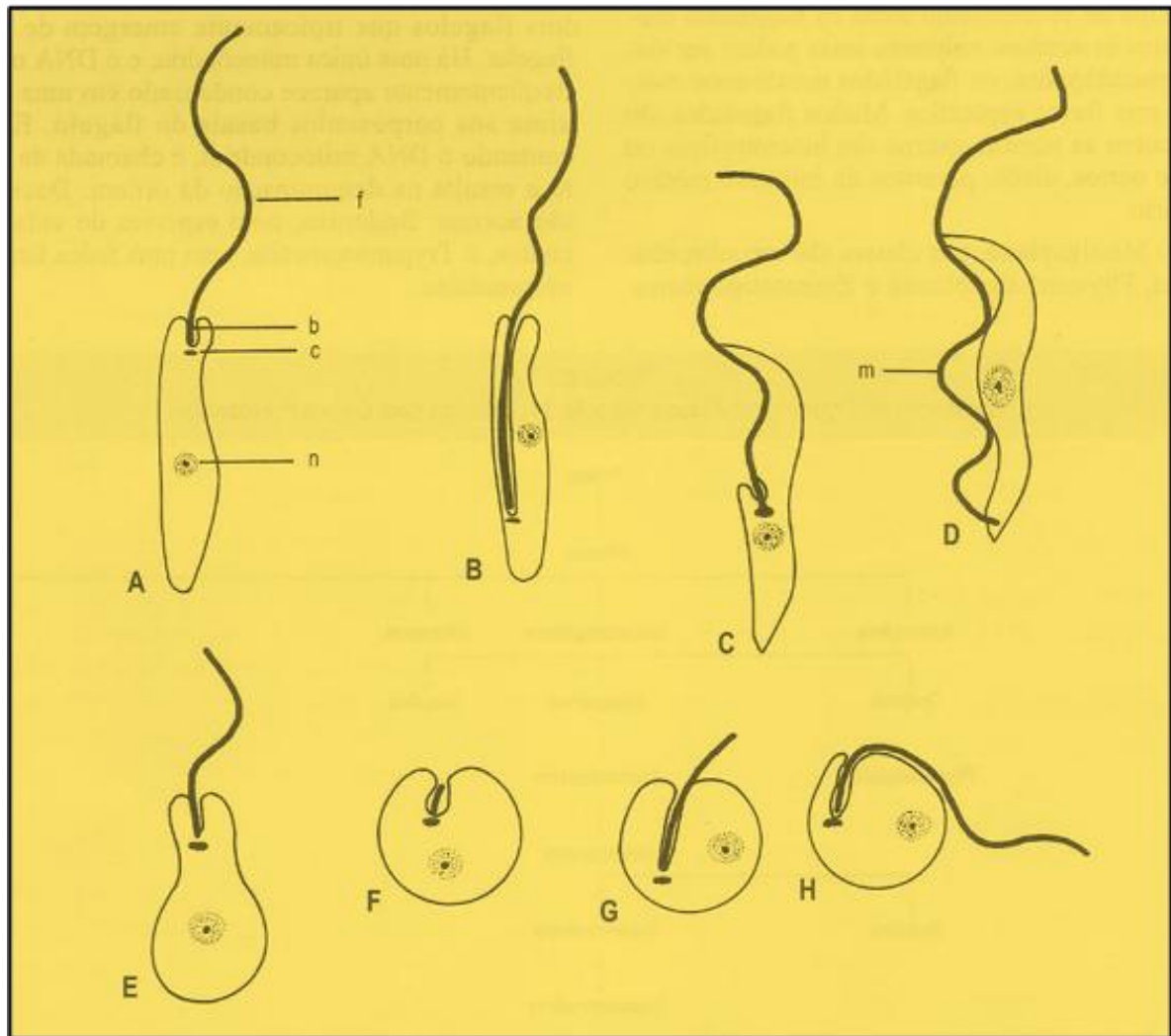


Figura 1. Pleomorfismo nos tripanossomatídeos: A – Promastigota; B – Opistomastigota; C – Epimastigota; D – Tripomastigota; E – Coanomastigota; F – Amastigota; G – Paramastigota; H – Esferomastigota; n – núcleo; c – cinetoplasto; f – flagelo; b – bolsa flagelar (invaginação da membrana onde se insere o flagelo); m – membrana ondulante (prega da bainha do flagelo que permite a comunicação com a membrana plasmática). Fonte: NEVES et al., 2011.

Conforme classificação empregada por Honiberg et al. (1964) e Levine et al. (1980), os tripanossomatídeos apresentam um ou mais estágios morfológicos durante o seu ciclo de vida aliado com o hospedeiro de origem, sendo isto a base para o estabelecimento dos vários gêneros neste grupo:

- Gênero *Blastocrithidia*: neste engloba os parasitos que ocorre em dípteros e hemípteros, cerca de 30 espécies já foram descritas. Os protozoários neste gênero são monogenéticos (sem alternância de geração), apresentam a forma epimastigota, podendo ser confundidos com epimastigotas de *Trypanosoma*. A transmissão se dá diretamente entre os hospedeiros a partir das fezes contaminadas. As células medem entre 10 e 50 μm de comprimento, com flagelos entre 5 e 12 μm (SILVA et al., 1977; NEVES et al., 2011);

- Gênero *Crithidia*: Compreende parasito caracterizado por forma coanomastigota, possuindo apenas insetos (hemípteros, dípteros [*Culex* e *Anopheles*], hymenópteros, lepidópteros e trichópteros) como hospedeiros. Aproximadamente 15 espécies de *Crithidia* já foram encontradas e algumas sendo parasito das por endossimbiontes bacterianos. O mecanismo de transmissão inclui um estágio de vida capaz de infectar as larvas dos hospedeiros. Os comprimentos médios da célula e flagelo são, respectivamente, 4 a 13 μm e 7 a 14 μm (LEVINE et al., 1990; DE SOUZA e MOTTA 1999; NEVES et al., 2011);

- Gênero *Herpetomonas*: estão incluídos neste grupo flagelados que têm como hospedeiros a mosca domestica e os hemípteros fitófagos. Cerca de 30 espécies já foram descritas. Esses flagelados apresentam as formas opistomastigotas, as quais caracterizam o gênero, embora paramastigotas e promastigotas também ocorram em seu ciclo. A transmissão ocorre por contaminação direta entre hospedeiros ou através de estágios de vida livre. O

comprimento celular médio oscila entre 6 e 30 μm , com um flagelo de usualmente 10 μm , mas podendo chegar a 20 μm (DE SOUZA e MOTTA 1999; NEVES et al., 2011);

- Gênero *Leptomonas*: promastigotas são as principais formas observadas entre os organismos deste gênero. Parasitam uma grande variedade de insetos (lepidópteros, siphonápteros, e anopluros), além de nematoides e protozoários. Cerca de 60 espécies já foram descritas. A transmissão ocorre de inseto para inseto por contaminação direta com cistos. O comprimento médio do corpo celular das formas promastigotas de *Leptomonas* é da ordem de 10 a 40 μm , dependendo da espécie, com um flagelo de mesmas dimensões; algumas espécies, porém, podem apresentar promastigotas de até 200 μm de comprimento (VICKERMAN et al., 1976; 1994; NEVES et al., 2011);

- Gênero *Phytomonas*: é representado por organismos heteroxênicos (mais de um hospedeiro) que possuem plantas e insetos (hemípteros) como hospedeiros, com cerca de 10 espécies descritas. Esses protozoários em algumas plantas, como palmeiras e café, são patogênicos, causando prejuízos agrícolas (CAMARGO et al., 1999). Apresentam-se como promastigotas. Suas dimensões vão de 5 a 20 μm de comprimento, dependendo da espécie e do estágio de cultivo, com um flagelo ao redor de 10 μm (CAMARGO et al., 1999; NEVES et al., 2011);

- Gênero *Rhynchoidomonas*: estão incluídos nesse grupo parasito monoxênico (apenas um hospedeiro) pouco conhecido, com cerca de cinco espécies descritas. Apresentando-se formas tripomastigotas nos túbulos de Malpighi dos dípteros muscoides. Variam em tamanho, entre 10 e 50 μm (VICKERMAN et al., 1976; 1994; NEVES et al., 2011);

- Gênero *Trypanosoma*: nesse grupo incluem flagelados heteroxênicos que possuem como hospedeiros insetos triatomíneos e vertebrados. Apresentam-se sob as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (triatomíneos) e as amastigotas e tripomastigotas sanguíneas (vertebrados). Estão inseridas neste gênero muitas espécies que parasitam mamíferos, aves, répteis e anfíbios, sendo as patogênicas para o homem o *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas) e o *T. brucei* (Doença do sono). Conforme a via de transmissão eles são classificados em *Salivaria* (formas metacíclicas transmitidas por inoculação) e *Stercoraria* (formas metacíclicas eliminadas pelas fezes). Esses flagelados apresentam dimensões que variam entre 15 e 100 μm , podendo chegar a 1.200 μm em um tripanosoma de morcegos. O corpo celular de *T. cruzi* (tripomastigotas sanguíneas), mede entre 12 e 30 μm , com um flagelo livre medindo entre dois e 11 μm (HOARE, 1972; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006);

- Gênero *Endotrypanum*: inclui flagelado heteroxênico de inseto (flebotomíneo) e edentados (bicho-preguiça). Apresentando as formas promastigotas (insetos) e epi ou tripomastigotas (edentados). Duas espécies foram descritas: *Endotrypanum schaudinni* e *E. monterogei* (SHAW, 1964; NEVES et al., 2011);

- Gênero *Leishmania*: Esses protozoários possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando entre hospedeiro vertebrado e insetos vetores (flebotomíneo). Além do homem, outros mamíferos são hospedeiros vertebrados, tais como cães e alguns animais silvestres (LAINSON e SHAW, 1988). O protozoário apresenta comportamento dimórfico, ou seja, a fase do ciclo de vida do parasito define sua forma estrutural (BRASIL, 2007). A forma móvel, extracelular, flagelada, encontrada no trato intestinal do vetor é denominada promastigota (22-25 μm) e a forma intracelular imóvel, é arredondada ou ovalada (4-6 μm) denominada amastigota,

parasitam o sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (NEVES et al., 2011).

O desenvolvimento do protozoário no trato digestivo dos flebotomíneos é complexo e passa por diversas mudanças morfológicas e fisiológicas, diferenciando-se em forma infectante para o hospedeiro mamífero (promastigota) [KILLICK-KENDRICK, 1979]. Após a picada na pele as formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células de defesa, inicialmente neutrófilos e posteriormente os macrófagos, e dentro de um vacúolo (fagossomo) se transformam em amastigotas. Essa forma intracelular se divide por divisão binária e infectam outros macrófagos (KILLICK-KENDRICK, 1999; SACKS e PERKINS, 1985).

As espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos são muito similares morfológicamente entre si, mas induzem diferentes formas da doença. A característica comum a todas é a cronicidade nas manifestações clínicas. A infecção pode ser predominantemente visceral, denominada leishmaniose visceral ou calazar; restrita à pele, com úlceras crônicas, ou expandir-se nas membranas mucosas produzindo lesões mutilantes (HANDMAN, 2001).

Segundo Gontijo e Carvalho (2003), no Brasil são reconhecidas pelo menos sete espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana, sendo a forma tegumentar causada principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* e, mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. Na forma visceral a espécie *L. (L.) chagasi*. Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (VALE e FURTADO, 2005).

2.3- Tripanossomatídeos transmitidos por flebotomíneos

Além das leishmânias, os flebotomíneos podem transmitir outros tripanossomatídeos, como endotrípano, tripanosoma e crithídia (Tabela 1). Os dados pertinentes a esses flagelados são subprodutos de estudos epidemiológicos sobre as leishmanioses (RANGEL e LAINSON, 2003).

É perfeitamente possível que alguns isolados de flebotomíneos identificados como sendo *Leishmania* na realidade eram *Endotrypanum* ou *Trypanosoma*, pois conforme Camargo (1999), ao discutir a respeito da morfologia de tripanossomatídeos, chamou a atenção para o fato que este caráter não é confiável para distinguir os gêneros supracitados, visto que estágios morfológicos idênticos são compartilhados por alguns tripanossomatídeos em alguma fase do ciclo no inseto (LAINSON e SHAW, 1988; WALTERS et al., 1989; NIEVES e PIMENTA 2000; 2002; ROGERS et al., 2002; ROGERS e BATES, 2007).

Na Tabela 1, vários autores relatam o encontro de tripanossomatídeos dos gêneros *Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Crithida* infectando flebotomíneos.

2.4- A circulação de *Leishmania* no Amazonas

No Estado do Amazonas, a incidência da Leishmaniose vem aumentando significativamente, acompanhando a abertura de novas estradas e a instalação de novos núcleos residenciais e assentamento em áreas onde, previamente, existia densa floresta tropical. Os treinamentos militares, na selva, também, são fatores importantes a serem considerados na epidemiologia da Leishmaniose (ARIAS e FREITAS, 1977b; ARAÚJO-FILHO, 1981; ARIAS et al., 1985; TALHARI et al., 1988;

GUERRA, 2003; PINHEIRO, 2004; 2008). Conseqüentemente, a interação do homem com o meio ambiente é muitas vezes determinante na rede de causalidades múltiplas dessa doença (GRIMALDI, et al., 1989).

Tabela 1. Ocorrência de infecção natural em flebotomíneos por tripanossomatídeos dos gêneros *Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Crithidia*.

VETOR	AGENTE ETIOLÓGICO	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
<i>Lutzomyia anduzei</i>	<i>Endotrypanum</i> sp.	SHAW, 1992; ROGER et al., 1988.
<i>L. antunesi</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.	SILVEIRA et al., 1991; LAINSON e SHAW, 1979.
<i>L. ayrozai</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.	HOCH et al., 1986.
<i>L. davisii</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.	RYAN et al., 1987; 1987a; HOCH et al., 1986.
<i>L. dendrophyla</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.	LAINSON e SHAW, 1979; RYAN et al., 1987
<i>L. paraensis</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.	RYAN et al., 1987; 1987a.
<i>L. shannoni</i>	<i>Endotrypanum</i> sp.; <i>E. schaudinni</i> ; <i>Trypanosoma</i> sp.	ARIAS et al., 1985; ROGERS et al., 1988
<i>L. wellcomei</i>	<i>Crithidia</i> sp.	RYAN et al., 1987a; SHAW et al., 1987
<i>L. umbratilis</i>	<i>Endotrypanum</i> sp.; <i>Trypanosoma</i> sp.	ROGERS et al., 1988; RYAN et al., 1987a

Já foram descritas mais de 30 espécies de *Leishmania* no mundo (WHO, 2012). Entre estas, mais de 20 espécies causam a doença no homem (GRIMALDI et al., 1989; BRASIL, 2007) e destas quatro causam a Leishmaniose cutânea, as quais circulam no Amazonas (NAIFF, 1998; BRASIL, 2007; COELHO, 2011)

a) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: É responsável no homem pela Leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa e Leishmaniose cutânea difusa anérgica.

Apresenta-se distribuída no Brasil, principalmente na bacia amazônica, em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão) e também na Bahia, Minas Gerais e em Goiás. Está presente em outros países como Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa. O principal hospedeiro silvestre é o roedor *Proechimys* sp. (rato-sóia). A *Lutzomyia flaviscutellata* é considerada a principal espécie vetora, e tem a característica de ser pouco antropofílica. A *L. olmeca nociva* é considerada como transmissor secundário na região do Amazonas e em Rondônia (LAINSON, 1997; SILVEIRA et al., 1997; BRASIL, 2007).

b) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: No homem, causa lesões conhecidas como “ferida brava”, “úlceras de Bauru”, “nariz de anta” etc. O curso da infecção geralmente é irregular e crônico. É caracterizada por sua associação com a Leishmaniose mucocutânea, sendo de grande interesse médico. Apresenta distribuição em todo o Território Nacional, além de vários países da América Central e do Sul (de Belize até a Argentina). Em relação ao seu hospedeiro silvestre, poucas são as informações, tendo sido relatado parasitos semelhantes em roedores (*Akodon* sp., *Proechimys* sp. *Rattus* sp., *Oryzomys* sp., *Rhipidomys* sp.) e no marsupial *Didelphis* sp. Tem como vetor, na Serra dos Carajás, a *L. welcomei*, com comportamento antropofílico, com picadas diurnas e de maior atividade nas estações de chuva. Outras espécies de flebotomíneos são incriminadas como vetores: *L. whitmani*, *L. migonei*, *L. pessoai*, *L. intermedia*, *L. carrerai* (LAINSON e SHAW, 1987; SILVEIRA et al., 1997; LAINSON, 1997; BRASIL, 2007).

c) *Leishmania (Viannia) guyanensis*: Causa no homem lesões conhecidas como “pian-bois” (lesões causadas pela disseminação linfática), frequentemente com múltiplas lesões e lesões nas mucosas. Possui uma ampla distribuição no Brasil

(Amazonas, Pará, Amapá e Roraima), e também em outros países como as Guianas, Peru, Equador e Venezuela. Possui como hospedeiros a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o marsupial *Didelphis* sp. As espécies de flebotomíneos vetores são: *L. umbratilis*, o mais importante vetor desta espécie, sendo a *L. anduzei* e *L. whitmani* considerados como vetores secundários (LAINSON e SHAW, 1987; LAINSON, 1997; SILVEIRA et al., 1997; MS, 2007). Este parasito é o principal responsável pelos casos de Leishmaniose no Estado (ARIAS e FREITAS, 1978).

d) *Leishmania (Viannia) naiffi*: O parasito causa lesões cutâneas pequenas e nodulares que em alguns casos tem cura espontânea. Em animais de laboratório como hamsters (*Mesocricetus auratus*) não desenvolve lesões. Distribui-se pelo Brasil nos Estados do Amazonas e Pará, e na Guiana Francesa. Tem como hospedeiro o tatu (*Dasypus novemcinctus*), e apresenta três espécies de flebotomíneos incriminadas como vetoras: *L. paraensis*, *L. ayrozai*, *L. squamiventris*. Estes insetos apresentam alta antropofilia, cujos hábitos zoofílicos são pouco conhecidos (LAINSON e SHAW, 1987; BRASIL, 2007).

e) *Leishmania (Viannia) lainsoni*: O parasita causa úlceras cutâneas individuais sem evidências de envolvimento nasofaríngea (SILVEIRA et al 1987.), similar a causada por outras *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Viannia*, com pequenos nódulos auto-limitantes ou úlceras pequenas, com abundantes amastigotas no local da lesão. Recentemente foi observada no Amazonas (TALHARI, 2011).

2.5- Áreas de fronteira do extremo noroeste brasileiro e a circulação de *Leishmania*

Conforme Leonardi et al. (1999), a fronteira é uma zona ou área que apresenta duas características básicas no que se refere aos processos saúde/doença que aí se estabelecem: a) é o lugar de entrada ou saída de pessoas e mercadorias que permitem o intercâmbio e a difusão de agentes patogênicos entre países e; b) uma área ou zona com características particulares, onde os habitantes dos países vizinhos vivem os efeitos de proximidade, gerando comportamentos particulares.

Em relação à Leishmaniose o movimento de cruzar as fronteiras é um fator de risco fundamental que contribui para a urbanização da doença nesta região (ROWLAND et al., 1999). A dispersão da Leishmaniose é, devido, sem dúvida, a ativa circulação de pessoas (indígenas, militares, caçadores, madeireiros e garimpeiros) transpondo a faixa de fronteira entre o Brasil, Colômbia e Venezuela (DAVIES et al., 2000).

O município de São Gabriel da Cachoeira (SGC) está localizado no extremo noroeste do Estado do Amazonas (Brasil) à 852 km de Manaus (capital do Estado), na bacia do Alto Rio Negro. Limita-se ao Norte com a Colômbia e a Venezuela; ao Sudeste com o Município de Santa Isabel do Rio Negro; ao Sul com o Japurá e com a Colômbia (Figura 2). Uma parte do seu território abrange o Parque Nacional do Pico da Neblina (Figura 3). Devido a sua limítrofe com os países Colômbia e Venezuela, o município foi considerado um ponto estratégico para o país, e por essa razão a cidade é classificada como área de segurança Nacional, pela Lei Federal nº 5.449 (ISA, 2005; GIATTI et al., 2007).

O município de SGC é o terceiro maior do país em extensão de área (sendo Altamira no Pará o primeiro e Barcelos no Amazonas o segundo), ademais é o mais indígena entre os municípios do território brasileiro, apresentado um contingente de 29,0 mil dos 126,6 mil da população indígena nacional. Grande parte desta população encontra-se em área rural do município (GIATTI et al., 2007).

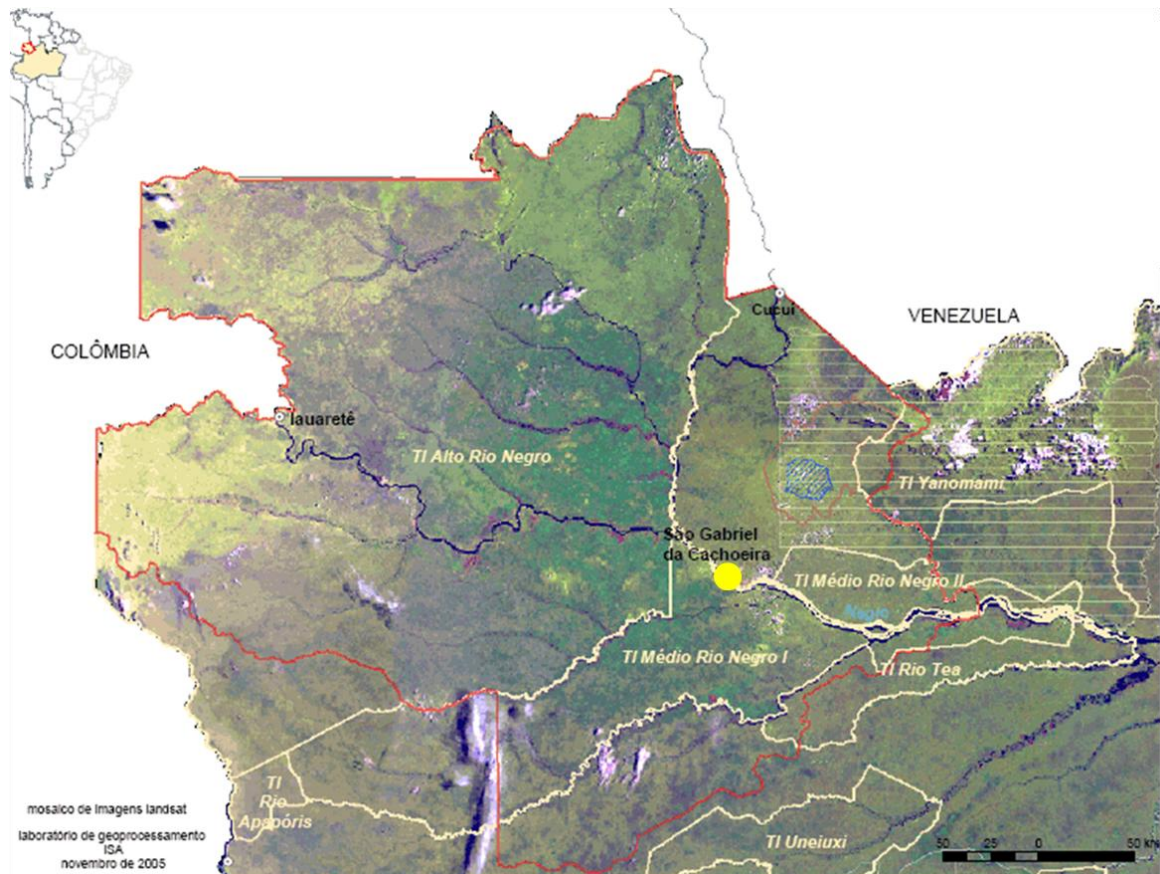


Figura 2. Mapa do Brasil, indicando a localização do município de São Gabriel da Cachoeira. Fonte: ISA (2005).

Nos últimos anos, observa-se no município o processo de migração de indígenas provenientes de pequenas comunidades para a cidade. Fato observado como importante elemento na dinâmica de riscos à saúde pública (LASMAR, 2002).

Em relação a leishmaniose, o município apresenta uma lacuna no que diz respeito a cadeia de transmissão desta doença. Até o momento, somente o trabalho de Fé et al. (1998) tratou a respeito de um dos segmentos desta cadeia (fauna de flebotomíneos), porém neste trabalho não ocorreu o direcionamento para averiguar os flebotomíneos vetores e os agentes etiológicos que circulam na área.



Figura 3. Parque Nacional do Pico da Neblina, localizado no Município de São Gabriel da Cachoeira – A: Placa de entrada dos limites do parque e B: Vista do Pico da Neblina. Fontes: Pinheiro, 2008 e Exército Brasileiro, 2009.

A casuística da leishmaniose no município de São Gabriel da Cachoeira é baixa, se comparada com os municípios de Manaus, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo, apresentando uma incidência de aproximadamente 15 casos por ano (SINAN, 2011). Todavia a cidade vem sofrendo grandes modificações em suas áreas florestais, devido ao desmatamento com fins de exploração ilegal de madeira,

a construção de assentamentos habitacionais e a criação de áreas com finalidade agropecuária (GIATTI et al., 2007). É sabido que essas modificações ambientais podem contribuir para o aumento da incidência da doença (ARIAS e FREITAS, 1977b; ARAÚJO-FILHO, 1981; ARIAS et al., 1985; GUERRA et al., 2006).

Aliado a essas mudanças ambientais, o município apresenta ainda outra problemática, a fronteira com os países Colômbia e Venezuela (BONFANTE-GARRIDO e BARRETO, 1981; ALEXANDER et al., 1987; WARBURG et al., 1991; CAMPBELL-LENDRUM et al., 2001).

A identificação de casos importados de leishmaniose em regiões de fronteira torna-se relevante, dadas as diferenças na epidemiologia da doença como: características ecológicas, que circulam a *Leishmania*, características da população humana e do vetor, e a gravidade clínica da doença entre ambos os países envolvidos (DELGADO et al., 2008).

2.6- Vetores e *Leishmania* que ocorrem no Amazonas, Venezuela e Colômbia

Das espécies de leishmânia e flebotomíneos vetores que circulam no Estado do Amazonas, algumas também ocorrem nos países da Venezuela e Colômbia (FELICIANGELI et al., 1985; PARDO et al., 2006; PERRUOLO et al., 2006; SALOMÓN et al., 2009) [Figura 4].

Os flebotomíneos vetores de Leishmaniose na Venezuela e Colômbia pertencem a vários subgêneros e aos gêneros *Lutzomyia*, *Bruptomyia* e *Warileya* (YOUNG et al., 1987; YOUNG e DUNCAN et al., 1994; DUQUE et al., 2004). A maioria dos casos de infecção humana é causada pelos parasitos do gênero *Leishmania* do subgênero *Viannia* (DUQUE et al., 2004; SALOMÓN et al., 2009) .

Durante mais de 20 anos, esforços têm sido feitos para determinar a distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* na Colômbia. Até o momento, numerosas espécies já foram identificadas: *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) garnhani* (CORREDOR et al., 1990; SARAVIA et al., 1998; OVALLE et al., 2006; URBANO et al., 2011).

Na Colômbia há registro de casos de LTA em várias áreas urbanas das seguintes regiões: Sincelejo, Bucaramanga, Remédios, Villeta, Durania, Letícia e Neiva, a que possibilita a ocorrência de um ciclo peridomiciliar de transmissão (PARDO et al., 1996; SANDOVAL et al., 1998; VÉLEZ, 2001; ZAMBRANO, 2006).

No município de Tolima, Colômbia, Rodríguez-Barraquer et al. (2008), estudando foco de LTA no peridomicílio, utilizaram a técnica de isoenzimas e análise de anticorpos monoclonais para caracterizar os isolados deste estudo e as identificaram como sendo *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*. Neste trabalho verificou-se que *L. (V.) guyanensis* foi o agente etiológico da maior epidemia de Leishmaniose cutânea registrada na Colômbia. Esta espécie até o momento, não havia sido previamente registrada fora do Amazonas (principal espécie vetora na calha norte do rio Amazonas e leste do rio Negro) [SHAW, 1989; SHAW e LAINSON, 1976; 1987; SHAW et al., 2007]. Resultados também encontrados por Naiff et al. (1999; 1998) e Romero et al. (2000, 2001a; 2001b; 2002a; 2002b; 2005).

Em relação à Venezuela, estima-se o registro de aproximadamente 2480 casos anuais de LTA nos últimos (ALVAR et al., 2012). O aumento se deve em parte a expansão de *L. (V.) braziliensis* do ambiente silvestre para o peridomicílio, e incluindo ainda focos urbanos (FELICIANGELI, 1997; DELGADO et al., 1997; 2008; DAVIES et al., 2000; ZERPA e CONVIT et al., 2009).

A doença é endêmica e amplamente distribuída em quase todos os Estados venezuelanos (SCORZA et al. 1985). No entanto, são necessários mais estudos para melhor determinar os aspectos epidemiológicos das leishmanioses neste país, incluindo sua distribuição geográfica, agente etiológico, reservatórios e insetos vetores (DAVIES et al., 2000).

Na Venezuela, já foram registradas as espécies: *L. venezuelensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. As duas primeiras espécies supracitas têm sido apontadas como responsáveis por diferentes formas clínicas da doença. (BONFANTE-GARRIDO et al. 1992; DELGADO et al., 1993; 1997). Além destas espécies foi observado um híbrido entre *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (DELGADO, 1997).

2.7- Métodos de identificação de tripanossomatídeos

A correta identificação e classificação de micro-organismos são de extrema importância prática, não só no aspecto clínico, mas também na biotecnologia, em estudos ambientais, entre outros. Os métodos usados na discriminação de gêneros, espécies e cepa de micro-organismos podem ser divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos baseiam-se em fenômenos bioquímicos, fisiológicos e biológicos, enquanto os métodos genotípicos detectam polimorfismos ao nível dos ácidos nucleicos, ou variação alélica ao nível de enzimas.



Leishmania:

- *Leishmania (Viannia) braziliensis*
- ⊗ *L. (V.) colombiensis*
- *L. (V.) guyanensis*
- ☼ *L. (V.) naiffi*
- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
- * *L.(L.) chagasi*
- ☼ *L. (L.) venezuelensis*
- ⊙ *L.(L.) garnhani*
- ⊗ *L.(L.) mexicana;*
- *L. (V) panamensis*

Vetores:

- *Lutzomyia ayrozai*
- *L. braziliensis*
- *L. evansi*
- ▣ *L. fischeri*
- ▣ *L. flaviscutelata*
- ⊗ *L. migonei*
- △ *L. paraensis*
- ▲ *L. ubiquitativa*
- ◆ *L. umbratilis*
- ▴ *L. wellcomei*

Figura 4. Mapa da Tríplice Fronteira: Brasil - Colômbia - Venezuela. Distribuição das espécies de *Leishmania* e flebotomíneos vetores que ocorrem no Amazonas, Colômbia e Venezuela. Fonte: www.defesabr.com/abertura.htm.

Primeiramente, a identificação dos tripanossomatídeos se baseia na observação microscópica (características morfológicas, tais como a morfometria e a mobilidade dos parasitos nos tecidos e hospedeiros), tipo de hospedeiros e origem geográfica, assim como a presença de um vetor específico e a capacidade dos parasitos crescerem “*in vivo*” (em vertebrados e invertebrados) e “*in vitro*” (DESQUESMES e DAVILA, 2002). Contudo a descrição de espécies baseada apenas nestes parâmetros provou ser insuficiente (SOUZA, 1994; 2000; TIESZEN et al., 1989; NAUMOV, 2000; ROMEIRO et al., 2003). Além disso, é frequente encontrar infecções mistas entre algumas espécies como por exemplo: no gênero *Trypanosoma* (*T. cruzi* e *T. rangeli*) [HOARE, 1972; MARINKELLE, 1976; MOLYNEUX, 1991]; no gênero *Leishmania* (*L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*; *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*) [SILVEIRA, 1984; MADEIRA et al., 2006; COELHO et al., 2011].

Em relação as espécies de *Leishmania*, como o parasito é estruturalmente similar tanto nas formas amastigostas quanto promastigotas é impossível a identificação por técnicas microscópicas, sendo utilizados caracteres extrínsecos para nominar espécie ou para a classificação das mesmas dentro do gênero. Somente a partir dos anos 80 com a utilização de isoenzimas e depois com as técnicas moleculares foi possível usar caracteres intrínsecos na identificação do parasito (MARZOCHI et al., 1980; HANHAM et al., 1990; ISHIKAWA et al., 2002; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2006).

A técnica recomendada para caracterização e identificação das amostras de *Leishmania* em nível de espécie ainda é a eletroforese de isoenzimas. No entanto uma das limitações desta técnica é a necessidade de um grande número de parasitos cultivados e a utilização de cepas padrões de referência em cada gel a ser

analisado (GARDENER et al., 1974; CHANCE, 1979; KREUTZER et al.,1983; MIMORI et al., 1989; CUPOLILLO et al., 1995).

As ferramentas moleculares têm demonstrado fundamental importância no estudo da epidemiologia das leishmânias, tais como: análises do DNA do cinetoplasto (kDNA) [BARKER e ARNOT, 1981; PACHECO et al., 1999; PAL et al., 2004; CORTES et al., 2004; MARTINS et al., 2010] e DNA nuclear (ULIANA et al., 1991; VAN EYES et al., 1992; HASSAN et al., 1993; TIBAYRENC et al.,1993; PIARROUX et al., 1993; 1994; CUPOLILLO et al., 1995; LEWIN, 2000; SCHÖNIAN et al., 2000; 2001; MARFURT et al., 2003; KHATRI et al., 2006; ODDONE et al., 2009; DA SILVA et al., 2012).

Essas abordagens moleculares podem contribuir significativamente para o controle da distribuição da doença através da (o): (i) identificação das espécies envolvidas numa região endêmica; (ii) estudo da prevalência da infecção numa população; (iii) ajuda no diagnóstico clínico; (iv) determinação da estrutura da população e a extensão da migração dos patógenos e vetores envolvidos; e (v) estudo da emergência e propagação de resistência a drogas.

Diante do exposto, o conhecimento dos componentes pertencentes à cadeia de transmissão da Leishmaniose no município de SGC é de extrema importância para a área, visto que a cidade ainda apresenta baixa incidência da doença. No entanto atualmente, vem sofrendo com as atividades humanas, provocando mudanças ambientais que poderão alterar o perfil epidemiológico desta doença, aliado também com a proximidade com outros países.

3. OBJETIVOS

3.1- GERAL

Realizar levantamento da entomofauna de flebotomíneos e a circulação de tripanossomatídeos em área de risco para leishmaniose cutânea em São Gabriel da Cachoeira, AM, BR.

3.2- ESPECÍFICOS

- i) Realizar levantamento entomológico da fauna de flebotomíneos na área de São Gabriel da Cachoeira;
- ii) Descrever as características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar notificada em SGC e identificar possíveis espécies de flebotomíneos vetores da doença nessa região;
- iii) Isolar flagelados do gênero *Leishmania* de reservatórios;
- iv) Utilizar a técnica de Ln-PCR na detecção de infecção natural de *Leishmania* em flebotomíneos utilizando o gene de mini-éxon como alvo;
- v) Realizar caracterização biológica e molecular de tripanossomatídeos isolados;
- vi) Analisar as sequências obtidas dos produtos de amplificação da região de ITS dos flagelados isolados.

4. CAPÍTULO I

**BIODIVERSIDADE DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS EM ÁREA DE
FRONTEIRA BRASILEIRA: MUNICIPIO DE SÃO GABRIEL DA
CACHOEIRA, AM, BR**

BIODIVERSIDADE DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS EM ÁREA DE FRONTEIRA
BRASILEIRA: MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, AM, BRASIL.

Francimeire Gomes Pinheiro, Rui Alves Freitas e Antonia Maria Ramos Franco

Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da
Amazônia, Caixa Postal 478, 69011-970, AM, Brasil

RESUMO

As corredeiras de São Gabriel da Cachoeira marcam a divisão entre a parte do alto e médio Rio Negro no Amazonas, neste município o conhecimento e a distribuição em relação à fauna de flebotomíneos até então era escasso. Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a entomofauna de flebotomíneos que circula pelo município, foram realizadas sete expedições no período de 2007 a 2011. Nas coletas foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC dispostas a um metro de altura do solo, assim como, coletas em base de árvore com auxílio de CDC modificada para esta finalidade. Um total de 6832 flebotomíneos foi coletado e destes 50 espécies foram identificadas, sendo 49 do gênero *Lutzomyia* e uma do gênero *Brumptomyia*. Do total coletado 58% (3939/6832) eram fêmeas e 42% (2893/6832) machos. Os subgêneros *Psychodopygus*, *Psathyromyia* e *Nyssomyia* foram os mais frequentes no estudo. A espécie *L. ayrozai* foi a mais abundante enquanto que de *L. umbratilis*, vetora de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, apenas três espécimes foram coletados. A entomofauna de flebotomíneos em São Gabriel da Cachoeira apresentou um índice de diversidade $H' = 1,19$, similar ao encontrado na literatura para região norte do Brasil. O conhecimento da entomofauna dos flebotomíneos é de suma importância para a saúde pública, principalmente para locais distantes dos grandes centros, como é o caso do município São Gabriel da Cachoeira.

Palavras-chave: Flebótomo, Leishmaniose, Alto Rio Negro, Entomofauna

1. INTRODUÇÃO

A cidade de São Gabriel da Cachoeira tem uma importância estratégica por ser um município de tríplice fronteira localizado no extremo noroeste do Brasil entre os países Colômbia e Venezuela (Fig. 1). As suas corredeiras marcam a divisão entre a parte do alto e médio Rio Negro no Amazonas, neste município o conhecimento e a distribuição em relação à fauna de flebotomíneos até então era escasso (FÉ et al., 1998).

Os primeiros estudos sobre flebotomíneos em São Gabriel da Cachoeira foram realizados por Fé et al., (1998) em trabalhos de impacto ambiental na hidrelétrica de Miuá. Este primeiro registro para a área identificou 37 espécies de 795 flebotomíneos. Numa localidade adjacente a esta área FELICIANGELI et al. (1988) obtiveram uma lista de 22 espécies identificadas de um total 283 flebotomíneos coletados no Território Federal do Amazonas na Venezuela.

Em outras regiões, os flebotomíneos também são transmissores de outras zoonoses, como as bartoneloses (BIRTLES, 2001), phleboviroses (TESH, 1988), e certas flaviviroses, arboviroses e vesiculoviroses (COMER, TESH, 1991; ASHFORD, 2001), causando sérios problemas de saúde tanto ao homem como para os animais domésticos.

A compreensão da dinâmica populacional dos flebotomíneos pode se revelar como um importante fator para a implantação de políticas de controle epidemiológico para uma das seis doenças mais importante segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses (PINTO et al., 2010).

Diante de diferentes combinações de vetores, parasitos, reservatórios, condições ambientais, epidemiologia e práticas culturais, as quais contribuem para a

transmissão das leishmânias e, aliado ao escasso conhecimento da entomofauna de flebotomíneos circulando nesta área, o objetivo deste estudo foi a de realizar o levantamento da fauna destes insetos no município de São Gabriel da Cachoeira, AM.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo – o levantamento da fauna foi realizado ao longo da BR 307 (estrada de Cucuí), entre as coordenadas (00°06'21"S, 067°01'37"W e 00°35'30"N, 66°46'26"W) e na estrada da Usina Miuá (Fig. 1) no trecho que compreende as coordenadas (00°04'18"S e 067°00'07"W), num total de sete excursões no período de 2007 a 2011 todas no mês de julho, exceto no ano de 2007, onde foram realizadas mais duas coletas nos meses de janeiro e outubro, isto ocorreu visando definir o melhor período de coleta para os anos seguintes, ficando determinado o mês de julho, por ter sido o mês no qual foi coletado o maior número de flebotomíneos.

Amostragem - Foi utilizado um total de dezesseis armadilhas luminosas (CDC "miniature" - Hausherr' Machine Works, New Jersey, EUA) [fig. 2a] instaladas a 1 m de altura do solo, que funcionaram durante 15 noites, no intervalo das 18h às 8h do dia seguinte. Também foram feitas coletas em bases de árvores, em cada uma das áreas de estudo, utilizando-se armadilha luminosa do tipo "CDC adaptada" (fig. 2b) para este tipo de coleta, que funciona como um aspirador manual. O horário de coleta foi das 8h às 10h da manhã, sendo o esforço de coleta de duas horas, durante quinze dias. A licença para captura dos flebotomíneos foi obtida junto ao IBAMA sob o n° 18893-1.

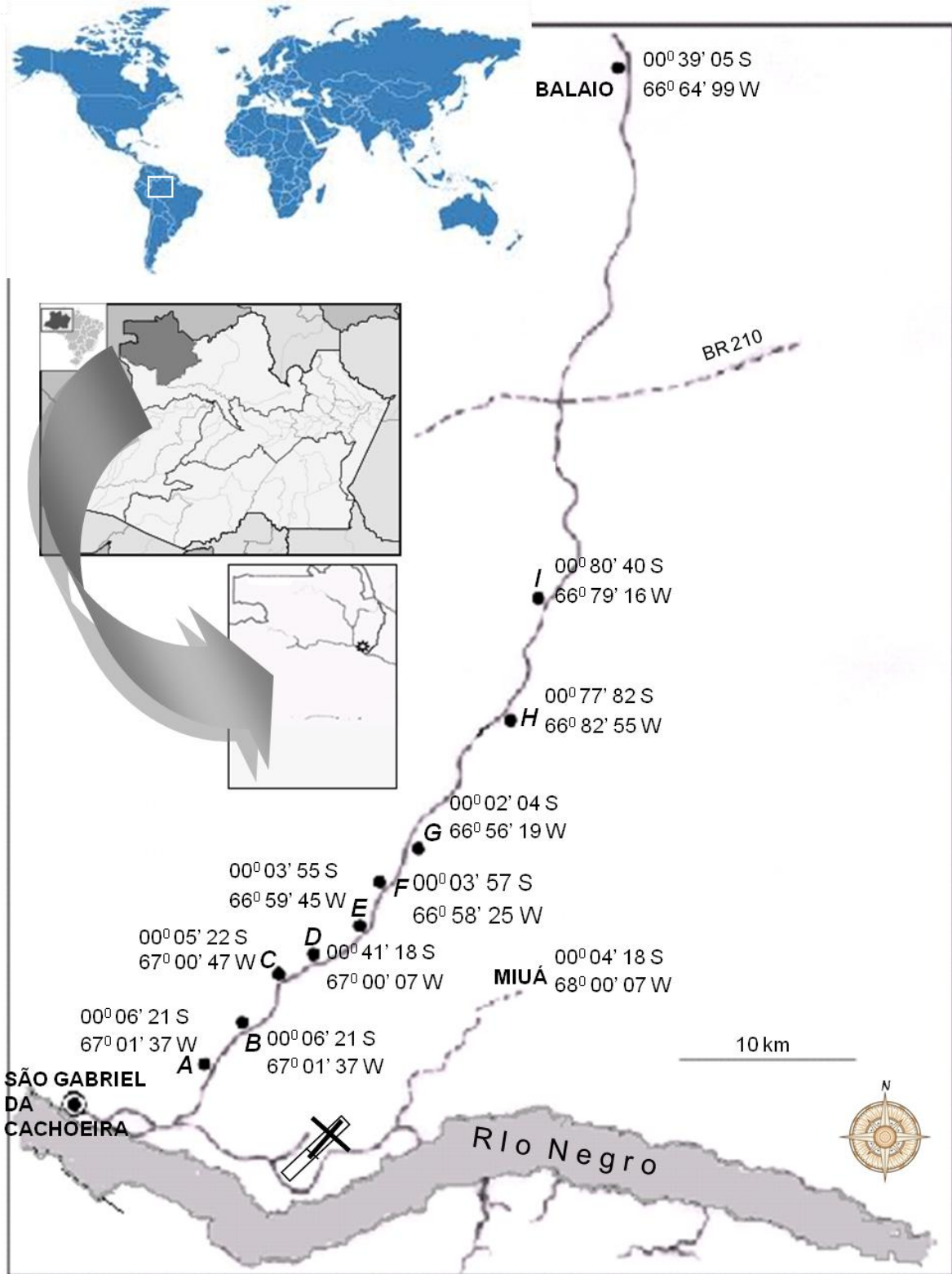


Figura 1. Mapa da área de coleta com as respectivas coordenadas: Estrada de Cucuí e Camanaus - Fonte: Artêmio Coelho da Silva, 2012, INPA.

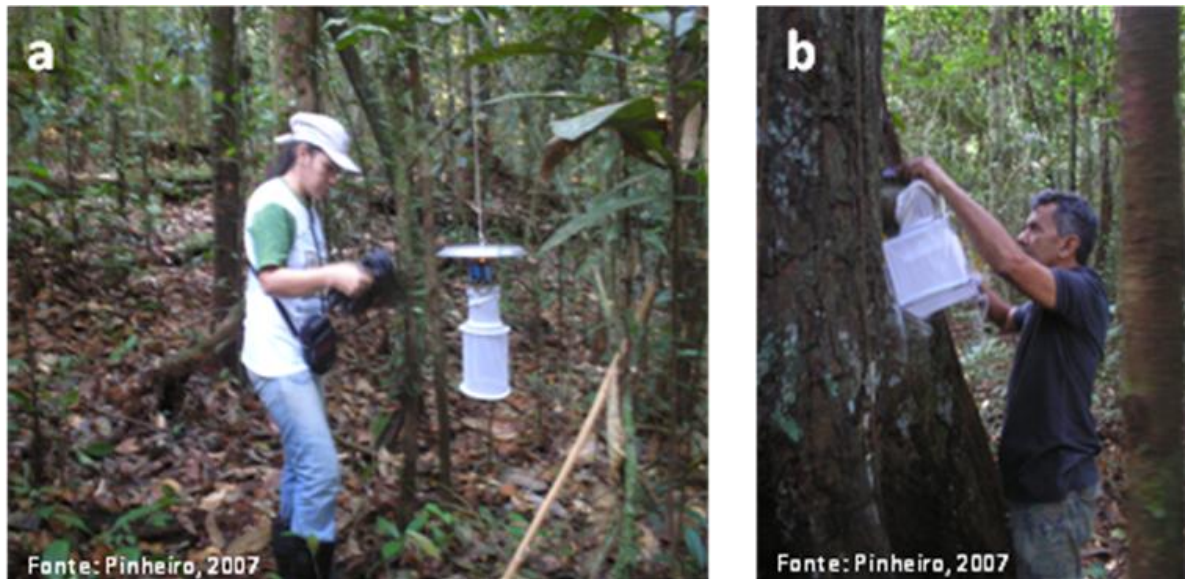


Figura 2. Métodos de coleta de flebotomíneos: (a) armadilha luminosa tipo CDC; (b) aspiração em base de árvore com CDC adaptada à captura manual. Fonte: Pinheiro, 2008.

Taxonomia - Todos os espécimes coletados foram transportados ao laboratório de biologia do Instituto Federal do Amazonas de São Gabriel da Cachoeira – IFAM, em caixa de polietileno (tipo isopor), dentro de gaiola de náilon e acondicionados em saco plástico contendo chumaço de algodão embebido em água destilada para manter a temperatura e a umidade no interior do recipiente. Os flebotomíneos capturados foram conservados em álcool a 70%, clarificados em KOH (hidróxido de Potássio/Merck®) a 10%, montados segundo BARRETTO e COUTINHO (1940) e identificados de acordo com as chaves de identificação propostas por YOUNG e DUNCAN (1994) e FREITAS e BARRETT (2002) [fig.3, a, b e c]. O material testemunho dos flebotomíneos foi depositado na Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).



Figura 3. Processo de triagem e montagem para identificação dos flebotomíneos. **(a)** retirada dos flebotomíneos utilizando capturador de Castro; **(b)** dissecação das fêmeas e separação dos machos com a retirada das genitálias para identificação e montagem das genitálias em lâmina com solução de Berlese. Fonte: Pinheiro, 2007.

Análise dos dados: O Índice de Abundância de Espécies (IAE) e o Índice Padronizado de Abundância de Espécies (IPAE) (ROBERTS; HIS, 1979) foram utilizados para analisar os dados obtidos a partir de capturas em áreas silvestres com métodos de coleta distintos. O programa Excel 2007 foi usado para análise dos dados.

Os dados foram registrados em uma tabela e distribuídos em linhas e colunas para as espécies por método de coleta. Cada coluna foi classificada separadamente, de acordo com o número de espécimes de cada espécie. O valor mais alto para cada coluna foi classificada como 1, o segundo como 2 e assim por diante. O IAE foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IAE = \frac{(a + R_i)}{K}$$

onde:

k: número de colunas da tabela (métodos de coleta);

a: número de métodos de captura em que a espécie esteve ausente x **c**;

c: para cada método um ranking de espécies variando entre 1 e n (atribuindo o valor de 1,0 para as espécies mais abundantes). O c compreendeu o maior valor de n obtido, considerando todos os métodos de captura, acrescido de 1;

RJ: soma das posições de uma determinada espécie em cada método de coleta.

Os limites mínimo e máximo deste índice foram determinados de acordo com a classificação mais elevada da distribuição, de modo limite é diferente em cada série de dados. A fim de evitar esta variação e padronizar o índice, que pode ser convertido sobre a escala de valores entre 0 e 1, outro índice foi utilizado, denominado pelos autores "Índice Padronizado de Abundância de Espécies - IPAE", onde as espécies mais abundantes apresentam valores mais próximos a 1 e vice-versa. A fórmula para calcular IPAE é:

$$IPAE = \frac{(c - IAE)}{(c - 1)}$$

Os resultados fornecem informações sobre a abundância relativa de espécies, bem como sobre a distribuição espacial dos indivíduos coletados.

Para comparar o total de flebotomíneos capturados na área utilizando-se CDC e base foi empregado o DivEs software - Diversidade de Espécies v2.0 (RODRIGUES, 2005), de modo que os dados puderam ser analisados pelos seguintes testes: Índice de Diversidade Shannon-Wiener (H'): em função do grande

número de espécies representadas por poucos indivíduos e Índice de equitabilidade (J'): para medir como cada espécie contribui na comunidade através de um determinado método.

3. RESULTADOS

Durante as sete excursões (2007 a 2011) realizadas ao município de São Gabriel da Cachoeira, foram coletados 6832 flebotomíneos, sendo que 73% (4988/6832) do total somente em 2007 em três excursões (meses de janeiro, julho e outubro). Neste ano de 2007, o mês que apresentou o maior número de indivíduos capturados foi julho - mês de menor precipitação pluviométrica (LIEBMANN; MARENGO, 2001) representando 62% (3093/4988) do total coletado e os meses com menor percentual de espécimes foram janeiro 9% (480/4988) e outubro 29% (1425/4988).

Foram identificadas 50 espécies, sendo 49 pertencentes ao gênero *Lutzomyia* e um espécime do gênero *Brumptomyia*. As espécies do gênero *Lutzomyia* estão distribuídas em 10 subgêneros e cinco grupos, além de uma espécie não agrupada (Tabela 1). O subgênero *Psychodopygus* representou 44% do total de espécimes capturados seguido por *Psathyromyia* com 20% e *Nyssomyia* 13%.

O número de fêmeas foi superior ao dos machos representando 57% (3939 indivíduos) das coletas (Tabela 1).

O índice de diversidade de Shanon-Wiener no município de São Gabriel da Cachoeira foi de $H' = 1,19$. A diversidade de espécies e a equitabilidade foram maiores em armadilhas luminosas ($H' = 1,2$ e $J' = 0,6$ respectivamente) quando comparados com as coletas em bases de árvores ($H' = 0,6$ e $J' = 0,4$) [Fig. 5].

A análise do IPAE revelou *L. ayrozai* BARRETTO e COUTINHO, 1940 e *L. georgii* FREITAS e BARRETT, 2002 [IPAE= 1,0] como as espécies mais abundantes nos cinco anos de coleta enquanto que *L. dendrophyla* MANGABEIRA, 1942 apresentou IPAE= 1,0 apenas no ano de 2007 (Tabela 1).

Tabela 1. Número de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) coletados com armadilha luminosa do tipo CDC e aspiração em bases de árvores, no período de 2007 a 2011, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil.

SUBGÊRO/ GRUPO	GÊNERO/ ESPÉCIES	2007***				2008				2009				2010				2011				ST		T										
		CDC		BA		IPAE	ST	CDC		BA		IPAE	ST	CDC		BA		IPAE	ST	CDC	BA	IPAE	ST		♂	♀								
		♂	♀	♂	♀			♂	♀	♂	♀			♂	♀	♂	♀								♂	♀								
	<i>Brumptomyia</i>																																	
	<i>B. pentacantha</i>	1	-	-	-	0,1	1	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	1	-	0,0	1	2	0	2	
	<i>Lutzomyia</i>																																	
	<i>Psychodopygus</i>																																	
	<i>Mangabeira</i> , 1941																																	
	<i>L. ayrozai**</i>	431	576	1	-	1,0	1008	1	2	-	-	1,0	2	1	2	-	-	1,0	3	32	6	-	-	1,0	38	4	4	-	-	1,0	8	470	590	1060
	<i>L. davisii**</i>	138	418	-	-	0,9	556	29	33	-	-	0,9	62	-	3	-	-	0,8	3	25	41	1	2	0,9	70	27	63	-	2	0,9	91	220	562	782
	<i>L. geniculata</i>	10	364	-	3	0,9	377	1	41	-	1	0,8	43	1	1	-	-	0,6	2	-	24	-	-	0,8	24	-	1	-	-	0,8	1	12	435	447
	<i>L. bernalei</i>	125	39	2	-	0,8	166	3	1	-	-	0,7	4	6	2	-	-	0,5	8	43	5	-	-	0,7	48	57	4	-	-	0,8	61	236	51	287
	<i>L. chagasi**</i>	131	100	-	-	0,8	231	4	7	-	-	0,7	11	1	-	-	-	0,4	1	4	-	-	-	0,7	4	10	-	-	-	0,7	10	150	107	257
	<i>L. amazonensis**</i>	14	58	-	-	0,5	72	1	-	-	-	0,4	1	-	-	-	-	0,0	0	2	2	-	-	0,4	4	-	12	-	-	0,5	12	17	72	89
	<i>L. carrerae</i>	9	23	-	-	0,5	32	-	3	-	-	0,4	3	-	-	-	-	0,0	0	2	2	-	-	0,3	4	14	9	-	-	0,4	23	25	37	62
	<i>L. paraensis**</i>	-	-	-	-	0,5	0	-	5	-	-	0,3	5	1	3	-	-	0,0	4	5	2	-	-	0,2	7	3	3	-	-	0,4	6	9	13	22
	<i>L. clautrei</i>	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	1	0	1	1
	<i>L. bispinosa</i>	-	1	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	0	1	1
	<i>L. corossoniense</i>	-	-	-	-	0,1	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	1	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	0	1	1
	<i>Psathyromyia</i>																																	
	<i>Barretto</i> , 1962																																	
	<i>L. dendrophyla**</i>	4	5	93	112	1,0	214	45	3	132	2	0,9	182	364	-	9	-	0,9	373	-	6	7		0,9	13	-	2	33	28	0,9	63	687	158	845
	<i>L. shannoni**</i>	10	5	93	48	0,9	156	25	1	75	1	0,8	102	-	-	10	-	0,7	10	-	3	3	1	0,8	7	-	-	19	5	0,8	24	235	64	299
	<i>L. scaffii**</i>	1	2	33	14	0,8	50	11	-	24	1	0,6	36	-	-	3	-	0,3	3	-	-	8	-	0,6	8	-	-	14	2	0,7	16	94	19	113
	<i>L. lutziana</i>	57	31	2	1	0,4	91	1	-	-	-	0,3	1	-	-	-	-	0,1	0	5	1	-	-	0,3	6	-	-	-	-	0,4	0	65	33	98
	<i>L. campbelli</i>	1	1	-	4	0,1	6	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	1	5	6
	<i>L. punctigeniculata</i>	1	2	-	-	0,0	3	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	1	2	3
	<i>L. cusquena</i>	1	-	-	-	0,2	1	-	-	-	-	0,1	0	1	-	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	0	2	0	2
	<i>Nyssomyia</i>																																	
	<i>Barretto</i> , 1962																																	
	<i>L. flaviscutellata**</i>	103	247	1	2	0,9	353	22	7	-	-	0,9	29	1	1	-	-	0,7	2	33	20	-	-	0,8	53	16	43	-	-	0,9	59	176	320	496
	<i>L. anduzei**</i>	28	165	20	28	0,8	241	5	28	2	-	0,8	35	2	2	-	-	0,5	4	1	4	-	-	0,7	5	2	7	1	1	0,8	11	61	235	296
	<i>L. reducta**</i>	5	21	-	-	0,5	26	-	3	-	-	0,3	3	-	-	-	-	0,0	0	1	1	-	-	0,3	2	7	7	2	-	0,4	16	15	32	47
	<i>L. yuilli**</i>	8	12	3	-	0,5	23	9	2	-	-	0,3	11	-	-	-	-	0,0	0	3	3	1		0,2	7	-	1	-	-	0,4	1	24	18	42
	<i>L. umbratilis**</i>	-	1	1	-	0,2	2	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	1	2	1	3
	<i>L. williamsi</i>	-	1	-	-	0,1	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	2	-	-	0,1	2	0	3	3
	<i>L. o. nociva**</i>	-	-	-	-	0,1	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	1	-	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,1	0	1	0	1
	<i>Lutzomyia</i>																																	
	<i>França</i> , 1924																																	
	<i>L. spathotrichia**</i>	-	2	-	-	0,2	2	-	1	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	0	0	4	4
	<i>L. araracuarensis</i>	-	-	-	-	0,1	0	-	-	2	-	0,0	2	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	0	2	0	2
	<i>L. falcata</i>	-	-	-	-	0,1	0	1	-	1	-	0,0	2	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	2	0	2
	<i>L. gomezi**</i>	-	-	-	1	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	1	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	0	1	1

Continuação...

SUBGÊNERO/ GRUPO	GÊNERO/ ESPÉCIES	2007***				2008				2009				2010				2011				ST		T										
		CDC		BA		IPAE	ST	CDC		BA		IPAE	ST	CDC		BA		IPAE	ST	CDC		BA			IPAE	ST	♂	♀						
		♂	♀	♂	♀			♂	♀	♂	♀			♂	♀	♂	♀			♂	♀	♂	♀						♂	♀				
<i>Evandromyia</i>	<i>L. georgii</i>	49	729	1	2	1,0	781	1	17	-	-	1,0	18	2	3	-	-	0,9	5	20	28	-	-	1,0	48	4	16	1	-	1,0	21	78	795	873
<i>Mangabeira, 1941</i>	<i>L. monstrosa</i>	20	30	-	1	0,4	51	-	-	-	-	0,3	0	-	-	-	-	0,0	0	7	6	-	-	0,2	13	2	5	-	-	0,3	7	29	42	71
	<i>L. tarapacaensis</i>	1	1	-	-	0,1	2	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	1	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	1	2	3
<i>Viannamyia</i>	<i>L. tuberculata**</i>	-	16	-	2	0,3	18	-	1	-	-	0,2	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	0	-	2	-	-	0,2	2	0	21	21
<i>Mangabeira, 1941</i>	<i>L. furcata**</i>	7	14	-	-	0,1	21	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	0	7	14	21
<i>Trichopygomyia</i>	<i>L. conviti*</i>	66	51	-	1	0,3	118	4	3	-	-	0,2	7	-	-	-	-	0,1	0	-	-	-	-	0,2	0	-	-	-	-	0,3	0	70	55	125
<i>Barretto, 1962</i>	<i>L. waglei</i>	28	10	-	-	0,2	38	1	2	-	-	0,1	3	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	0	-	-	-	-	0,2	0	29	12	41
<i>Sciopemyia</i>	<i>L. sordellii**</i>	38	100	-	-	0,6	138	1	1	-	-	0,5	2	-	-	-	-	0,2	0	8	7	-	-	0,5	15	3	4	-	-	0,5	7	50	112	162
<i>Barretto, 1962</i>	<i>L. servulolimai</i>	7	5	-	-	0,3	12	-	-	-	-	0,1	0	-	-	-	-	0,0	0	2	1	-	-	0,1	3	-	-	-	-	0,2	1	10	6	16
<i>Trichophoromyia</i>	<i>L. bettini</i>	31	42	1	-	0,7	74	-	1	-	-	0,5	1	-	2	-	-	0,1	2	7	1	-	-	0,5	8	2	-	-	-	0,6	2	41	46	87
<i>Barretto, 1962</i>	<i>Pressatia</i>																																	
<i>Mangabeira, 1942</i>	<i>L. triacantha</i>	4	12	-	-	0,3	16	1	3	-	-	0,1	4	-	-	-	-	0,0	0	1	-	-	-	0,1	1	-	-	-	-	0,2	0	6	15	21
<i>Grupo Aragaioi</i>	<i>L. aragaioi</i>	9	7	-	-	0,1	16	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	9	7	16
<i>Theodor, 1965</i>	<i>L. abunaensis</i>	8	3	-	-	0,1	11	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	8	3	11
	<i>L. coutinhoi</i>	7	2	-	-	0,1	9	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	7	2	9
	<i>L. b. barretto</i>	1	-	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	1	0	1
<i>Grupo Oswaldoi</i>	<i>L. longipennis</i>	3	-	-	2	0,1	5	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	3	2	5
<i>Theodor, 1965</i>	<i>L. dreisbachi</i>	25	22	-	-	0,2	47	-	-	-	-	0,1	0	-	-	-	-	0,0	0	1	-	-	-	0,1	1	-	-	-	-	0,2	0	26	22	48
<i>Grupo Saulensis</i>	<i>L. saulensis</i>	6	7	-	-	0,2	13	-	1	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,1	0	6	8	14
<i>Lewis et al., 1977</i>	<i>L. walker**</i>	3	9	-	-	0,1	12	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	3	9	12
<i>Grupo Migonei</i>	<i>L. bursiformes</i>	-	1	-	-	0,0	1	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	-	-	-	-	0,0	0	0	1	1
SUBTOTAL		1391	3135	251	221		4998	166	166	236	5		573	380	20	22	0		422	203	166	20	3		392	152	185	72	38		447	2893	3939	6832
TOTAL		4526		472				332		241				400		22				369		23				337		110						

CDC – Armadilha luminosa; BA – Base de árvore; ST – Subtotal; IPAE – Índice Padronizado de abundância de Espécies; T – Total;

* Primeiro registro para o Brasil; ** Espécies incriminadas ou suspeitas na transmissão de Leishmaniose Tegumentar.

*** Total de coletas realizadas em janeiro, julho e outubro de 2007. Nos outros anos as coletas foram realizadas somente em julho.

Do total de espécies identificadas, são considerados vetores ou supeitas de transmitirem leishmanioses: 1) *L. umbratilis* WARD e FRAIHA, 1977 e *L. anduzei* ROZEBOOM, 1942 vetores de *Leishmania (Viannia) guyanensis*; 2) *L. davisii* ROOT, 1934, *L. ayrozai* e *L. paraensis* COSTA LIMA, 1941 / *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) braziliensis*; 3) *L. shannoni* DYAR, 1929 / *L. (Leishmania) mexicana* e *L. (V.) panamensis*; 4) *L. yuilli* YOUNG; PORTER, 1972 / *L. (V.) panamensis*; 5) *L. tuberculata* MANGABEIRA, 1941 / *L. (V.) utingensis*; 6) *L. furcata*/*L. (L.) deaneii*; 7) *L. amazonensis* (ROOT, 1934)/*L. (V.) braziliensis*; 8) *L. flaviscutellata* MANGABEIRA, 1942 / *L. (L.) amazonensis* e 9) *L. gomezi* NITZULESCU, 1931 / *L. (V.) panamensis*.

Dentre os insetos do subgênero *Trichopygomyia* foram encontrados representantes da espécie *L. conviti* (RAMÍREZ-PÉREZ et al., 1976), sendo o primeiro registro para ao Brasil (PINHEIRO et al., 2010). Esta espécie foi coletada em armadilha CDC nas coordenadas (00°04'18S e 067°00'07W) da BR 307 (Figura 1). Este flebotomíneo não está envolvido na transmissão de flagelados do gênero *Leishmania* (CIPA, 1999).

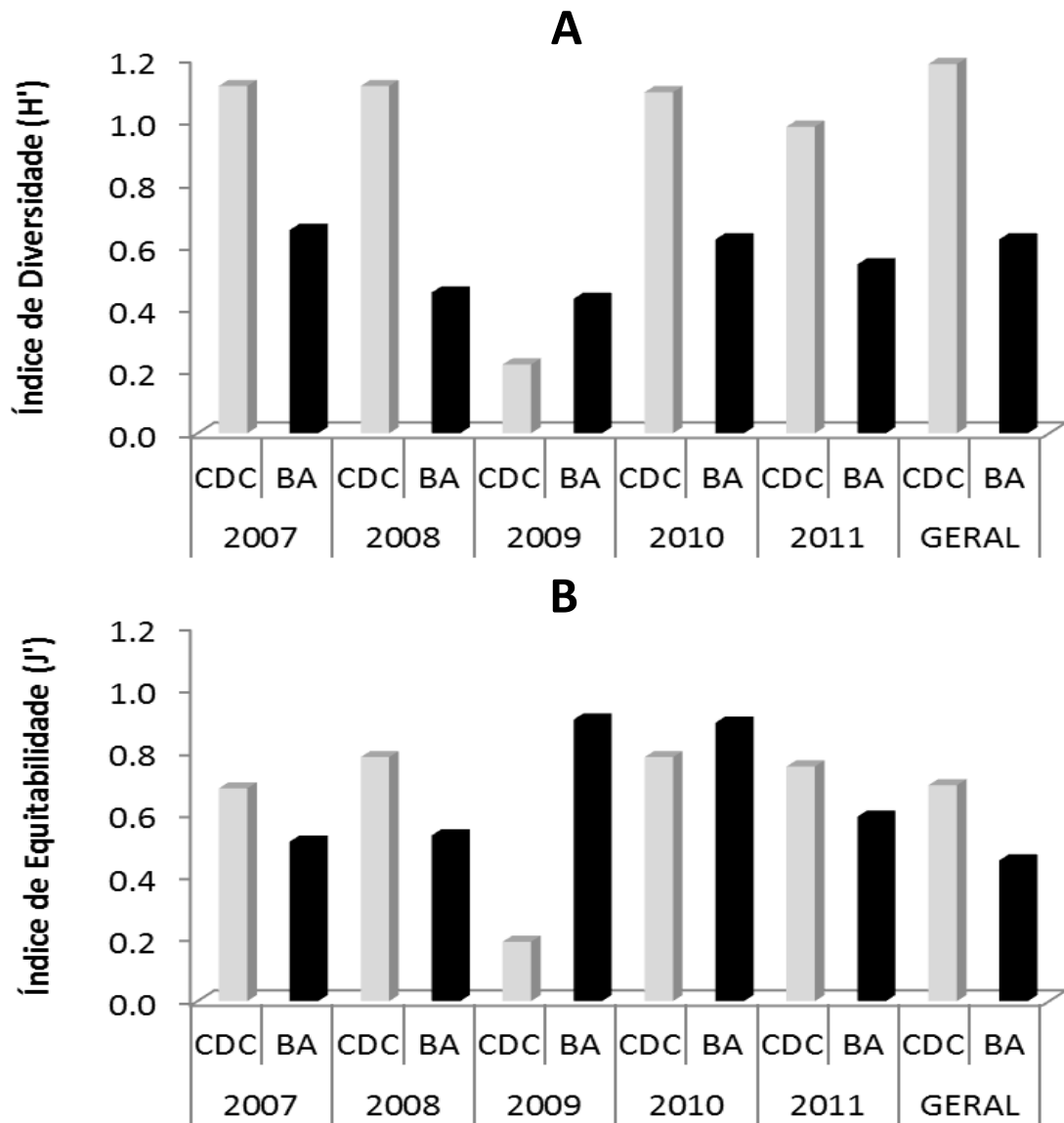


Figura 4. Comparação do (A) Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H') e o (B) Índice de Equitabilidade (J') entre os métodos de coletas (armadilha luminosa CDC e coleta em base de árvore - BA) no período de 2007 a 2011, em São Gabriel da Cachoeira, AM.

4. DISCUSSÃO

O direcionamento das coletas para o mês de julho foi devido as coletas prévias, mês de maior número de captura de flebotomíneos, e foi fundamentado segundo LIEBMANN e MARENGO (2001), que determinaram o nível de precipitação pluviométrica anual na região de São Gabriel da Cachoeira como superior a 3000 mm, apresentando menor e maior precipitação nos meses de agosto a outubro e dezembro, respectivamente.

Na região Amazônica, alguns autores já enfatizaram a relação entre abundância de flebotomíneos e precipitação pluviométrica, pois observaram que picos de chuvas proporcionam condição ambiental adequada para as mudanças no ciclo de vida (estágios e estádios) destes insetos (ALMEIDA et al., 2010; PINHEIRO et al., 2008; SILVA et al., 2007).

Esta relação não apresenta uma uniformidade entre as espécies, como também entre as regiões, como pode ser confirmada em estudos no Norte do Brasil, como os de PAES (1991) e BARBOSA et al. (2008) no município de Manaus, AM, em que as espécies *L. umbratilis* e *L. anduzei* foram as mais abundantes nos períodos chuvosos, e países da fronteira como no norte da Venezuela em que *L. gomezi* NITZULESCU, 1931 e *L. ovallesi* ORTÍZ, 1952 apresentaram um aumento na densidade populacional nos períodos mais quentes e na Colômbia *L. fairtigi* MARTINS, 1970 apresentou uma correlação positiva com a precipitação, temperatura e umidade relativa (FELICIANGELI et al., 1987). Estes resultados mostram que as intempéries climáticas e as alterações ambientais podem influenciar na regulação tanto da atividade do vetor como na sua abundância funcionando como um fator na transmissão da leishmaniose.

Os subgêneros mais representativos neste estudo foram *Psychodopygus*, *Psathyromyia* e *Nyssomyia*, grupos estes que contêm espécies vetores de leishmaniose com ampla distribuição pela Região Amazônica (SILVA et al., 2007; GIL et al., 2009). Semelhantes resultados foram observados em países de fronteira como a Colômbia e a Venezuela (FELICIANGELI et al., 1994; RODRIGUEZ et al., 1999; VÉLEZ et al., 2001; BEJARANO et al., 2002).

Na floresta Amazônica, espécies dos subgêneros *Psychodopygus* e *Nyssomyia* prevalecem no solo e na copa das árvores, respectivamente (ARIAS e FREITAS, 1982; AZEVEDO et al., 1993). A preferência por estes habitats está no fato destes locais servirem como território de circulação dos mamíferos, principalmente os considerados reservatórios naturais de leishmania, como os edentados (*Bradypus tridactylus*, *Choloepus didactylus*, *Tamandua tetradactyla*, *Dasypus novemcinctus*, *Cyclopes didactylus*), primatas (*Pithecia pithecia*, *Saimiri sciureus*, *Saguinus bicolor bicolor*), roedores (*Sciurus* sp., *Dasyprocta agouti*, *D. fuliginosa*, *Myoprocta acouchy*) e carnívoros como *Nasua nasua* (ARIAS e NAIFF, 1981; CARMO et al., 2002; NERY, 2003). A abundância das espécies destes subgêneros de flebotomíneos, que contêm representantes vetores, nas matas de São Gabriel da Cachoeira, aliado ao isolamento de flagelados e o registro de casos humanos, demonstraram um maior risco de transmissão da leishmaniose para a população desta área.

Além da abundância de vetores na área estudada foi observado um índice de diversidade considerável ($H' = 1,19$), reforçado por estudos anteriores de Fé et al. (1998) que apresentaram um índice de $H' = 2,86$. Em áreas adjacentes a fronteira do município, Bejarano et al. (2002), avaliando a associação de flebotomíneos em focos de leishmaniose na cidade de Sincelejo, Colômbia, obtiveram um índice de

diversidade de $H'=0,38$, ao coletar um total de seis espécies de 486 espécimes do gênero *Lutzomyia*. VIVERO et al. (2010) no mesmo País, constatou uma diversidade de flebotomíneos de $H'=0,843$ no departamento de Vichada, coletando um total de 182 insetos pertencentes a 15 espécies do gênero *Lutzomyia*. Apesar de a Colômbia ser um país de fronteira sua diversidade de espécies de flebotomíneos é inferior aos índices do Brasil colocando-o em segundo lugar nas Américas com mais de 160 espécies catalogadas (BEJARANO et al., 2006), e o Brasil encontra-se em primeiro com 400 espécies do gênero *Lutzomyia* (YOUNG e DUNCAN, 1994; RANGEL e LAINSON, 2003).

Da maioria das espécies de flebotomíneos registradas no Brasil, cerca de aproximadamente 52% já foram registradas na Amazônia (ARIAS e FREITAS, 1977; YOUNG e DUNCAN, 1994; RANGEL e LAINSON, 2003), onde a maior diversidade é encontrada em floresta primária de terra-firme. Trabalhos realizados por Freitas et al. (2002) em mata de terra-firme no município de Porto Grande (AP/Brasil) corroboram com a afirmação, onde os mesmos verificaram um índice de diversidade em torno 6,8 com 46 espécies coletadas de um total 20.008 flebotomíneos.

O número elevado de espécimes de *L. ayrozai*, tanto em nossas coletas como nos resultados dos estudos de FÉ et al. (1998) na área de São Gabriel, pode ser um indicativo para a circulação de *L. naiffi* nesta região, devido esta espécie ser uma das envolvidas na transmissão desta leishmania, assim como, *L. paraensis* e *L. davisii*.

A segunda espécie mais predominante foi *L. georgii* que não é considerada vetora de tripanossomatídeos e é comumente encontrada em ecossistemas de campina/campinarana (SILVA et al., 2010). Anteriormente, esta espécie era classificada como *L. begoniae* (ORTÍZ e TORRES, 1975) e, posteriormente, tratada

como variante de *L. infraspinosa* MANGABEIRA, 1942 (FREITAS; BARRETT, 2002). Possivelmente, devido a isto, esta espécie não foi relatada nos estudos de FÉ et al. (1998) como *L. georgii*, e sim, como *L. begoniae*.

O registro tardio de *L. conviti* no estado do Amazonas (PINHEIRO et al., 2010) pode ser creditado aos poucos estudos realizados nas áreas de fronteira do Brasil. Neste sentido, é esperado que a espécie possa estar presente em outras localidades do município de São Gabriel da Cachoeira, em ambientes semelhantes àqueles onde foi encontrada.

A maior proporção de fêmeas em relação aos machos, assinalados em diversos estudos no Amazonas (NERY e FRANCO, 2009; GOMES et al., 2009; SILVA et al., 2007.), segundo CHANIOTIS et al. (1971), estão relacionados a necessidade de maior dispersão entre as fêmeas para realizar a hematofagia, a busca por locais para oviposição e descanso, como também, diferenças na taxa de mortalidade e controle genético.

O levantamento da fauna dos flebotomíneos, bem como, o monitoramento de espécies transmissoras de leishmânias é realizado com o uso de diversas metodologias para se conseguir abranger o maior número de espécies nos diversos habitats. A armadilha CDC é o método preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil e amplamente utilizado, pois ela pode ser instalada no intra ou peridomicílio e em áreas de mata sendo descritas como padrão para captura de alguns culicídeos e flebotomíneos (ALEXANDER e MAROLI, 2003). A associação de capturas em base árvores, com armadilha CDC modificada, contribui para a captura de espécies que estão adaptadas a ambientes mais próximas ao solo.

Nos últimos anos de coleta, observamos uma mudança significativa ao longo da estrada de Cucuí (BR 307), local onde foi realizado parte do estudo, com grande

perda de florestas naturais tropicais, causada pelo desmatamento, e o surgimento de sítios com plantações, o que pode ter favorecido o aumento do número de flebotomíneos, principalmente, os antropofílico como *L. umbratilis*, *L. anduzei*, *L. davisii*, *L. paraensis* e *L. ayrozai*.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados neste estudo concluiu-se que: O município de São Gabriel da Cachoeira apresenta um índice de diversidade na fauna flebotomínica de $H' = 1,19$ e revelou *L. ayrozai* e *L. georgii* como as espécies mais abundantes nos cinco anos de coleta enquanto que *L. dendrophyla* apresentou-se mais abundante apenas no ano de 2007. Face à presença de várias espécies de flebotomíneos com potencial para atuarem como vetores de *Leishmania* spp na área de estudo, o crescente contato dos humanos (militares, indígenas e agricultores) com ambientes de floresta primária no município de São Gabriel da Cachoeira pode aumentar a possibilidade de aparecimento de casos de leishmanioses humanas.

Com o registro neste estudo de espécies vetoras (*L. gomezi*, *L. davisii*, *L. scaffii* e *L. yuilli*) de LTA, comuns nos países (Venezuela e Colômbia) que fazem fronteira com o município de São Gabriel da Cachoeira é recomendada a realização de estudos mais aprofundados que contemplem também aspectos parasitológicos e avaliem as taxas de infecção por *Leishmania* nas espécies comprovadas ou suspeitas de serem vetoras, a fim de que seja avaliado o verdadeiro risco à que estão expostos os moradores que estão fixando residência ao longo da BR 307 (Estrada de Cucuí).

Portanto, é recomendável que eventuais manejos dos ecossistemas locais utilizem medidas que minimizem a possibilidade de contato homem-floresta, evitando, dessa forma, o desencadeamento de surtos de LTA na localidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander CP 1920. A new subfamily of Tanyderid flies (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America* 13: 402-406.

Alexander B, Maroli M 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, 17(1): 1-18.

Almeida PS, Nascimento JC, Ferreira AD, Minzão LD, Pontes F, Miranda AM, Faccenda O, Filho JDA 2010. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Bras entomol* 54(2): 304–310.

Arias JR, Freitas RA 1977 Flebótomos da Amazônia Central do Brasil I. Resultados obtidos das capturas feitas com isca humana e eqüina (Diptera: Psychodidae). *Acta Amazônica* 7: 507-527.

Arias JR, Freitas RA 1982. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 3. Phlebotomine sand fly stratification in a terra firme florest. *Acta Amazônica* 12: 599-608.

Arias JR, Naiff RD 1981. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 79-286.

Ashford, RW 2001. Phlebotomus fevers. *The Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections*. Wallingford: CABI Publishing. p. 397-401.

Azevedo ACR, Bessa-Luz S, Vilela ML, Rangel EF 1993. Studies on the sandfly fauna of Samuel Ecological Station, Porto Velho municipality, Rondônia State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 509-512.

- Barbosa MG, Fé NF, Marcião AHR, Silva APT, Monteiro WM, Guerra JAO 2008. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:485-491.
- Barretto MP 1962. Novos subgeneros de *Lutzomyia* França. 1924 (Diptera: Psychodidae: subfamília Phlebotominae). *Rel. Inst. Med. trop. S. Paulo* 4 (2): 91-100.
- Barretto MP, Coutinho JO 1940. Processos de captura, dissecação e montagem de flebotomos. *An Fac Med S Paulo* 16: 173-187.
- Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID 2002. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (5):645-647.
- Bejarano, EE 2006. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera:Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomol Mex* 45 (1): 47-56.
- Birtles, RJ 2001. Carrión's disease. The Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections. Wallingford: CABI Publishing. p. 6-104.
- Carmo NAS 2002. *Distribuição, Densidade e Padrão de Atividades de Bradypus tridactylus (Mammalia, Xenarthra) em Fragmento Florestal na Amazônia Central*, MSc Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 63 pp.
- Chanotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM 1971. Daily and seasonal man-biting activity of Phlebotomine sandflies in Panama. *J. Med. Ent* 8 (4): 415-420.
- CIPA Group 1999 [homepage on the internet]. Paris: Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America. Site hosted by Université Pierre et Marie Curie [updated 1999]. Available from: <http://cipa.snv.jussieu.fr/>. Acesso em 25 março de 2012.
- Comer JA, Tesh RB 1991. Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: a review. *Parassitologia* 33: 143-150.

- Costa LA da 1941. Um novo "Flebotomus" da Amazônia e considerações relativas às espécies afins (Diptera:Psychodidae). *Acta med*, Rio de Janeiro 7(1): 3-19.
- Dyar HG 1929. The present knowledge of the American species of *Phlebotomus rondani* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Hygiene* 10; 112-124.
- Fé NA, Freitas RA, Barrett TB 1998. Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia (Psychodopygus) douradoi* n.sp. (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 (3): 331-336.
- Feliciangeli MD 1987. Ecology of sandflies (Diptera:Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. IV Sandfly monthly fluctuation and leishmaniasis incidence relationship. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82(2): 177-79.
- Feliciangeli MD, Ramírez-Pérez J, Ramírez A 1988. The phlebotomine sandflies of Venezuelan Amazonia. *Med Vet Entomol* 2: 47-65.
- Feliciangeli MD, Rodriguez N, Bravo A, Arias F, Guzman B 1994. Vectors of cutaneous leishmaniasis in northcentral Venezuela. *Med Vet Entomol* 8: 317-324.
- França C 1924. Notes parasitologiques. IV. Phlebotomes. *Jornal de Ciências, Matemática, Físicas e Naturais* 3: 22-25.
- Freitas RA, Barrett TV 2002. Descriptions of *Lutzomyia (Evandromyia) georgii* n. sp. and a synopsis of the series *infraspinosa* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (2): 239-45.
- Freitas RA, Naiff RD, Barrett TV 2002. Species diversity and flagellate infections in the sandfly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 53-59.
- Gil LHS, Araújo MS, Villalobos JM, Camargo LMA, Ozaki LS, Fontes CJF, Ribolta ME, Katsuragawa HT, Cruz MR, Silva AA, Silva LHP 2009. Species structure of sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in the Brazilian western Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (7): 955-959.
- Gomes LHM, Nery LCR, Pinheiro FG, Freitas RA, Franco AM 2009. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em terra firme e planície

fluvial na área de influência do gasoduto Coari-Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 39(1):

Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM 1977. Proposals for a stable classification of phlebotomine sandflies. *Syst. Entomol.* 2:319-332.

Liebmann, B, Marengo J 2001. Interannual variability of the rainy season and rainfall in the Brazilian Amazon Basin. *J. Climate*, 14: 4308-4318.

Mangabeira O 1941a. 3ª Contribuição ao estudo dos Flebotomus. *Evandromyia* n. subg. (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 36(2): 215–223.

Mangabeira O 1941b. 4ª Contribuição ao estudo dos Flebotomus. *Psychodopygus* n. subg. (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 36(3): 237–250.

Mangabeira O 1941c. 5ª Contribuição ao estudo dos Flebotomus. *Viannamyia* n. subg. (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 36(3): 251–262.

Mangabeira O 1942. 11ª Contribuição ao estudo dos Flebotomus (Diptera: Psychodidae). *Flebotomus oswaldoi* Mangabeira, 1942. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 37: 287–295.

Martins AV 1970. *Lutzomyia (Psychodopygus) fairtigi* n. sp. from Colombia (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 72: 279.

Martins AV, Williams P, Falcão AL 1978. American Sand Flies (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae). Rio de Janeiro. Acad. Bras. Ciênc. pp. 195.

Nery LCR 2003. *Distribuição, Diversidade e Biologia de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) da Área do Campus da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, Brasil*, MSc Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 107 pp.

Nery LCR, Franco AMR 2009. Distribuição, diversidade e biologia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) da área do campus da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Rev. Pan-Amaz Saude* 2(2):

- Nitzulescu V 1931. Essai de classifications dês phlébotomes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 9: 271-275.
- Ortíz IC, Torres JR 1975. *Phlebotomus begoniae* nov. sp. flebótomo del subgenero *Evandromyia* Mangabeira, 1941 en la región Nor-Occidental Amazonica Venezolana (Diptera: Psychodidae). *Revta Inst. Nac. Hig.*, Caracas, 8: 101-105.
- Paes MG 1991. *Estudo de quatro espécies de Lutzomyia França, 1924 (Diptera: Psychodidae), em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus (Amazonas – Brasil)*. Dissertação de Mestrado. PPG-BTRN – INPA/FUA. 128p.
- Pinheiro FG, Freitas RA, Rocha LC, Franco AMR 2010. Primeiro Registro de *Lutzomyia (Trichopygomyia) conviti* Ramirez Perez, Martins e Ramirez (Diptera: Psychodidae) no Brasil. *Neotrop Entomol* 39(4): 676-677.
- Pinheiro FG, Luz SB, Franco, AMR 2008. Infecção natural por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 38: 165-172.
- Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A 2010. Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in na Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *J Vector Ecol* 35 (2): 325-332.
- Rangel, EF, Lainson, R 2003. Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. *In*: Rangel, EF, Lainson, R. (Ed.) *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 291-309.
- Roberts, DR, His BP 1979. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environmental Entomology* 8: 1007–1013.
- Rodrigues, WC 2005. DivEs - Diversidade de espécies. Versão 2.0. Software e Guia do Usuário. Disponível em: <<http://www.ebras.bio.br>> (22 abril 2012).
- Rodriguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 47-49.

Root FM 1934. Some american species of *Phlebotomus* with short terminal palpal segments. *Am. J. Hyg.* 20: 233-246.

Rozeboom LE 1942. *Phlebotomus anduzei*, a new *Phlebotomus* from Venezuela. *Bol. Entomol. Venez.* 1: 91-94.

Silva DF, Freitas RA, Franco AMR 2007. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. *Neotrop Entomol* 36: 138-144.

Silva EA, Andreotti R, Honer, MR 2007. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Soc Bras Med Trop* 40(4): 420-425.

Silva PES, Freitas RA, Silva, DF, A, RB 2010. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma reserva de campina no Estado do Amazonas, e sua importância epidemiológica. *Soc Bras Med Trop* 43(1): 78-81.

Tesh RB 1988. The genus *Phlebovirus* and its vectors. *Annual review of entomology* 33: 169-181.

Theodor O 1965. On the classification of American Phlebotominae. *J. Med. Entomol* 2: 171-197.

Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S 2001. Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Cad Saúde Pública* 17: 171-180.

Vivero RJ, Bejarano EE, Castro M, Vélez A, Pérez JE, Pérez-Doria A, Vélez ID, Carrillo LM 2010. Trece registros nuevos de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) para el departamento de Vichada, Orinoquia Colombiana. *Biota Neotrop* 10 (2): 401- 404.

Ward RD, Fraiha H 1977. *Lutzomyia umbratilis*. A new species of sandfly from Brazil (Diptera: Psychodidae). *J. med. Entomol* 14: 313-317.

Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* 54: 1-881.

5. CAPÍTULO II

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, AM, BR

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO MUNICÍPIO
DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, AM, BRASIL*

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE CITY
OF SAO GABRIEL DA CACHOEIRA, AM, BR

Francimeire Gomes Pinheiro, Rui Alves Freitas e Antonia Maria Ramos Franco

Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, 69011-970, AM, Brasil.

RESUMO

Avaliando a prevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em São Gabriel da Cachoeira, no período de 2001 a 2009, foram notificados 146 casos autóctones, onde 77% eram indígenas e 62% eram do sexo masculino, com faixa etária de 30 a 39 anos (35%) e agricultores (41%). A forma clínica cutânea foi predominante, porém ocorreu um caso de leishmaniose muco cutânea, no ano de 2008. O estudo sobre os vetores de Leishmaniose em São Gabriel da Cahoeira foi realizado no período de 2007 a 2011, nas áreas que abrangem a BR 307 (Estrada de Cucuí) e a usina hidreletrica de Miuá. Dos 6832 flebotomíneos coletados, 66% (4526/6832) são insetos com importância vetorial para leishmânias e/ou tripanossomatídeos, como é o caso de *Lutzomyia ayrozay*, *L. shannoni* e *L. flaviscutellata*. Vários fatores têm contribuído para um aumento de interesse mundial na epidemiologia, controle e tratamento da leishmaniose. Esta doença transmitida por vetores é uma infecção emergente que está se adaptando a ambientes em mudança e se espalhando para novas regiões geográficas.

Palavras-chave: Epidemiologia, Zoonoses, Flebotomíneos, Insetos Vetores

*Este capítulo segue as normas e técnicas da revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2013).

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem se observado uma considerável expansão geográfica das leishmanioses em todas as regiões do Brasil, de maneira que ocorrem em praticamente todos os Estados, sendo a média anual de 35 mil novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e quatro mil de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) [Ashford, 2000, Desjeux, 2004].

Este processo tem sido relacionado a questões ambientais e sociais, pois anteriormente a doença era restrita a área florestal e rural, agora está presente em habitat periurbano e urbano, incluindo grandes cidades brasileiras como Campo Grande e Teresina (Oliveira-Pereira *et al.* 2006). No entanto, surtos rurais da leishmaniose continuam a ser um problema, com casos relatados de vários estados brasileiros, incluindo Minas Gerais (Maywald *et al.* 1996, Gontijo *et al.* 2002, Nunes *et al.* 2006, Saraiva *et al.* 2006).

Não obstante, a região Norte ainda encerra os maiores índices da doença e segundo o DATASUS (2010), contribuindo até 2006 com 40% dos registros da doença no país.

O Estado do Amazonas apresenta em sua constituição territorial um total de 62 municípios, porém, o conhecimento a despeito dos vetores, agentes etiológicos e manifestação clínica da LTA no estado, limita-se a área conhecida como região metropolitana de Manaus (RMM), a qual apresenta os seguintes municípios: Manaus, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva, Itacoatiara, Careiro da Várzea, Iranduba, Novo Airão e Manacapuru que formam o grupo conhecido como Grande Manaus (IBGE, 2010). Dentro deste grupo, Manaus, Rio Preto da Eva e Presidente

Figueiredo são os municípios de maior notificação da doença (SINAN, 2011) [figura 1].

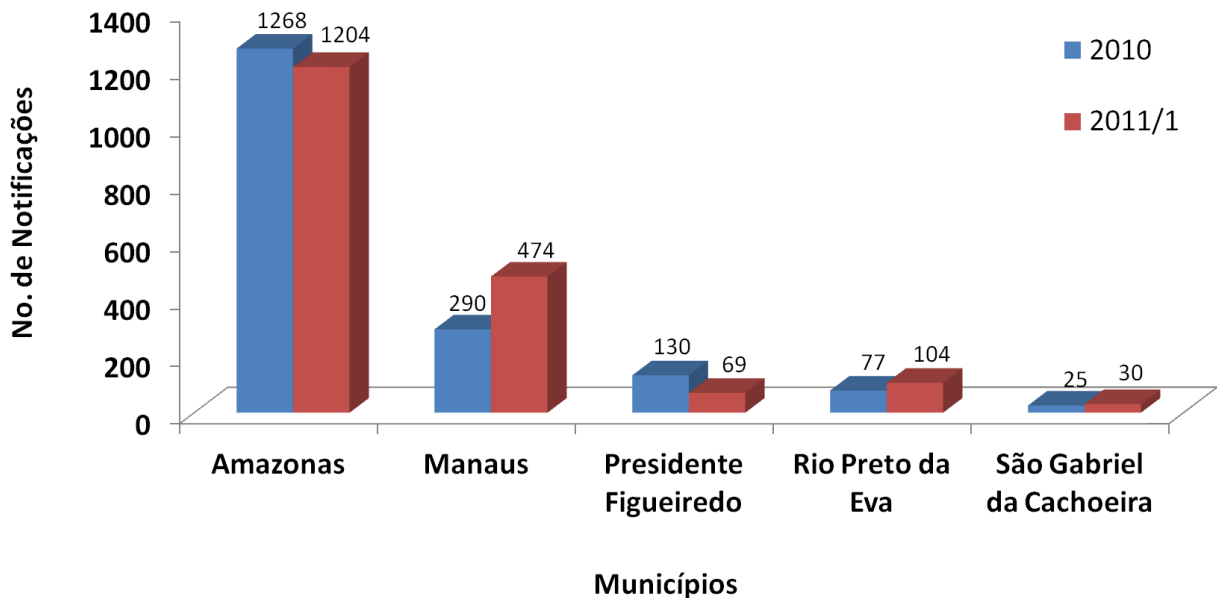


Figura 1. Distribuição entre os municípios do Amazonas com maior número de notificações de Leishmaniose Tegumentar Americana nos anos de 2010 e primeiro semestre de 2011. Fonte: SINAN, 2011.

Apesar do conhecimento produzido sobre os diversos elementos que compõem a cadeia de transmissão da LTA no Amazonas, os estudos em relação a tríade epidemiológica (hospedeiro, vetor e agente etiológico) da LTA nos municípios da região conhecida como Alto Rio Negro (São Gabriel da Cachoeira - Santa Izabel do Rio Negro – Barcelos) ainda são escassos, em particular São Gabriel da Cachoeira, onde a região limita-se com os países da Venezuela e Colômbia e, nestas áreas a LTA também é um importante problema de saúde pública.

A casuística da leishmaniose no município de São Gabriel da Cachoeira (SGC) é baixa, se comparada com os municípios de Manaus, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo (SINAN, 2011) [figura 1]. Sendo que no período de 2001 a 2009 foram registrados 146 casos neste município (Portal ODM, 2013)

As mudanças ocorridas, nos últimos anos, nas condições ambientais relacionadas ao processo de desmatamento e urbanização em SGC, podem ter influência sobre a população de flebotomíneos e conseqüentemente, na transmissão da leishmaniose. Deste modo, a identificação das áreas de risco à transmissão das leishmanioses faz-se necessária para a atuação das vigilâncias ambiental e epidemiológica na prevenção desta doença. Este estudo teve como objetivo descrever as características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar notificada em SGC e identificar possíveis espécies de flebotomíneos vetores da doença nessa região.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo: O estudo foi realizado no município de São Gabriel da Cachoeira (00° 08' 00"S, 66° 59' 00"W) [Figura 2], que é situado no extremo noroeste do estado brasileiro do Amazonas. Dista 852 quilômetros da capital do estado, Manaus. Está localizado na Bacia do Alto Rio Negro. Limita-se ao norte com a Colômbia e com a Venezuela, ao sul e a leste com o município de Santa Isabel do Rio Negro e ao sul com Japurá. Parte de seu território é composto pelo Parque Nacional do Pico da Neblina, além das terras indígenas.

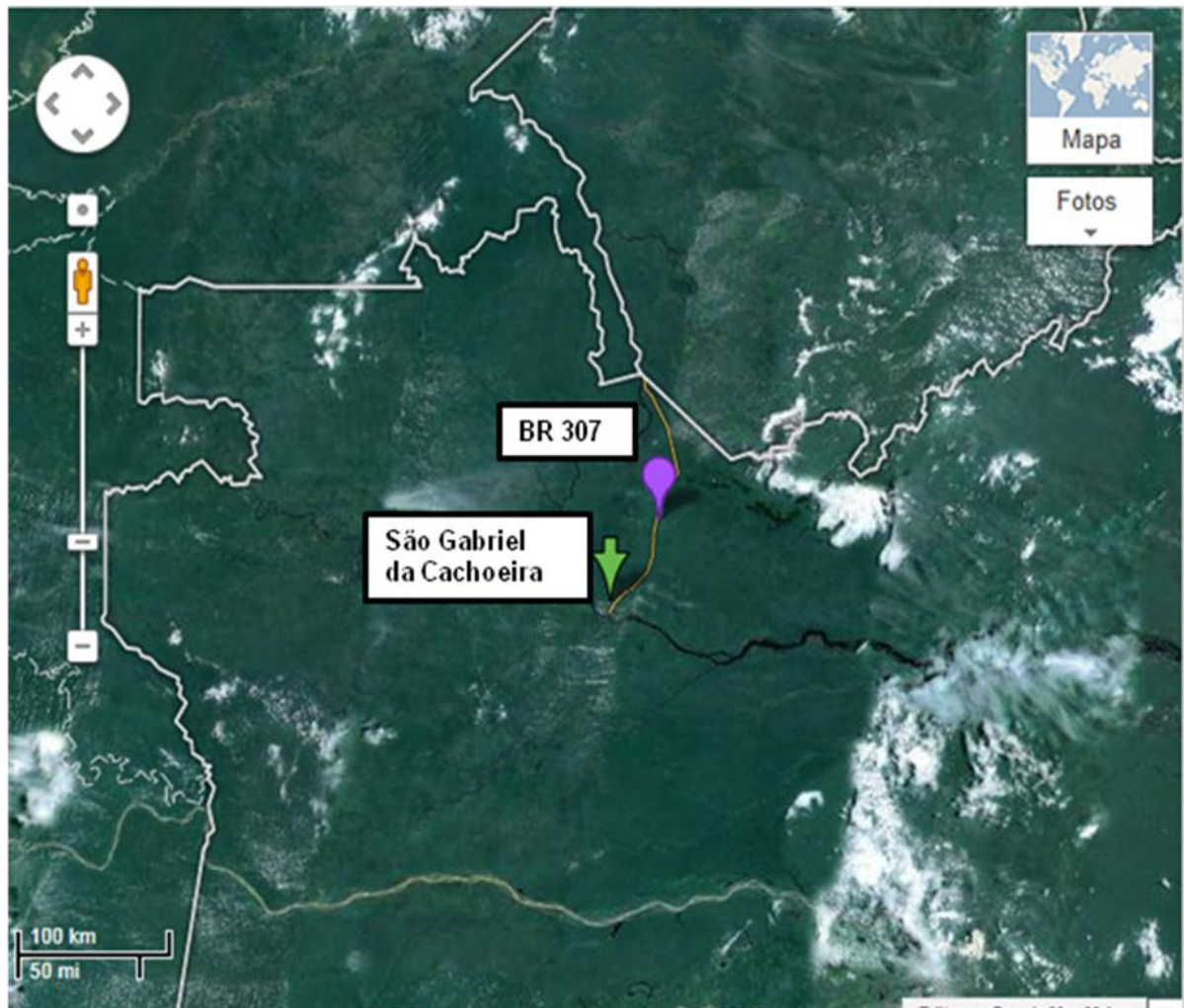


Figura 2. Localização do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas - BR e área da BR 307 (Mapa Satelital) e dos locais onde foram realizadas as coletas dos flebotomíneos. Fonte: MapLink/Tele Atlas.

Captura de Flebotomíneos: o estudo foi realizado ao longo da BR 307 (estrada de Cucuí), entre as coordenadas 00°06'21S, 067°01'37"W e 00°35'30"N, 66°46'26"W e na estrada da Usina Miuá no trecho que compreende as coordenadas 00°04'18S e 067°00'07" W, no período de 2007 a 2011 (capítulo 1). Os flebotomíneos foram coletados utilizando-se 16 armadilhas luminosas do tipo CDC (CDC "miniature" - Hausherr' Machine Works, New Jersey, EUA) instaladas em

áreas de mata de terra firme a um metro do solo, durante a noite das 18h às 7h do dia seguinte. Paralela as coletas com CDC foi realizada aspiração em base de árvores, com armadilha do tipo CDC modificada, no momento da retirada das armadilhas luminosas no horário entre 8h e 8h30. Foram selecionadas árvores com caules acima de 100 cm de circunferência e presença de buracos, facilitando o encontro destes insetos. Posteriormente os insetos foram triados, condicionados em etanol e identificados segundo a chave taxonômica de Young e Duncan (1994).

Levantamento de casos humanos: Em SGC, o diagnóstico e o tratamento para leishmaniose são realizados no Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira (HGU/SGC), localizado no centro da cidade. O instrumento utilizado para obtenção das informações são aquelas constantes da ficha de notificação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) arquivadas na Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde – SGC.

3. RESULTADOS

Características epidemiológicas da LTA: Entre o período de 2001 a 2009 foram notificados 146 casos de LTA em moradores de São Gabriel da Cachoeira (Figura 3). Deste total, 62% eram do gênero masculino e 38% do feminino (Figura 4-A) e a população indígena representou 77% dos casos notificados (Figura 4-B). Em relação ao local de moradia, a zona rural foi a qual apresentou a maior incidência 61% de pacientes com LTA.

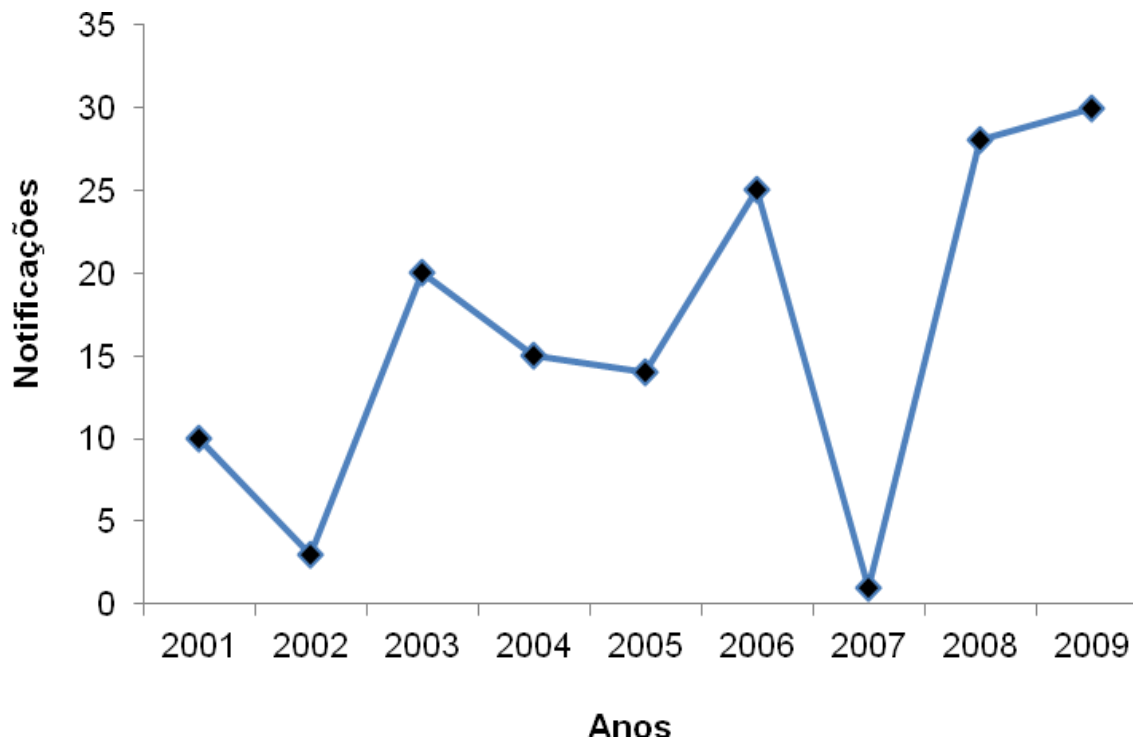


Figura 3. Número de casos de Leishmaniose tegumentar no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira, AM, BR. Fonte: SINAN, 2011.

A forma clínica dos casos de LTA foi predominantemente cutânea (Figura 4-D), porém no ano de 2008, foi diagnosticada em um paciente da etnia Tucano da comunidade Balaio, a forma muco cutânea. O mesmo foi encaminhado para a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor de Vieira Dourado (FMT/HDV), em Manaus. O método empregado para o diagnóstico da LTA foi o parasitológico, com a pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da lesão por escarificação (raspado da borda da lesão) e corado pelo método Panótico (BRASIL, 2007).

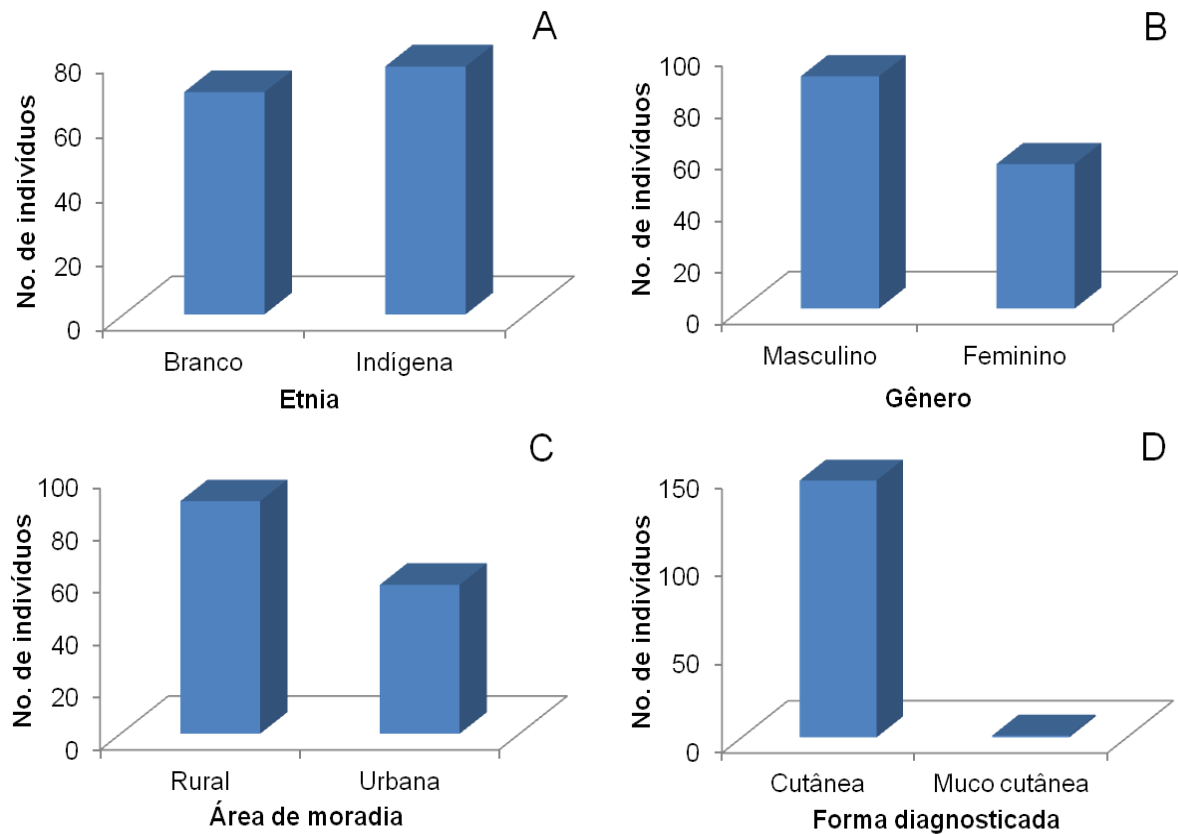


Figura 4. Perfil sócio-epidemiológico dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar, no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira, AM. **A:** Etnia; **B:** Gênero; **C:** Área de moradia; **D:** Forma diagnosticada. FONTE: Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira (HGU/SGC)

O tratamento utilizado foi a droga de primeira escolha, o antimonial pentavalente, antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®). Este antimonial é indicado para tratamento de todas as formas de LTA, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. No município de São Gabriel da Cachoeira a administração do antimonial pentavalente nos pacientes com LTA, foi realizada no

Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira (HGU/SGC), pelos profissionais de saúde da instituição.

A idade dos indivíduos variou entre menores de 10 a 79 anos, sendo mais representativa a faixa etária de 30 a 39 anos (35%) [Figura 5]. Quanto à ocupação principal, as mais frequentes foram a de agricultor (n=60; 21,9%), seguida de militar (n=25; 17%) e estudante com (n=20; 14%) [Figura 6].

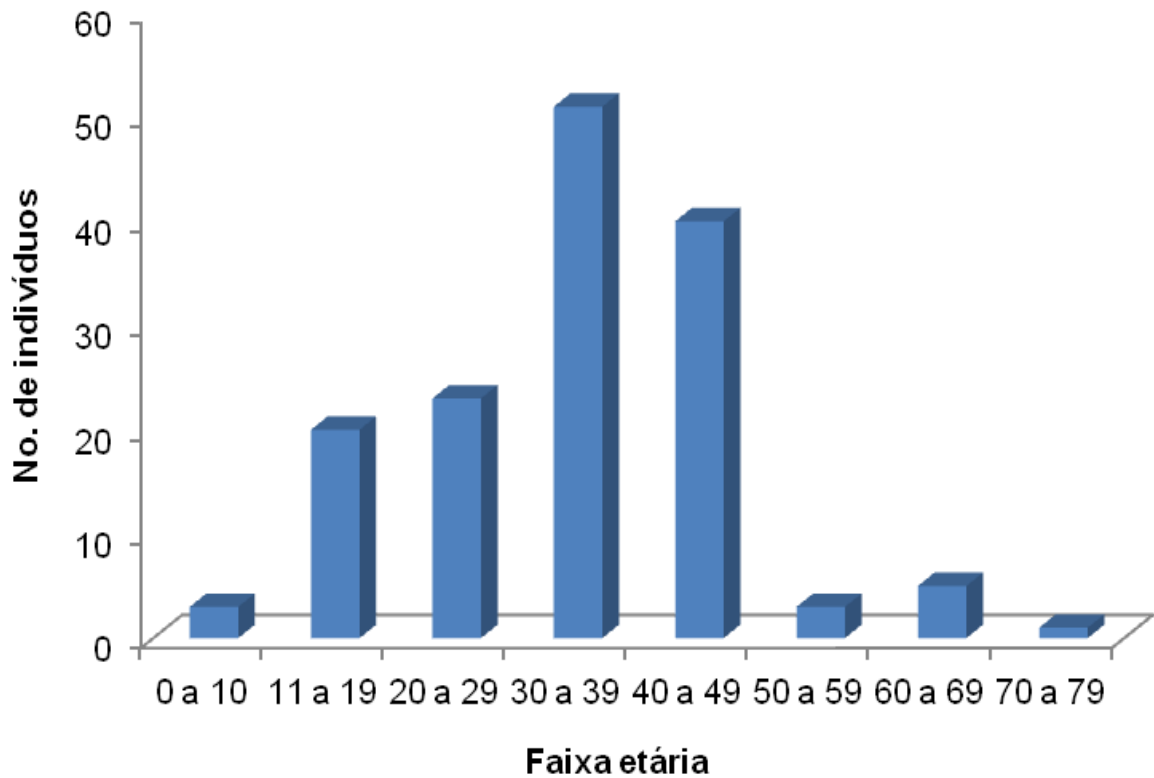


Figura 5. Faixa etária dos pacientes diagnosticados para Leishmaniose Tegumentar Americana, no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira.

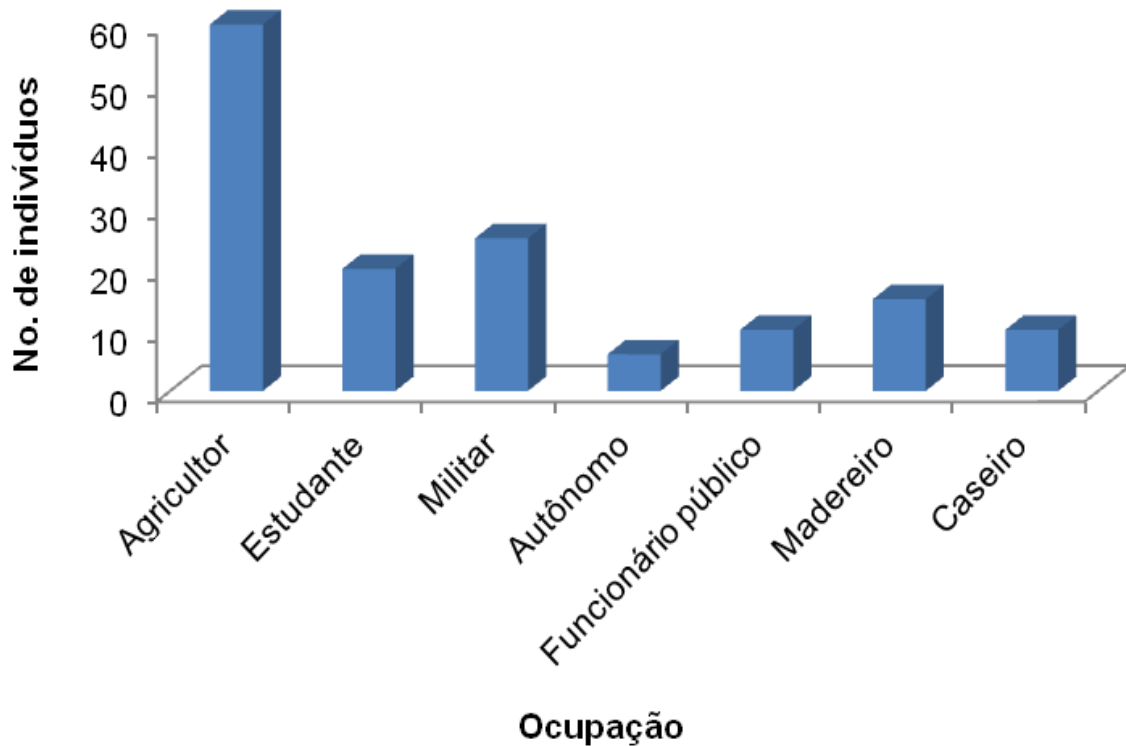


Figura 6. Tipo de ocupação profissional dos pacientes diagnosticados para Leishmaniose Tegumentar Americana, no período de 2001 a 2009, no município de São Gabriel da Cachoeira.

Fauna de flebotomíneos vetores: Do total de 6832 flebotomíneos coletados e distribuídos em 50 espécies, 66% (4526/6832) correspondem a 19 espécies envolvidas na transmissão de leishmânia e/ou tripanossomatídeos de importância para a saúde pública (Young e Arias, 1992) [Tabela 2]. Dentre estas as mais representativas foram *L. ayrozai* (23%), *L. dendrophyla* (19%), *L. davisii* (16%), *L. flaviscutellata* (11%), *L. shannoni* (6.6%), *L. anduzei* (6,5%) e *L. chagasi* (5,6%). As demais espécies representam juntas aproximadamente 12,3% do total de vetores incriminados e suspeitos (Tabela 1). Os subgêneros *Psathyromyia*, *Psychodopygus*

e *Nyssomyia* apresentaram em nível de espécimes as maiores frequências, 51%, 25% e 21% respectivamente.

O maior número de indivíduos foi obtido com armadilha luminosa tipo CDC com 81% (3688) e 19% (838) por aspiração em base de árvores. As espécies *L. dendrophyla*, *L. davisii*, *L. flaviscutellata*, *L. shannoni*, *L. anduzei*, *L. scaffii*, *L. yuilli*, *L. tuberculata* e *L. umbratilis* foram comuns tanto em armadilha luminosa quanto em aspiração em base de árvores. Já as espécies *L. ayrozai*, *L. chagasi*, *L. sordelli*, *L. amazonensis*, *L. furcata*, *L. paraensis*, *L. walkeri*, *L. spatrotrichia*, *L. olmeca nociva* e *L. gomezi* foram capturados somente em armadilha luminosa do tipo CDC.

A proporção sexual foi de 51% (2303) de fêmeas e 49% (2223) de machos coletados.

Tabela 1 - Flebotomíneos incriminados como transmissores de tripanossomatídeos, capturados em área silvestre no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (períodos de 2007 a 2011).

ESPÉCIMES	MÉTODOS DE COLETA				SUBTOTAL		TOTAL
	CDC		BASE		♂	♀	
	♂	♀	♂	♀			
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	470	589	-	-	470	589	1059
<i>L. dendrophyla</i>	413	16	274	142	687	158	845
<i>L. davisii</i>	219	559	1	4	220	563	783
<i>L. flaviscutellata</i>	175	318	1	2	176	320	496
<i>L. shannoni</i>	35	9	200	55	235	64	299
<i>L. anduzei</i>	38	206	23	29	61	235	296
<i>L. chagasi</i>	150	107	-	-	150	107	257
<i>L. scaffi</i>	12	2	82	17	94	19	113
<i>L. sordelli</i>	50	112	-	-	50	112	162
<i>L. amazonensis</i>	17	72	-	-	17	72	89
<i>L. yuilli</i>	20	18	4	-	24	18	42
<i>L. tuberculata</i>	19	-	-	2	19	2	21
<i>L. furcata</i>	7	14	-	-	7	14	21
<i>L. paraensis</i>	9	13	-	-	9	13	22
<i>L. walkeri</i>	3	9	-	-	3	9	12
<i>L. umbratilis</i>	-	1	-	2	-	3	3
<i>L. spathotrichia</i>	-	4	-	-	-	4	4
<i>L. olmeca nociva</i>	1	-	-	-	1	-	1
<i>L. gomezi</i>	-	1	-	-	-	1	1

CDC – Armadilha luminosa; BA – Base de árvore

4. DISCUSSÃO

A LTA na Amazônia ocorre, habitualmente, na forma de surtos epidêmicos em locais de caça, construção de estradas, instalação de frentes de trabalho e em grupos de militares em treinamento na selva (Talhari *et al.* 1988, Paes *et al.* 1998, Pinheiro *et al.* 2004, 2008). Portanto, a leishmaniose comporta-se como doença profissional, sendo os adultos do gênero masculino os mais acometidos. Neste

estudo, a LTA foi mais comum neste gênero, esse fato é confirmado em outros estudos (Falqueto *et al.*, 2003, Martins *et al.* 2004, Guerra *et al.* 2006, Guerra *et al.*, 2011), e pode ser explicado pela exposição desses trabalhadores em atividades relacionadas à agricultura, extração de madeira, abertura de estradas, ou ainda, aos processos de ocupação nas periferias das cidades, em sua maioria, desordenados. Em suma, o predomínio da idade correspondente a adultos jovens e a atividade laboral podem estar influenciando nesta maior ocorrência.

Em nossos resultados a etnia que prevaleceu foi a indígena, fato esperado porque segundo o Censo (2010), o município de São Gabriel da Cachoeira é considerado o mais indígena do país, apresentado um contingente de 29,0 mil dos 126,6 mil da população indígena nacional. E a grande maioria desta população encontra-se em área rural do município.

Na Amazônia, a LTA está agrupada sob três diferentes formas clínicas: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM) [Naiff, 1998, Romero *et al.* 2002, Romero *et al.* 2005, Shaw *et al.* 2007]. No Estado do Amazonas a LC é a de maior predomínio, principalmente na região de Manaus (Romero *et al.* 2002, Guerra *et al.* 2011), o mesmo observado neste trabalho, com predominância de 99% dos casos. Apesar da diversidade da evolução clínica patológica, a lesão cutânea inicial é similar para todas as formas clínicas da doença, podendo resolver-se espontaneamente ou evoluir de forma diversa, com envolvimento de mucosas ou não e comprometimento cutâneo de grau variado. A cura espontânea já foi evidenciada em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Marsden *et al.* 1975, Naiff *et al.* 1988).

Fato importante foi a notificação de um caso da forma muco cutânea da doença, em indígena da etnia Tucano. Alguns trabalhos já confirmaram o aparecimento da forma mucosa após lesão cutânea antiga e, além disso, de ter sido causada pela mesma espécie de *Leishmania*. (Marsden, 1986, Guerra *et al.* 2011). As espécies *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis* e em alguns casos a *L. (V.) guyanensis* estão envolvidas na etiologia desta forma de Leishmaniose (Saraiva *et al.* 1985, Naiff *et al.* 1988, Santrich *et al.* 1990). Contudo a *L. (V.) braziliensis* é reconhecida como o agente etiológico mais importante nas Américas (Osorio *et al.* 1998, Guerra *et al.* 2011).

É sabido que a grande maioria dos pacientes atendidos no HGU/SGC não concretiza o tratamento para leishmaniose (Major Enf^a Gianini, HGU/SGC, comunicação pessoal), principalmente os indígenas, fato este explicado, pois os mesmos residem na zona rural da cidade e necessitam retornar para as suas residências, além do mais o tratamento é longo, de aproximadamente um mês. Associando com todas essas informações, podemos concluir que provavelmente a LM que acometeu o indígena, seja da forma tardia da doença.

Em relação ao tratamento dos pacientes em São Gabriel da Cachoeira, a medicação de primeira escolha ainda continua sendo o Antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime), o qual é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

No tocante à fauna de flebotomíneos de São Gabriel da Cachoeira, não se pode deixar de mencionar que estudos prévios já descreveram parte da fauna local, com a identificação de espécies já conhecidas e até de novas espécies de flebotomíneos (Fé *et al.*, 1998).

Corroborando com estes estudos prévios, nossos resultados vêm não só confirmar a importância epidemiológica de algumas espécies de flebotomíneos encontradas na fauna de São Gabriel da Cachoeira, tais como: *L. ayrozai*, *L. davisii*, *L. flaviscutellata*, *L. shannoni*, *L. anduzei*, *L. scaffii*, *L. yuilli*, *L. tuberculata*, *L. umbratilis*, *L. paraensis*, *L. olmeca nociva*, *L. gomezi*; como também, demonstrar a grande diversidade de espécies locais, num total de 50, identificadas.

Em relação ao encontro de um número bem representativo de espécies do Gênero *Lutzomyia*, que possui as espécies vetoras das leishmanioses, o município de São Gabriel se assemelha a outras regiões do Estado. Das 330 espécies identificadas, aproximadamente 122 (36,9%) são encontradas na região Amazônica; destas, 25 (20,5%) apresentam características antropófilas (Rebêlo *et al.* 1996, Dias-Lima *et al.* 2002).

Os subgêneros *Psathyromyia*, *Psychodopygus* e *Nyssomyia* apresentam as espécies mais abundantes e também os mais importantes vetores de *Leishmania* na Região Amazônica (Ward *et al.* 1973, Grimaldi *et al.* 1991, Rangel e Lainson 2003) o que foi confirmado no presente estudo.

As espécies *L. ayrozai*, *L. paraensis* e *L. davisii*, presentes nestas coletas, são incriminadas como vetoras de *L. (V.) naiffii* que é encontrada naturalmente em tatu (*Dasypus novemcinctus*) [Lainson e Shaw, 1989, Dias-Lima *et al.* 2002] e pouco frequente no homem (Lainson e Shaw, 1992).

Figueira *et al.* (2008), analisando 23 amostras isoladas de lesões de pacientes provenientes dos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva, AM, pela análise de eletroforese de isoenzimas em gel de agarose, verificaram que 18 eram da espécie *L. (V.) guyanensis* e cinco de *L. (V.) naiffii*, sendo 10 casos de *L. (V.) guyanensis* e três de *L. (V.) naiffii*, no município de Manaus, e oito de *L. (V.)*

guyanensis e dois de *L. (V.) naiffi*, em Rio Preto da Eva, demonstrando a ocorrência destas espécies nestes municípios. É provável que *L. (V.) naiffi* possa também produzir uma infecção benigna e oculta na pele humana e que a transmissão no Amazonas seja mais frequente do que se tem observado (Figueira *et al.* 2008).

Em relação a *L. davisii*, que também está envolvida na transmissão de *L. (V.) braziliensis*, que é a espécie responsável pela maioria dos casos de LC humana no Brasil (Oliveira *et al.* 2004), sua ocorrência já foi registrada em países vizinhos ao Brasil como Venezuela e Colômbia (Cabrera *et al.* 2009).

Nas áreas da Serra dos Carajás, no estado do Pará, Souza *et al.* (2010) observaram esta espécie naturalmente infectado por *L. (V.) braziliensis*. Apesar de ser uma zoonose originalmente silvestre, a LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* tem sido descrita por diversos autores ocorrendo em ambientes domésticos, tendo sido levantada a possibilidade de que animais domésticos e peridomésticos, e em especial o cão, estariam funcionando como importantes fontes de infecção neste local (Reis *et al.* 2010, Falqueto *et al.* 1986, Marzochi e Marzochi, 1994).

As espécies *L. dendrophyla* e *L. shannoni*, têm sido associadas com a transmissão de *Endrotrypanum schaudinni*, flagelado encontrado em preguiças (Shaw 1991, Arias *et al.* 1985, Franco *et al.* 1997, Freitas *et al.* 2002). *L. shannoni* é amplamente distribuída pelas Américas do Sul e Norte (Fé *et al.*, 1998). Alguns autores indicam que em estudos de laboratório pelo menos três espécies de *Leishmania* podem desenvolver-se em *L. shannoni*: *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) chagasi* (Ferro *et al.* 1998).

Lutzomyia shannoni alimenta-se de mamíferos, incluindo o homem, e têm sido envolvida na transmissão de Leishmaniose Visceral em cães, animais de

laboratório e outros mamíferos (Young e Arias, 1992, Travi *et al.* 2002, Shantz, 2007).

A coleta da espécie *L. flaviscutellata* que apesar de possuir baixa antropofilia e atividade essencialmente noturna em ambientes silvestres e de várzea (Ward *et al.* 1978, Lainson e Shaw, 1979, 1987; Shaw *et al.* 1972, Shaw e Lainson, 1987) reveste-se de importância epidemiológica, por estar envolvida no Brasil, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Peru, Equador e Bolívia na transmissão de *L. (L.) amazonensis* considerada a segunda espécie *Leishmania* de maior notificação nos Estados brasileiros (Lainson e Shaw, 1974, Gil *et al.* 2003, Wolf *et al.* 2003, Souza *et al.* 2010) e que causa a LC e, raramente, a forma cutânea difusa em humanos (Lainson e Shaw, 1974).

A espécie *L. umbratilis*, principal vetora na Região Amazônica (ao norte do Rio Amazonas) de *L. (V.) guyanensis*, foi pouco frequente em nossas coletas, corroborando com Fé *et al.* (1998). *L. (V.) guyanensis*, agente etiológico da LC, que é caracterizada por lesões múltiplas (Ward e Fraiha, 1977), em diversos estudos têm alcançado destaque epidemiológico ao norte do Rio Amazonas, nos estados do Pará (Lainson *et al.* 1976, 1979, 1981) e Amazonas, Brasil (Arias e Freitas, 1977, 1978, Arias *et al.* 1981), na Guiana Francesa (Gentile *et al.* 1981, Pajot *et al.* 1982) e na Venezuela (Felicangeli *et al.* 1985).

Ao contrário de *L. umbratilis* a espécie *L. anduzei*, vetor secundário desta leishmânia (Arias e Freitas, 1977), apresentou um número elevado de indivíduos neste estudo. Silva *et al.* (2007) trabalhando nas áreas do município de Manacapuru, AM, região localizada as margens do Rio Solimões, apresentou resultados semelhantes em que *L. umbratilis* também teve densidade inferior à de *L. anduzei*.

Outras espécies com densidade baixa merecem destaque por serem incriminadas como transmissoras de *Leishmania* em outros países, como é o caso de *L. yuilli* que tem um comportamento antropofílico e adapta-se bem em ambientes domiciliares na Colômbia e na América Latina, esse flebotomíneo é incriminado como vetor de *L. (V.) panamensis* (Santamaria *et al.* 2006), e *L. gomezi* que apresenta um comportamento tanto antropofílico como endofílico, devido a isto, é considerada como provável transmissora em várias regiões endêmicas de LC na Colômbia e, também foi encontrada infectada naturalmente no Panamá e Equador (Johnson *et al.*, 1963, Gómez e Hashiguchi, 1987). Rodriguez *et al.*, (1999) utilizando técnicas moleculares detectaram *L. gomezi* infectada por *L. panamensis* na Venezuela.

5. CONCLUSÃO

A leishmaniose constitui, sem dúvida alguma, um grande problema de saúde pública, principalmente na Amazônia, pois é grande o número de pessoas infectadas por este mal que tanto preocupa os profissionais da área da saúde.

Até o momento, este trabalho foi pioneiro na avaliação da problemática da LTA, assim como o conhecimento dos seus potenciais flebotomíneos vetores circulando no município de São Gabriel da Cachoeira. Por fazer fronteira com os países da Colômbia e Venezuela, esta região torna-se uma porta de entrada de novos patógenos da doença. Um problema observado em São Gabriel da Cachoeira, o qual estar presente também em outras cidades do país é a subnotificação dos dados da doença.

Em relação aos vetores foi constatada a presença das seguintes espécies: *L. ayrozai*, *L. davisii*, *L. flaviscutellata*, *L. shannoni*, *L. anduzei*, *L. scaffii*, *L. yuilli*, *L. tuberculata*, *L. umbratilis*, *L. paraensis*, *L. olmeca nociva*, *L. gomezi*. Não obstante, algumas espécies são incriminadas como potenciais vetores nos países vizinhos Colômbia e Venezuela, como *L. gomezi*, *L. scaffii* e *L. yuilli*.

É sabido que cada mudança ambiental seja pelo fenômeno natural ou intervenção humana, poderá alterar o equilíbrio ecológico das doenças que tem insetos como vetores.

São Gabriel da Cachoeira é o município que concentra a maior população indígena nacional, e com isso, devido aos conhecimentos empíricos de algumas etnias, o tratamento da LTA fica restrito à cultura do povo da floresta. Às vezes recorrendo à terapêutica por fármacos quando a evolução da doença atinge pontos críticos.

Tabela 2. Espécies de flebotomíneos comprovadamente e/ou suspeitas na transmissão de tripanossomatídeos já descritos na literatura.

VETOR/ SUSPEITO	DISTRIBUIÇÃO	PARASITOS IDENTIFICADOS	REFERÊNCIAS
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	Brasil	<i>Leishmania (Viannia) naiff</i>	Arias <i>et al.</i> , 1985; Lainson e Shaw, 1989; Lainson <i>et al.</i> , 1990; Rebelo e Oliveira-Pereira, 2001
<i>L. dendrophyla</i>	Brasil	<i>Trypanosoma</i> spp. <i>L. (V.) guyanensis</i>	Ryan <i>et al.</i> , 1987; Franco (dados não publicados)
<i>L. davis</i>	Brasil	<i>L. (V.)</i> sp; <i>L. (V.) naiffi</i> ; <i>L. (V.) braziliensis</i>	Lainson e Shaw, 1987; Lainson e Shaw, 1989; Lainson <i>et al.</i> , 1990; Souza <i>et al.</i> , 2010
<i>L. shannoni</i>	Panamá	FNI	Johnson <i>et al.</i> , 1963;
	Costa Rica	FNI	Zeledón e Alfaro, 1973;
	Brasil	<i>Endotrypanum schaudinni</i>	Arias e Freitas, 1978; Arias <i>et al.</i> , 1985; Franco e Grimaldi, 1999;
	México	<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	Pech-May <i>et al.</i> , 2010;
	Estados Unidos	FNI	Perkis, 1982
<i>L. gomezi</i>	Colômbia e Venezuela	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Feliciangeli <i>et al.</i> , 1994; Feliciangeli <i>et al.</i> , 1994;
<i>L. flaviscutellata</i>	Colômbia e Brasil, Venezuela	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Lainson e Shaw, 1968; Ward <i>et al.</i> , 1973; Arias <i>et al.</i> , 1987, 1985; Ryan <i>et al.</i> , 1987;
<i>L. anduzei</i>	Brasil e Colômbia	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Lainson <i>et al.</i> , 1979; Franco <i>et al.</i> , 2000
		<i>Trypanosoma</i> spp.	Ryan <i>et al.</i> , 1987;
<i>L. chagasi</i>	Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela	<i>Leishmania</i> (complexo <i>braziliensis</i>)	Young e Duncan, 1994;
<i>L. olmeca nociva</i>	Colômbia e Venezuela	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Young <i>et al.</i> , 1987; Travi <i>et al.</i> , 1988;
		<i>L. (L.) mexicana</i>	

Continuação: Tabela 2. Espécies de flebotomíneos comprovadamente e/ou suspeitas na transmissão de tripanossomatídeos já descritos na literatura

VETOR/ SUSPEITO	DISTRIBUIÇÃO	PARASITOS IDENTIFICADOS	REFERÊNCIAS
<i>L. scaffii</i>	Brasil	<i>Endrotrypanum</i> sp.	Arias <i>et al.</i> , 1985
<i>L. umbratilis</i>	Colômbia	<i>L. guyanensis</i>	Bonfante-Garrido, 1980;
	Venezuela	<i>L. guyanensis</i>	Lainson <i>et al.</i> , 2010
<i>L. sordeli</i>	Brasil	<i>Trypanosoma</i> spp	Arias e Freitas, 1978;
	Brasil	<i>Leishmania</i> spp	Oliveira <i>et al.</i> , 2011; Guimarães, 2011; Gil <i>et al.</i> , 2003
<i>L. amazonensis</i>	Brasil	<i>L. (V.) brasiliensis</i>	Lainson e Shaw, 1973; 1979; Fraiha <i>et al.</i> , 1980
<i>L. yuilli</i>	Colômbia	<i>L. (V.) panamensis</i>	Lainson e Shaw, 1972; Santamaria <i>et al.</i> , 2006
	Brasil	<i>Leishmania</i> sp.	Lainson e Shaw, 1979; 1987
<i>L. tuberculata</i>	Brasil	<i>L. (V.) guyanensis</i> , FNI	Braga <i>et al.</i> , 2003, Lainson e Shaw, 1987
		<i>L. (V.) utingensis</i>	Killick-kendrick, 1990
<i>L. furcata</i>	Brasil	<i>L. (L.) deanei</i>	Lainson e Shaw, 1979; Miles <i>et al.</i> , 1980
<i>L. paraensis</i>	Brasil	<i>Leishmania</i> sp.;	Lainson e Shaw, 1979; Lainson <i>et al.</i> , 1973; Deane e Lainson, 1985
		<i>L. (V.) naiffi</i>	
		<i>L. (V.) braziliensis</i>	
<i>L. walker</i>	Brasil	<i>Leishmania</i> spp.	Guimarães, 2011
<i>L. spathotrichia</i>	Brasil	FNI	Nery <i>et al.</i> , 2004

FNI = flagelados não identificados

6. REFÊRENCIAS

- Arias, J.R. & R.A. Freitas. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 1. Preliminary Findings. *Acta Amazon.* 1977, 293-294.
- Arias, J.R.; Miles, M.A.; Naiff, R.D.; Popova, M.M.; Freitas, R.A.; Biancardi, C.B.; Castellon, E.G. Flagellates infections of Brazilian sandflies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* e *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 1985; 34:1098 -1108.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1269–128.
- Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana– Diagnóstico Clínico e Diferencial*. Brasília/DF, 2007. 136 p.
- Cabrera, M, Ostrowicz, CW, Mari, M, LaGrassa, TJ, Roggiori F. C. Ungermann. Vps41 phosphorylation and the Rab Ypt7 control the targeting of the HOPS complex to endosome-vacuole fusion sites. *Mol. Biol. Cell.* 2009, 20:1937–1948.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology e Infectious Diseases* 2004; 27: 305-18.
- Dias-Lima A, Bermudez EC, Medeiros JF, Sherlock I. Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Cadernos Saúde Pública* 2002; 18: 823-32.
- Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi G, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1986; 81:155-163.
- Falqueto A, Sessa P A, Ferreira A L, Vieira V P, Santos C B, Varejão J B M, Cupolillo E, Porrozzi R, Carvalho-Paes L E, Grimaldi Jr G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and

mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 1003-1010

Fé NA, Freitas RA, Barrett TB. Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia (Psychodopygus) douradoi* n.sp. (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1998; 93 (3): 331-336.

Freitas, RA.; Naiff, RD.; Barret, TV. Species Diversity and Flagellate Infections in the Sand Fly Fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002; 97: 53-59.

Ferro C, Cardenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann LE. 1998. Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1998; 93: 195-199.

Figueira, P.L, Zanotti, M. Pinheiro, FG. Franco, AMR. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília 2008; v. 41, n. 5, p. 512-514.

Gentile, B., Le Pont, F., Pajot, F. X. & Besnard, R. Dermal leishmaniasis in French Guiana: the sloth (*Choloepus didactylus*) as a candidate reservoir host. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1981, 75, 612-613.

Gil, L.H.S., S.A. Basano, A.A. Souza, M.G.S. Silva, I. Barata, E.A. Ishikawa, L.M.A. Camargo & J.J. Shaw. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: The importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003, 98: 751-755.

Grimaldi Jr G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. American Journal of Tropical Medicine Hygiene 1991; 44: 645 -661.

Guerra, J.A.O.; Prestes, S.R.; Silveira, H.; Coelho, L.I.D.A.R.C.; Gama, P.; Moura, A.; Amato, V.; Barbosa, M.G.V.; Ferreira, L.C.L. 2011. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLoS Neglected Tropical Diseases 2011; 5: e 980.

Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, Barbosa MG, Paes MG. Epidemiologia da

leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. Cadernos Saúde Pública 2006; 22: 2319-2327.

Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MB, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES; Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Tropica 2002; 81: 143-150.

IBGE, 2010. Site do IBGE/geociências <http://www.ibge.gov.br>, acesso em 20 de maio de 2012.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. Trans R Soc Trop Med Hyg 1976, 70: 171-172.

Lainson, R. e Shaw, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Biology of the Kinetoplastida (W. H. R. Lumsden & D. A. Evans, ed.) 1979, v. 2, pp. 1-116.

Lainson R, Shaw JJ, Póvoa M. The importance of edentates (sloths and anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of "pian-bois" in North Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981, 75(4):611-2.

Lainson R, Shaw, J.J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. N., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brasil. Ann. Parasitol. Hum. Comp 1989; 64: 3-9.

Lainson, R.; Shaw, J. J. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1992; v. 87, n. 3, 437-439.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania b. braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 1986; 28: 253-262.

Martins, L. M. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cad. Saúde Pública* [online]. 2004, vol.20, n.3, pp. 735-743.

Marsden PD. Mucosal Leishmaniasis (Espundia Escomel,1911). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1986; 80: 859-876.

Marzochi MCA, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* 1994; 10:359-375.

Maywald PG, Machado MI, CRUZ JMC, Pires MRFG. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 1996; v.12, n.3, p.321-328.

Naiff RD, Talhari S, Barrett TV. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 529-530.

Naiff, M.F. Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. Tese de mestrado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ, 1998. 60 p.

Nunes, C. M.; Dias, A. K. K.; Gottardi, F. P.; Paula, H. B.; Azevedo, M. A. A.; Lima, V. M. F.; Garcia, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da Leishmaniose visceral em sangue de cães. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 330.

Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp. in sand flies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006. 39:540-3.

Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (viannia) Panamensis* in Colombia: clinical characteristics Am. J. Trop. Med. Hyg 1998; 59: 4952.

Paes MG, Barros MLB, Toledo LM. Considerações sobre a produção da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Amazonas. In: Iñiguez-Rojas LB, Toledo LM. *Espaço e Doença, Um olhar sobre o Amazonas*. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 1998. p. 1-8.

Pajot FX, Le Pont F, Gentile B, Besnard R. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982, 76:112-3.

Pinheiro, FG. Infecção natural em *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward e Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.p 2004.

Pinheiro, F.G.; Luz, S.L.B.; Franco, A.M.R. Infecção natural por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de Leishmaniose Tegumentar Americana no Amazonas, Brasil. Acta Amazônica 2008; 38: 165-172.

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

Rebêlo JMM, Mendes WA, Costa JML, Cavaleiro N. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia* França 1924 (Psychodidae: Phlebotominae) do estado do Maranhão, Brasil. Cad Saude Publica 1996; 12: 545-549.

Reis, S. R.; Franco, A. M. R. A Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Amazonas, Brasil: Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Canina. Revista CFMV (Brasília) 2010; v. 50, p. 35-39.

Romero, GA, Ishikawa, E, Cupolillo, E, Toaldo, CB, Guerra, MV, Paes, MG. Therarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus

region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2002. 96:131–6.

Romero GA, de la Gloria Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macedo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 2005. 93: 49-56.

Santrich, C; Segura, I; Arais, AL; Saraiva, NG. Mucosal disease caused by *Leishmania brasiliensis guyanensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1990. 42, 51-55.

Saraiva, L., J.S. Lopes, G.B.M. Oliveira, F.A. Batista, A.L. Falcão e J.D. Andrade Filho. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.* 2006. 39: 56-63.

Shaw, J. J. & R. Lainson. 1972. Leishmaniasis in Brazil: IV. Observations on the seasonal variation of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1972, 66: 709–717.

Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology: New World. *In The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, W Peters, R Killick-Kendrick,(eds), Academic Press, London, 1987, p. 291-363.

Shaw J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007. 102: 541-547.

SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação 2011: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> (acesso 12 Junho de 2012).

Silva D. F.; R. A. Freitas & A. M. Franco. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. *Neotropical Entomology* 2007, 36: 138-144.

Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera:

Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009. 104: 1181-1182.

Souza AAA, Silveira FT, Lainson R, Barata IR, Silva MGS, Lima JAN, *et al.* Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010,1(1):45-51.

Talhari S, Arias JR, Cunha MGS, Naiff RD, Naiff MF, Freitas RA, Barrett TV. Leishmaniose no Estado do Amazonas – Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. *An Bras Dermatol* 1988; 63:433-438.

Travi BL, Alder GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forest in northern Colombia. *J Med Entomol* 2002, 39: 451-456.

Ward RD, Shaw JJ, Lainson R, Fraiha H. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotomine fauna of an area of highly endemic cutaneous leishmaniasis in the Serra dos Carajás, Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1973; 67:174-183.

Ward RD, Fraiha H 1977. *Lutzomyia umbratilis* n. sp. A sandfly previously identified as *L. anduzei* (Rozeboom, 1942) (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1977, 14: 313-317.

Wolff, M., D. Sierra, L.M. Murcia & I.D. Vélez. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Department of Amazonas, Colombia. *Neotrop. Entomol.* 2003. 32: 523-526.

Young, D. G.; Arias, J. R. Flebotomíneos vectores de leishmaniasis en las Americas. OPAS, Caderno Técnico 1992 (3). 28pp.

Young, D.G.; Duncan, M.A. Guide of the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomo Inst* 1994; 54:1-881.

6. CAPÍTULO III

PRIMEIRO REGISTRO DE *LUTZOMYIA (TRICHOPYGOMYIA) CONVITI* (DIPTERA: PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) NO BRASIL, COLETADO EM SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, ESTADO DO AMAZONAS.

SCIENTIFIC NOTE

PRIMEIRO REGISTRO DE *LUTZOMYIA (TRICHOPYGOMYIA) CONVITI* (DIPTERA: PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) NO BRASIL, COLETADO EM SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, ESTADO DO AMAZONAS.

Francimeire Gomes Pinheiro, Rui Alves de Freitas, Liliane Coelho da Rocha e
Antonia Maria Ramos Franco

Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, no. 2936, CP 478, 69011970, Manaus, AM
meireg@inpa.gov.br, afranco@inpa.gov.br

FIRST RECORD OF *LUTZOMYIA (TRICHOPYGOMYIA) CONVITI* (DIPTERA: PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) FROM BRAZIL, COLLECTED IN SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, AMAZONAS STATE.

ABSTRACT - During 2007 and 2008, experiments were carried out in São Gabriel da Cachoeira municipality, Amazonas State, to investigate the phlebotomine sandflies fauna and the natural infection to protozoa of the genus *Leishmania* using CDC light traps. Of the 229 species of *Lutzomyia* already registered in Brazil and the 44 species identified from São Gabriel da Cachoeira, *Lutzomyia conviti* Ramírez Pérez, Martins & Ramírez 1976, was recorded for the first time in this region and in Brazil, thus increasing the diversity of phlebotomine sandflies fauna. The new registered specie of both sexes and distribution is shown and discussed herein.

KEY WORDS: *Lutzomyia conviti*, sandfly, first Record, Phlebotominae, São Gabriel da Cachoeira

RESUMO - Durante os anos de 2007 e 2008 foram realizados experimentos no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, para investigar a fauna de flebotomíneos e a infecção natural para protozoários do gênero *Leishmania*, utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC. Das 229 espécies do gênero *Lutzomyia* já registradas no Brasil e entre as 44 identificadas no município de São Gabriel da Cachoeira, *Lutzomyia conviti* Ramírez Pérez, Martins & Ramírez 1976, foi registrada pela primeira vez nesta região e no Brasil, aumentando a diversidade da fauna de flebotomíneos. A espécie é relatada como sendo o primeiro registro de ambos os sexos e sua distribuição é citada e discutida.

PALAVRAS-CHAVE: *Lutzomyia conviti*, flebotomo, primeiro registro, Phlebotominae, São Gabriel da Cachoeira

Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia* França 1924 é o de maior número de espécies e de ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o Norte da Argentina. Em todo o mundo são conhecidas, aproximadamente, 800 espécies de flebotomíneos, sendo 60% na região Neotropical. Das mais de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas, pouco mais de 400 pertencem ao gênero *Lutzomyia*, o qual é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (Rebelo 1999, Young & Duncan 1994, Gil *et al* 2003).

No Brasil, tem-se conhecimento, até o momento, de 229 espécies, representando 28,6% do total e 47,7% das que ocorrem na região Neotropical (Rebelo 1999, Gil *et al* 2003, Aguiar & Medeiros 2003, Andrade 2007). Da maioria de espécies de flebotomíneos registrada em nosso território, cerca de aproximadamente 52% já foram registradas na Amazônia (Arias & Freitas 1977, Rangel & Lainson 2003).

Segundo dados de 2003 do Ministério da Saúde têm sido registrados por ano no Brasil cerca de 33 mil casos de Leishmaniose Tegumentar Americana, zoonose endêmica no norte do Brasil, que tem diversas espécies de flebotomíneos vetores desta doença. Na Região Amazônica, a enfermidade vem aumentando gradativamente, principalmente relacionada com o desmatamento e as invasões.

A região norte do Brasil apresenta 166 registros de espécies de flebotomíneos sendo 64 endêmicas (Young & Duncan 1994). Para o subgênero *Trichopygomyia* do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) são registradas no estado do Amazonas, quatro espécies, *L. dasipodogeton*, *L. longispina*, *L. rondoniensis* e *L. wagleiy* (Castellon *et al* 1994).

A *Lutzomyia (Trichopygomyia) conviti* Ramírez Pérez, Martins & Ramírez 1976 tem sua distribuição conhecida para a Venezuela e Colômbia. No Brasil esta espécie ainda não havia sido identificada. Embora não esteja relacionado à transmissão de leishmanioses no Brasil o presente trabalho tem por objetivo acrescentar a espécie *L. conviti* à fauna flebotomínica do estado do Amazonas, como sendo também o primeiro relato no Brasil.

Os espécimes foram capturados no Km 15 da BR 307 que liga São Gabriel à Cucui (00° 04'196 S e 067° 00' 091 W), município de São Gabriel da Cachoeira, Estado do Amazonas, em armadilha luminosa (CDC "miniature" – Center of Disease Control, Hausherr Machine Works, New Jersey, EUA), colocadas no período noturno, cerca de 30 cm do chão no horário de 18h às 7 h do dia seguinte, em área de vegetação primária em floresta de terra firme. Um total de 124 indivíduos foi capturado nos meses de julho, agosto e outubro de 2007 e julho de 2008 em estrada de terra batida, com domicílios num raio de 2 km, local este onde houve registros de casos de leishmaniose tegumentar humana. O clima da região é tropical quente com índice de precipitação anual em torno de 2.884 mm numa altitude de 90 m (Ribeiro *et al* 1996). Os insetos capturados foram levados ao laboratório onde os flebotomíneos passaram por processo de triagem, sendo então montados em lâminas, segundo Barreto & Coutinho (1940) e identificados segundo critérios taxonômicos propostos por Young e Duncan (1994). Do total de *L. conviti* capturadas, 118 (♀52 e ♂66) foram nos meses de 2007 e o restante 24 (♀02 e ♂04) no ano de 2008. Os espécimes foram depositados na coleção de Invertebrados para Phlebotominae do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus, Amazonas, Brasil.

A espécie *Lutzomyia (Trichopygomyia) conviti* foi descrita pela primeira vez por Ramirez Pérez, Martins e Ramirez em 1976 na Venezuela e Colômbia (Feliciangeli 1983, Bejarano 2003). Os autores relatam a ocorrência desta espécie no Estado de Meta na Colômbia e no Território Nacional Amazonas na Venezuela. Holótipos e alótipos de *L. conviti* foram coletados em tocas a 100 m a s.l. Ocamo, Atabapo, Território Federal Amazonas na Venezuela pelos autores (Ramirez-Perez *et al* 1976, Arias *et al* 1983). Esta espécie tem sido encontrada na bacia amazônica em áreas de planície associada com tocas de animais (Feliciangeli 1989).

Lutzomyia conviti tem sido encontrada frequentemente em estudos da fauna flebotomínica em países vizinhos (Feliciangeli 1989, Bejarano 2003) e o registro da espécie no estado do Amazonas foi tardio, possivelmente pelos poucos estudos realizados nesta área fronteira do Brasil (município de São Gabriel da Cachoeira). Esses registros de ocorrência aumentam a área de distribuição dessas espécies, além de ser o primeiro registro de ocorrência da espécie para o país.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos, Lourival Maciel Castro, Francisco Lima Santos e Artêmio Coelho da Silva do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas - INPA, pelo apoio nas coletas de campo. Este trabalho recebeu o apoio financeiro do INPA, do projeto Fronteiras FINEP/INPA e do projeto Universal do CNPq.

Referências

- Aguiar, G. M. & W. M Medeiros. 2003. Distribuição Regional e Hábitats das Espécies Flebotomíneos do Brasil. In: Elizabeth Ferreira Rangel; Ralph Lainson. (Org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 207-255.
- Andrade-Filho, J. D., G. D. Souza, A. L. Falcão. 2007. Description of a new phlebotomine species, *Evandromyia gaucha* sp. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), from Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102 (6): 737-40.
- Arias, J. R. & R. A. Freitas. 1977. Flebótomos da Amazônia Central do Brasil. I - Resultados obtidos das capturas feitas com iscas humana e equina (Diptera: Psychodidae). Acta Amazônica. 7: 507-27.
- Arias, J. R., P. D. Ready & R. A. Freitas. 1983. A review of the subgenus *Trichopygomyia* Barretto, 1962; with description of a new species from the Brazilian Amazon basin (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 78 (4): 449-472.
- Barreto, M. P. & J. O. Coutinho. 1940. Processos de captura, dissecação e montagem de flebótomos. Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo. 16: 173-187.
- Bejarano, E. E. 2006. Lista actualizada de los Psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Folia Entomologica Mexicana. 45 (1): 47-56.
- Castellon, E.G., J. R. Arias, R. A. Freitas & R. D. Naiff. 1994. Os flebotomíneos da região Amazônica, Estrada Manaus - Humaitá, Estado do Amazonas, Brasil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Acta Amazônica. 24(1/2): 91-102.
- Feliciangeli, M.D. 1989. Taxonomy and distribution of Phlebotomine sandflies in Venezuela: II. The Subgenus *Trichopygomyia* of the Genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 84 (4): 557-562.

- Gil, L. H. S., S. A. Basano, A. A. Souza, M. G. S Silva, I. Barata, E. A Ishikawa, L. M. A. Camargo. 2003. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 98: 751-5.
- Martins, A. V., A. L. Falcão, J. E. Silva & R. M. Filho. 1983. Nota sobre *Lutzomyia* (*Trichopygomyia*) *dasypodogeton* (Castro, 1939), com a redescrição do macho e da fêmea (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 78 (2): 223-230.
- Ramirez-Perez, J., A. V. Martins & A. Ramirez. 1976. *Lutzomyia conviti* n. sp. de flebotomíneo da Venezuela (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Revista Brasileira de Biologia. 36(3): 599-603.
- Rangel, E.F. & R. Lainson. 2003. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 368p.
- Rebelo, J. M. M., J. A. C. Araújo, M. L. Carvalho, V. L. L. Barros, F. S. Silva & S. T. Oliveira. 1999. Flebótomos (Diptera: Phlebotominae) da Ilha de São Luis, Zona do Golfão Maranhense, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 32: 247-253.
- Ribeiro, A., R. L. Victoria, A. R. Pereira, N. A. Villa Nova, L. A. Martinelliz, & J. Mortattii. 1996. Análise do regime pluviométrico da região Amazônica a partir de dados de onze localidades. Revista Brasileira de Meteorologia. 1(112): 25-35.
- Young, D.G. & M. A. Duncan. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Florida, Memoirs of the American Entomological Institute 54, Associated Publishers, 881p.

7. CAPÍTULO IV

DETECÇÃO DA INFECÇÃO NATURAL POR *LEISHMANIA* SP EM FLEBOTOMÍNEOS PELA REACÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA.

DETECÇÃO DA INFECÇÃO NATURAL POR *LEISHMANIA* SP EM
FLEBOTOMÍNEOS UTILIZANDO A TÉCNICA DA REACÇÃO DA
POLIMERASE EM CADEIA

Francimeire G. Pinheiro^I, Sérgio Luiz Bessa Luz^{II}, José M. Rubio^{III}, Edgar da Silva
Pereira^I, Antonia M.R. Franco^I

^ICoordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto de Pesquisas da Amazônia. 69083-000 Manaus, AM, Brasil.

^{II}Laboratório de Biodiversidade do CPqL & MD - FIOCRUZ/AM.

^{III} Laboratorio de malaria y otras parasitosis emergentes. Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos, Madri, Espanha III.

RESUMO

A técnica normalmente utilizada para o diagnóstico de infecção natural em flebotomíneos é a dissecação do aparelho digestório e a visualização dos flagelados ao microscópio óptico. Todavia, este método comumente empregado nesta investigação é penoso e demorado. Visando superar as dificuldades encontradas nas técnicas convencionais, métodos moleculares são desenvolvidos para a detecção de patógenos, inclusive na avaliação da infecção natural em flebotomíneos. Este estudo teve como objetivo utilizar a técnica de Nested-PCR (LN-PCR) tendo como alvo o gene de mini-éxon. Os flebotomíneos utilizados foram coletados em dois municípios do estado do Amazonas, locais que apresentam características distintas quanto à leishmaniose. Os municípios estudados foram Manaus e São Gabriel Cachoeira, que apresentam alta e baixa incidência da doença, respectivamente. Várias cepas de referência de espécies da família Trypanosomatidae, foram utilizadas, como controle positivo da reação para averiguar a especificidade dos iniciadores. Ensaios com diferentes concentrações de parasitos também foram feitos para avaliar a sensibilidade do método. Pelo Ln-PCR foi possível diferir entre as diversas espécies de tripanossomatídeos testados. Em relação à sensibilidade da técnica houve amplificação do DNA numa concentração mínima de 40 promastigotas/uL de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e de *L. (Leishmania) amazonensis*. A taxa de infecção natural na Base BI1 em Manaus foi de 46,11% (332/720) e os resultados foram negativos para infecção natural por *Leishmania* nos 470 espécimes de flebotomíneos capturados no município de São Gabriel da Cachoeira. O fato da ocorrência de infecção natural por *Leishmania* não é suficiente para afirmar a participação de uma espécie como vetor no ciclo de transmissão das leishmanioses. Do mesmo modo ausência de detecção de infecção nestes insetos, devido à reduzida taxa de infecção natural também não ser suficiente para indicar a não circulação do patógeno no local. O método demonstrou ser útil na detecção de infecção natural por parasitos do gênero *Leishmania*, possibilitando discriminar representantes de seus subgêneros e de outros tripanossomatídeos.

Palavras-chaves: Epidemiologia molecular, Nested-PCR, Marcadores moleculares.

1. INTRODUÇÃO

O incremento das doenças infecciosas emergentes e reemergentes têm intensificado a necessidade de modalidades de diagnóstico mais rápido e sensível (ERLICH et al., 1991). Vários métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção de patógenos infecciosos, visando superar as dificuldades encontradas nos métodos convencionais (MULLIS e FALLONA, 1987; SHAHBAZI et al., 2008).

As abordagens moleculares recentemente permitiram o diagnóstico de doenças infecciosas baseado na reação da polimerase em cadeia (PCR). Esta metodologia tem permitido a identificação de várias espécies de parasitos (OSKAM et al, 1996; AREZ et al., 2000; MONTENEGRO, 2004) e pode ser útil na detecção de *Leishmania*, agente etiológico da Leishmaniose (CABRERA et al., 2002; PAIVA et al., 2006; TOLEDO et al., 2008; BACHA et al., 2011). A técnica pode ser usada para o diagnóstico em humanos (RODGERS et al., 1990; CUPOLLILO et al., 1997; SILVA et al., 2002), cães (ANDRADE et al., 2006; REIS et al., 2011) e flebotomíneos (PINHEIRO, 2004; KATO et al., 2005, 2008, 2011; PAIVA et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Nos tripanossomatídeos, ao contrário da maioria dos eucariotos, os genes são transcritos policistronicamente e os pré-mRNA individuais são processados a partir da adição de uma seqüência conservada de RNA na sua extremidade 5'. Esta seqüência é denominada de *spliced leader* (SL) ou mini-éxon (Fig. 1), o qual contém 39 nucleotídeos que é transcrito através da ação da RNA polimerase II e, em seguida, adicionada ao pré-mRNA numa reação chamada de *trans-splicing* (BARKER, 1987; FERNANDES et al., 1994). Entre os vários marcadores do DNA nuclear e kDNA (DNA do cinetoplasto) utilizados no diagnóstico da leishmaniose

(PAIVA et al., 2006; ROTEUREAU et al., 2006), o gene mini-éxon é altamente específico e sensível, está presente no genoma das leishmânias, mas ausente nos mamíferos e flebotomíneos (DONELSON e ZENG,1990; FERNANDES et al., 1994; SAKI et al., 2011).

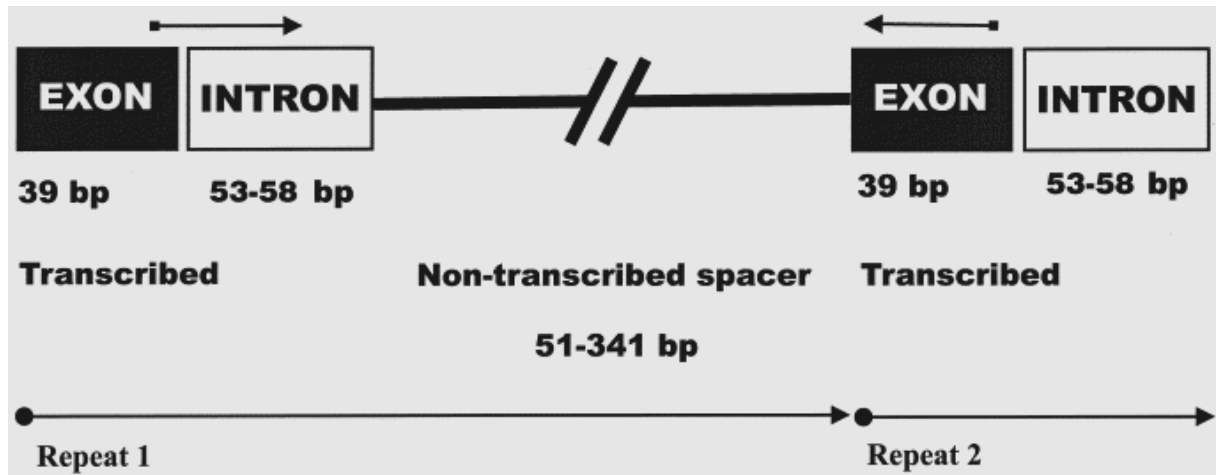


Figura 1. Gene de mini-éxon de *Leishmania*. Cada repetição contém éxon altamente conservado (39 pb), uma região moderadamente variável de íntrons (55-101 pb), e uma sequência de espaçador altamente variável não transcrita (51 a 341 pb). Fonte: Marfurt et al., 2003.

A investigação da infecção em flebotomíneos por *Leishmania* normalmente é avaliada através da dissecação do trato digestório do inseto. No entanto, esse procedimento consome tempo e requer grande habilidade técnica, além do agravante em relação ao tamanho do inseto, o qual pode variar de 1,5 a 3 mm, dependendo da espécie (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006; PINHEIRO et al., 2008).

A Introdução de ferramentas moleculares na avaliação da infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos capturados no campo ainda é escassa no Brasil. Uma variação da PCR, conhecida como Nested-PCR (Ln-PCR), no qual utiliza dois

conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subsequentes, cujo produto de amplificação da primeira reação é utilizado como molde para a segunda. Essa técnica é proposta para a detecção de *Leishmania* nos casos que necessitam de alta especificidade e sensibilidade (PARVIZI et al., 2005; AKHAVAN et al., 2010). Devido a isto, o propósito deste estudo foi de utilizar a técnica de Ln-PCR na detecção de infecção de *Leishmania* em flebotomíneos utilizando o gene de mini-éxon como alvo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Etapas primordiais foram executadas para desenvolver a padronização da reação de PCR. A primeira foi a confirmação das espécies de tripanossomatídeos por análise bioquímica (eletroforese de isoenzimas), utilizadas nos controles da especificidade, utilização dos controles quanto a concentração mínima requerida para a positividade da PCR (sensibilidade), obtenção dos controles com DNA obtidos de flebotomíneos e por fim a detecção de infecção natural pela LN-PCR (CRUZ et al., 2002) com flebotomíneos capturados em áreas endêmica e não endêmica para avaliação da taxa de infecção por *Leishmania*.

2.1- *Parasitos*: Os iniciadores foram testados com as seguintes cepas de Tripanossomatídeos: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); *L. (L.) deanei* (MCOE/BR/00/M5088), *L. (Viannia) guyanensis* MHOM/BR/92/IM3858, *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *L. (V.) guyanensis* (IUMB/BR/99/IM4695), *L. (V.) braziliensis* (MDID/BR/95/IM4159), *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/96/IM4315), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/93/IM3939), *Trypanosoma cruzi* (MDID/BR/86/IM2731), *T. rangeli* (MDID/BR/98/IM4587) e *Endotrypanum schaudinni* (MCHO/BR/80/M6159).

2.2- Especificidade e Sensibilidade da reação: Para averiguar a sensibilidade da Ln-PCR foram utilizados DNA de controles negativos: (i) amostras de *Lutzomyia umbratilis* de colônia (fêmeas sem sangue), (ii) machos de *L. umbratilis* e (iii) água destilada estéril (MilliQ), (iv) espécies de tripanossomatídeos dos gêneros *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, além dos controles positivos de: (iv) fêmeas de *L. umbratilis* acrescidos de flagelados obtidos de cultivo parasitário de *L. (V.) guyanensis* - MHOM/BR/92/IM3858), (v) flebotomíneos naturalmente infectados (após constatação inicial pela dissecação *in vivo* e o material reservado para extração de DNA) e (vi) amostras de espécies distintas do gênero *Leishmania* em diferentes concentrações de promastigotas.

Com a finalidade de verificar a concentração mínima de flagelados possíveis de serem detectados pela Ln-PCR, um ensaio com diferentes concentrações de parasitos foi realizado. Primeiramente as amostras foram mantidas em meio de cultura NNN (Difco) e, para o crescimento exponencial dos cultivos foi utilizado o meio líquido completo RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFBi). Os parasitos foram lavados duas vezes em PBS (Solução-tampão de fosfato, pH 7,2) estéril, centrifugando-se a 2.000 X g por 10min a 4°C, após cada troca de sobrenadante, para a quantificação utilizou-se câmara de Neubauer, por fim foram ajustados em concentrações que correspondiam aproximadamente a 5, 20, 40, 57, 3×10^2 e 3×10^3 parasitos por uL da suspensão de solução fisiológica 0,9%. As cepas utilizadas para este ensaio foram de *L. (V.) guyanensis* (HOM/BR/92/IM3858) e *L. (L.) amazonensis* (HOM/BR/93/IM3939), Essas amostras após a Ln-PCR apresentaram produtos amplificados de tamanhos diferentes nos géis de agarose com 242 e 302 pb, respectivamente.

2.3- *Colônia de flebotomíneos*: Os flebotomíneos utilizados como controles negativo e positivo da reação de Ln-PCR neste estudo, foram obtidos do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA. Foram utilizados macho e fêmea da espécie *L. umbratilis*.

2.4- *Capturas dos flebotomíneos*: Os flebotomíneos foram capturados na área de treinamento militar conhecida como: Base Marechal Rondon (BI1), a qual se situa no km 65 (2°43'55"S e 59°47'44"W), às margens da rodovia AM-010, que liga a cidade de Manaus à cidade de Itacoatiara, no Estado do Amazonas, Brasil. Esta área foi selecionada com base em estudos previamente realizados por Pinheiro et al. (2004, 2008 e 2010) e Gomes (2003), como sendo área de elevada incidência em flebotomíneos vetores naturalmente infectados por *L. (V.) guyanensis*. Os espécimes foram capturados utilizando a técnica de coleta em base de árvore com o auxílio de armadilha luminosa "CDC modificada", que funciona como um aspirador manual (CDC "miniature"- Hausherr Machine Works, New Jersey, EUA).

Um total de 720 fêmeas de *L. umbratilis* foi examinado aleatoriamente por dissecação. A espécie *L. umbratilis* foi selecionada para este estudo, pelo seu papel na transmissão da *L. (V.) guyanensis* na região Amazônica. O registro da dissecação foi feito observando informações quanto à espécie, condições dos ovários e características da infecção. A técnica supracitada foi baseada segundo Arias e Freitas (1978) e a identificação da espécie foi seguindo a classificação de Young e Duncan (1994).

Também foram realizadas capturas de flebotomíneos no município de São Gabriel da Cachoeira, área com baixa incidência de casos de Leishmaniose, apresentado uma média anual de 18 casos, e cujo conhecimento a respeito dos agentes etiológicos e flebotomíneos vetores que circulam na região são escassos

(SINAN, 2011). A metodologia para as coletas foi a mesma aplicada na B11 no município de Manaus, AM. Foi testado para detecção de infecção natural um total de 470 espécimes das seguintes espécies: *L. ayrozai* (2); *L. dendrophyla* (182); *L. davisii* (62); *L. flaviscutellata* (29); *L. shannoni* (102); *L. anduzei* (35); *L. scaffii* (36); *L. amazonensis* (1); *L. yuilli* (11); *L. paraensis* (5); *L. umbratilis* (3); *L. olmeca nociva* (1); *L. gomezi* (1).

2.5- *Extração de DNA de parasitos:* Para extração de DNA das diluições de promastigotas com aproximadamente 5, 20, 40, 57, 3×10^2 e 3×10^3 parasitos por μL da suspensão de solução fisiológica a 0,9% e controles positivo e negativo, estes foram primeiramente lavados em solução salina tamponada (PBS pH 7,2), e ressuspenso em tampão de lise (50 mM Tris [pH 8,0], 50 mM de NaCl, 50 mM de EDTA, 1% de DMSO (Dodecilsulfato de Sódio). proteinase K (Invitrogen®) foi adicionado a uma concentração final de 100 mg/mL, e a suspensão foi incubada por 2h a 56 °C, depois seguiu o protocolo segundo Sambrook et al.(1989), com fenol, fenol-clorofórmio, e clorofórmio, o DNA foi precipitado pela adição de 100 mM de cloreto de magnésio e 2 volumes de etanol. O sedimento foi lavado com etanol a 70% e seco a temperatura ambiente, em seguida eluído com TE (10 mM Tris-HCl [pH 7,2], EDTA 1 mM). DNA foi mantido a 4°C.

2.6- *Extração de DNA dos flebotomíneos:* Após a identificação das fêmeas, estas foram adicionadas diretamente ao conservante álcool etílico absoluto P.A (Merck) e encaminhadas para o Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, onde foram realizadas as extrações individuais através da técnica descrita a seguir.

O DNA foi extraído, de acordo com protocolo modificado pelo método de Coen et al. (1982). Os insetos foram reidratados em água destilada estéril (MilliQ)

por 10 minutos para retirar o excesso de álcool em temperatura ambiente (TA). Cada indivíduo foi macerado em microtubos do tipo “ependorf” com o auxílio de bastão de plástico e homogeneizado em tampão de lise “Blender Buffer” (5M NaCl, 0,2M sucrose, 2M Tris-HCl e 0,5M EDTA pH 9,1) acrescido de 0,5M SDS e incubado a 65°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado, 8M de acetato de potássio (KAC) a 4°C, homogeneizado e incubado em gelo por 45 min. O sobrenadante foi coletado após a centrifugação a 2.000 X g por 8 min., sendo descartado o “pellet”, acrescentando-se ETOH 100% ao sobrenadante para precipitação do DNA. Este foi descartado após centrifugação (2.000 X g por 10 min.) em seguida eluído com TE (10 mM Tris-HCl [pH 7,2], EDTA 1 mM). O DNA foi mantido a 4°C.

2.7- Amplificação da reação (Ln-PCR): A amplificação do gene de mini-éxon foi realizada após duas reações de PCR, sendo que na primeira foram utilizados iniciadores descritos por Cruz et al. (2002), para a reação foram utilizados 10 µL de DNA (75-100ng) com volume final da reação de 50 µL (contendo 75 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 20 mM (NH₄), 1,5 mM de MgCl₂, 0,1% de Tween20, 0,2 mM dNTPs, 0,25 unidade Taq polimerase, 12% de DMSO) nas seguintes condições (desnaturação do DNA a 85° C por 4 min., 94° C por 7 min, 94° C por 20 segundos, anelamento dos iniciadores a 50° C por 30 seg. e extensão a 72° C por 20 seg. (com etapa final de 10 min.), terminando a 4° C. Já na segunda PCR os iniciadores eram SLM1 (5'-GGT ATG CGA AAC TTC CGG-3') e SLM2 (5'-CTG ATA CTT ATA TAG CGT TAG-3') nas mesmas condições que a primeira. O DNA foi amplificado utilizando o termociclador (Eppendorf® AG 22331, Hamburg, Germany). Para as reações de PCR foram utilizados reagentes da marca Invitrogen®.

Os produtos das reações de PCR foram separados em gel de agarose 1,5% e o tampão de corrida utilizado foi TAE 1X (Tris 40mM, Ac. Acético 20mM, EDTA 1mM) e visualizados em GelRed™ (Biotium).

Os fragmentos obtidos após a amplificação referem-se aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, referente aos tamanhos de: 451 pb (pares de base) para *L. (Leishmania) infantum/ L. chagasi*, 302 pb para *L. (L.) amazonensis* e 242 pb para *L. (V.) braziliensis*.

3. RESULTADOS

O controle de especificidade para parasitos do gênero *Leishmania* foi realizado utilizando diversas espécies de tripanossomatídeos, entre estas variadas espécies de leishmânias. De acordo com os resultados obtidos (Figura 2), verificou-se similaridade de bandas com os subgêneros *Leishmania* (302 e 451 bp/ poços nº. 15, 19, 9, 20) e *Viannia* (242 bp/poços nº. 5 à 8, 12 à 14 e 18), assim como, a não reatividade com outros gêneros representantes da família Trypanosomatidae (*Endotrypanum* (poço nº. 11) e *Trypanosoma* nº. 16 e 17). Amostras do DNA de flebotomíneos na qual foi adicionado cultivo de *Leishmania* spp. foram amplificadas (poços nº. 5 à 8). Amostras de DNA obtido de *L. umbratilis* oriundas de campo (poço nº 4), com infecção natural comprovada após detecção pela dissecação do trato digestivo e apresentando concentração de (++) de parasitos (cerca de 20 flagelados/campo) foram amplificadas verificando-se produtos com 242 pb.



Figura 2. Resultado obtido após ensaios preliminares de Ln-PCR. Gel de agarose a 1,5%, corrida de eletroforese com tampão TAE 1X: 1- Fêmea de *L. umbratilis* não infectado; 2- Macho de *L. umbratilis* não infectado; 3- Fêmea de *L. umbratilis* infectado (+); 4- Fêmea de *L. umbratilis* infectado (++); 5 e 6- Machos de *L. umbratilis* com cultura de *L. (V.) guyanensis*; 7 e 8- Fêmeas de *L. umbratilis* de com cultura de *L. (V.) guyanensis*; 9- Cultura de *L. (L.) chagasi*; 10- Cultura de *L. (L.) deanei*; 11- Cultura de *E. schaudinni*; 12,13 e 14- Cultura de *L. (V.) guyanensis*; 15- Cultura de *L. (L.) amazonensis*; 16- Cultura de *Trypanosoma cruzi*; 17- Cultura de *T. rangeli*; 18- Controle positivo de *L. braziliensis* (sub-gênero *Viannia*) – 242pb; 19- Controle positivo de *L. amazonensis* (sub-gênero *Leishmania*) – 302pb; 20- Controle positivo de *L. (L.) chagasi* – 451pb; PM-Peso MolecularDNA /Ladder 100pb.

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade do método, foram realizadas reações de PCR com diferentes concentrações de *Leishmania*: 5, 20, 40, 57, 3×10^2 e 3×10^3 parasitos por μL da suspensão de solução fisiológica de 0,9%. Sendo assim, os resultados obtidos foram os seguintes: (i) a primeira reação da Ln-PCR, apresentou amplificações apenas para os controles positivos (*L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*) e (ii) a segunda Ln-PCR, apresentou positividade para os poços

onde foram adicionados os produtos amplificados obtidos a partir da concentração de 40 promastigotas/uL de *L. (V.) guyanensis* e de *L. (L.) amazonensis*.

Um total de 720 exemplares de *L. umbratilis* capturados em área endêmica de leishmaniose no município de Manaus foi testado com os iniciadores Slrev, SL2, SLM1, SLM2, apresentando uma taxa de infecção natural total de 46,11% (332/720) e de acordo com o tamanho do fragmento amplificado a taxa foi de 3,19% (23/720) para o subgênero *Leishmania* (302pb) e de 42,92% (309/720) para *Viannia* (242pb).

A reação de Ln-PCR apresentou três tipos de resultados em relação à primeira e segunda PCR: positivo/positivo (+/+), quando ocorria a reação na primeira e segunda PCR; negativo/positivo (-/+), quando a reação era somente observada na segunda e negativo/negativo (-/-), quando não ocorria amplificação dos produtos. Sendo assim, 3,33% (24/720) dos resultados positivo/positivo; 42,78% (308/720) negativo/positivo e 53,89% (388/720) negativo/negativo (Figura 3).

Das 23 amostras em que se observou amplificação tendo como produto 302 pb (*Leishmania*), apenas três não encontravam-se ingurgitadas (presença de sangue no trato digestório), as restantes não apresentavam sangue no trato digestório pela observação dos insetos pelo microscópio estereoscópico. Esta observação foi realizada antes da extração do DNA.

O resultado da relação das condições do trato digestório com o total da reação das PCR foi obtido 12,5% (3/24) quando a reação foi (+/+) e a fêmea encontrava-se ingurgitada, 83,33% (10/24) com a mesma característica da reação e fêmea não ingurgitada; negativo/positivo (-/+) e fêmeas ingurgitadas obtiveram 12,34% (38/308) e 87,66% (270/308) para a mesma reação mais com fêmeas não ingurgitadas; negativo/negativo (-/-) e ingurgitadas foi de 12,37% (48/388) e 87,63% (340/388) para fêmeas não ingurgitadas.

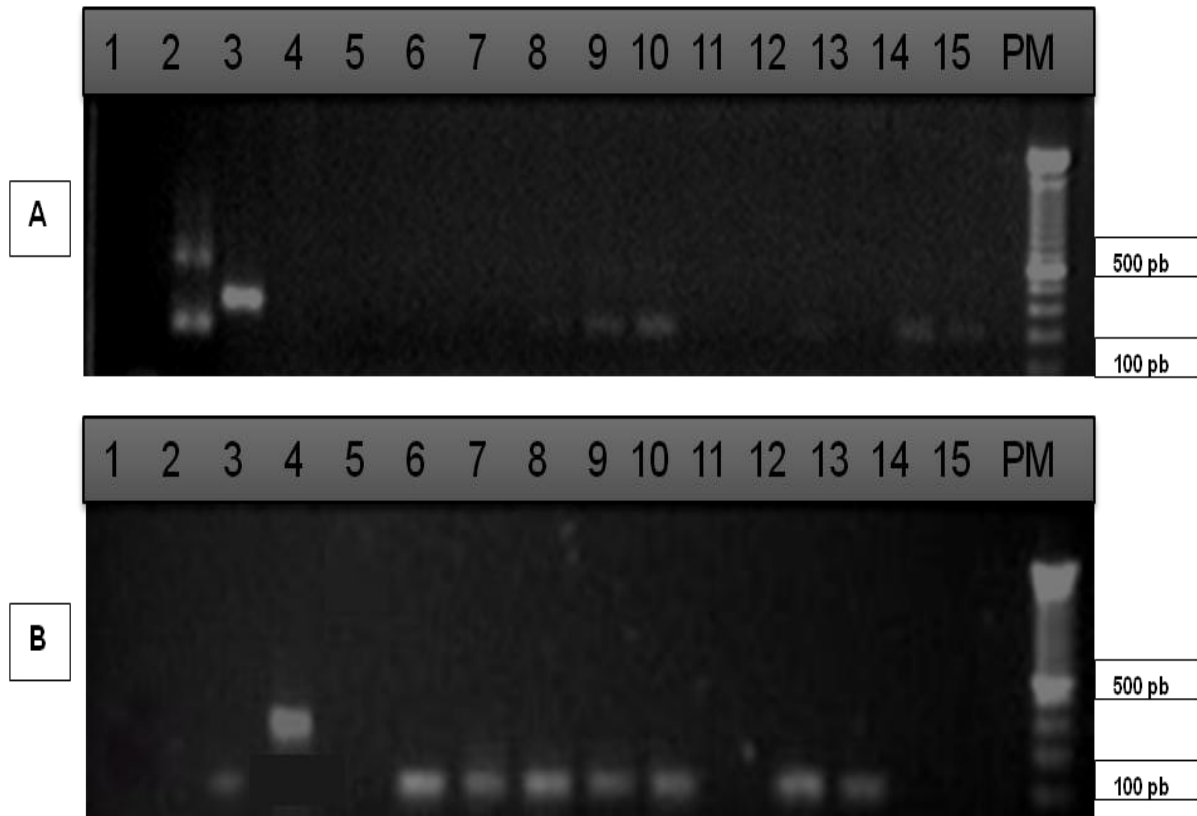


Figura 3. Eletroforese a 1,5% de agarose de produtos de Ln-PCR de DNA de flebotomíneos coletados em área de treinamento militar (Bi-1) no município de Manaus, área endêmica em leishmaniose cutânea. **A**- 1ª. Reação da PCR. 1- controle negativo (água MilliQ); 2- controle positivo de DNA *L. (V.) guyanensis* (M4147); 3- Controle positivo de *L. (L.) amazonensis* (IM3939); 4 a 15- cada poço representa o produto individual de ampliações de DNA extraído de flebotomíneos coletados em campo **B**- 2ª. Reação da PCR. 1- controle negativo do “mix da 1ª. PCR; 2- controle negativo do produto do cont. neg. da 1ª. PCR; 3- Cont. positivo de DNA *L. guyanensis* (M4147); 4- Cont. positivo de *L. amazonensis* (IM3939); de 5 a 16-nProduto das mesmas amostras testadas no gel A (4 a 15, respectivamente); PM- Peso Molecular/DNA Ladder 100pb.

O percentual de amostras com o tamanho de fragmento de 242 pb que amplificou tanto na 1ª e 2ª PCR e cujas fêmeas apresentavam sangue no trato digestório foi de 0,97% (3/309), enquanto que com a mesma reação mais ausência

de sangue obteve 6,47% (20/309), quando a reação era (-/+) com presença e ausência de sangue os valores observados foram de 11,65% (36/309) e 80,91% (250/309), respectivamente. No entanto, as amostras de tamanho 302pb apresentaram 4,3% (1/23) quando a reação era (+/+) e as fêmeas estavam ingurgitadas, não observamos amplificações quando estas não apresentavam sangue no trato digestório. Na reação (-/+) foram obtidas 8,7% (2/23) com fêmeas ingurgitadas e 87% (20/23) não ingurgitadas.

Um total de 470 fêmeas de treze espécies diferentes (*L. ayrozai*, *L. dendrophyla*, *L. davisí*, *L. flaviscutellata*, *L. shannoni*, *L. anduzei*, *L. scaffi*, *L. amazonensis*, *L. yuilli*, *L. paraensis*, *L. umbratilis*, *L. olmeca nociva* e *L. gomezi*), coletadas no município de São Gabriel da Cachoeira, foram dissecadas e visualizadas quanto a presença de flagelados e em seguida foram testadas com os iniciadores: S1rev, SL2, SLM1, SLM2. Apesar da sensibilidade e especificidade da PCR, não se detectou flebotomíneos com infecção natural por *Leishmania* no município de São Gabriel da Cachoeira.

4. DISCUSSÃO

Como já foi descrito em diversos trabalhos, a leishmaniose é uma doença complexa na qual apresenta variado e específico número de espécies transmissoras (LAINSON et al., 1981; AGUIAR e MEDEIROS et al., 2003; AZEVEDO et al., 2008), assim como, uma diversidade de agente etiológico (DEANE e GRIMALDI, 1985; BRYCESON, 1996; GONTIJO e CARVALHO, 2003; AMÓRA et al., 2009). A correta identificação das espécies de parasitos e seus respectivos vetores são, portanto, cruciais para os estudos epidemiológicos e medidas de controle (MICHALSKY et al.,

2002; SCHONIAN et al., 2010). A identificação dos parasitos no vetor é frequentemente baseada na morfologia, a localização das formas flageladas no trato digestório ou o seu crescimento na cultura “*in vitro*” (ARIAS et al., 1985; PINHEIRO et al., 2008).

É evidente que as técnicas moleculares são mais sensíveis e têm uma maior especificidade do que o método de dissecação. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma ferramenta valiosa na identificação de isolados de *Leishmania* a partir de pacientes (DEGRAVE et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2005; KARAMIAN et al., 2008; SAKI et al., 2010), cães (MOREIRA et al., 2007; QUEIROZ et al., 2010) e flebotomíneos (MICHALSKY et al., 2002; PINHEIRO et al. 2004; PAIVA et al., 2007). Em nestes resultados, verifica-se a possibilidade de uso da Ln-PCR e como alvo a região do gene de mini-éxon, podendo a mesma ser usada como método útil na detecção de infecção natural em flebotomíneos pelos diferentes subgêneros de *Leishmania*, apesar de ainda serem necessárias informações biológicas quanto a presença de sangue ingurgitado entre outras observações para se incriminar um inseto como vetor. Ainda assim, o método é informativo e pode auxiliar a direção de medidas preventivas quanto a ocorrência desta endemia.

São raros os estudos que estimam a taxa de infecção natural em flebotomíneos utilizando os genes de mini-éxon (PAIVA et al., 2006), normalmente o alvo empregado é a região de minicírculo do kDNA, isto é devido ao elevado número de cópias destas moléculas por parasitos, conferindo maior sensibilidade (ARANSAY et al., 2000; MIRANDA et al., 2002; PITA-PEREIRA et al., 2005).

Foram utilizados neste estudo iniciadores da região do gene de mini-éxon descrito por Cruz et al. (2002), sendo designados como: S1rev e SL2, empregados na primeira reação de PCR e SLM1 e SLM2 na segunda. Estes iniciadores

amplificam fragmentos de diferentes comprimentos de DNA, nos quais verifica-se similaridade de bandas com os subgêneros *Leishmania* com 302 e 451 bp, sendo o primeiro fragmento para a espécie *L. (L.) amazonensis* e o segundo para a espécie *L. (L.) chagasi* e o *Viannia* com 242 bp, assim como, a não reatividade com outros gêneros representantes da família Trypanosomatidae (*Endotrypanum* e *Trypanosoma*). Katakura et al. (2003) ao trabalhar com o gene de mini-éxon também conseguiram distinguir *Leishmania* de *Endotrypanum* isolados de flebotomíneos e de bicho-preguiça.

Ao se testar a técnica amplificando a região de gene de mini-éxon pela L-PCR, numa área considerada endêmica em leishmaniose cutânea, a taxa de infecção natural em *L. umbratilis* avaliada pela PCR foi de 47% (332/720), mostrando-se um bom resultado nas amostras coletadas na Base BI1, no município de Manaus. O mesmo não foi observado nas amostras oriundas do município de São Gabriel da Cachoeira, que apesar de não ter sido possível analisar o mesmo número de insetos da espécie *L. umbratilis*, pois a maior diversidade de espécies observadas na área foi de *L. dendrophyla*, *L. shannoni*, *L. davisii* e *L. flaviscutellata*, ainda assim, não se detectou flebotomíneos com infecção natural por *Leishmania* utilizando esta metodologia, o que não prova ausência de vetores na região, apesar da incidência da doença ser bastante reduzida (média de 18 casos por ano), quando comparada a de Manaus. Em área endêmica de leishmaniose a taxa de infecção de flebotomíneos por *Leishmania* é de 0,8 a 0,6% (RANGEL et al., 1985; RYAN et al., 1990; AZEVEDO e RANGEL, 1991; QUEIROZ et al., 1994; CASANOVA et al., 1995; SILVA e GRUNEWALD, 1999; LUZ et al., 2000; MIRANDA et al., 2002; PINHEIRO et al., 2008). Sendo assim, o método empregado demonstrou ser eficiente.

A taxa elevada de infecção natural de flebotomíneos observada no presente estudo para os exemplares de *L. umbratilis* em Manaus (47% das amostras testadas) atribui elevada sensibilidade e especificidade da técnica, visto a amplificação de fragmentos de 242 pb pela Ln-PCR obtidos de amostras isoladas deste inseto. É evidente que a maior proporção de positividade obtida foi observada na segunda etapa de reação, fato que pode ser discutido quanto a possibilidade de uma baixa carga parasitária, sendo apenas visualizado o resultado como positivo, numa segunda reação (2ª. etapa da PCR) com a reamplificação das sequências de DNA alvo anteriormente amplificadas e não visíveis.

Estes resultados corroboram com os de Michalsky et al. (2002) em relação a necessidade de um maior número de flagelados para a reação, pois ao padronizar a técnica de Ln-PCR, foram obtidas amplificações quando a reação apresentava um número acima de 40 parasitos e estas somente ocorreram na segunda reação de PCR.

As vantagens da Ln-PCR é o alto grau de sensibilidade, no qual pode teoricamente detectar 0,01 promastigotas de cultura de *Leishmania* e a especificidade, devido o uso de um segundo conjunto de iniciadores em uma segunda reação de PCR com o produto da primeira. Assim como em toda técnica, têm também suas desvantagens, este método demanda maior tempo de execução e custo, que são características contrárias a de um teste diagnóstico ideal, que além de sensibilidade e especificidade elevadas, deve ser simples e rápido.

Várias metodologias de PCR são utilizadas para determinar a infecção natural de flebotomíneos, mas geralmente, o diagnóstico é trabalhoso e sempre se faz necessário uma segunda PCR para a identificação da espécie de *Leishmania* ou os

fragmentos amplificados precisam ser seqüenciados (CABRERA et al., 2002; PARVISI et al., 2005; PAIVA et al., 2006).

O diagnóstico baseado na reação de PCR é também importante para determinar capacidade vetorial de flebotomíneos, em áreas onde muitas espécies coexistem. Mukherjee et al. (1997), em um surto epidêmico na Índia (1990-1992), utilizaram o gene de mini-éxon para identificar *L. (L.) donovani* infectando as espécies *Phlebotomus argentipes*, *P. papatasi* e *Sergentomyia babu*. Cacere et al. (2004), encontraram *L. ayacuchensis* infectada por *Leishmania (V.) peruviana* no Peru, embora *L. noguchii* estivesse presente na forma simpátrica. *L. ayacuchensis* foi identificada também como vetor de *L. (L.) mexicana* em algumas regiões do Equador (KATO et al., 2005).

É importante ressaltar que o fato da ocorrência de infecção natural, seja qual for o método utilizado não é suficiente para afirmar a participação de uma espécie como vetor no ciclo de transmissão das leishmanioses. Como já estabelecido por alguns autores, para se definir que uma espécie de flebotomíneo seja vetor de uma determinada espécie de *Leishmania*, é preciso que a espécie seja abundante no foco de leishmaniose, ser antropofílica, apresentar o desenvolvimento do parasito no intestino na ausência de sangue e o parasito isolado do inseto deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos (LAINSON et al., 1979; AZEVEDO e RANGEL et al., 1991; KILLICK-KENDRICK, 1990; RYAN et al., 1990).

O controle da Leishmaniose em áreas endêmicas requer um amplo conhecimento da eco-epidemiologia das espécies de *Leishmania*. Existe um grande problema para os epidemiologistas tanto na identificação dos reservatórios como na identificação dos vetores. Portanto, detectar infecção natural em flebotomíneos e identificar a espécie de patógeno é fundamental para a indicação das espécies

envolvidas na transmissão de *Leishmania* e no estudo das taxas de infecção nas áreas endêmicas, principalmente nas áreas longínquas dos grandes centros, como é o caso de SGC.

5. CONCLUSÃO

Foi padronizada a técnica de Ln-PCR para o estudo da infecção natural em flebotomíneos por parasitos do gênero *Leishmania*, no qual o método demonstrou ser útil, possibilitando discriminar representantes de seus subgêneros e de outros tripanossomatídeos. O fato de esta metodologia ser capaz de identificar *Leishmania* em flebotomíneos será uma ferramenta útil nos estudos de campo e nas investigações epidemiológica, principalmente em áreas onde o conhecimento a respeito da infecção natural em flebotomíneos é escasso ou inexistente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In *Flebotomíneos do Brasil*. RANGEL, E.F.; Lainson, R. (eds.), Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255. 2003.
- AMORA, S.S.A.; BEVILAQUI, C.M.L.; FEIJO, F.M.C.; ALVES, N.D.; MACIEL, M.V. Control of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) Leishmaniasis Vectors. *Neotropical Entomology* 38(3): 303-310. 2009.
- ANDRADE, H.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology* 140, 231–238. 2006.

ARANSAY, A.M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol.* 66: 1933-1938. 2000.

AREZ, A.P.; LOPES, D.; PINTO, J.; FRANCO, A.S.; SNOUNOU, G.L.; do ROSÁRIO, V.E. *Plasmodium* sp.: optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp.) samples. *Exp. Parasitol.* 94, 269–272. 2000.

AZEVEDO, A.C.R.; COSTA, S.M.; PINTO, M.G.G.; SOUZA, J.L.; CRUZ, H.C.; VIDAL, J.; RANGEL, E.F. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 103(8): 760-767. 2008.

AZEVEDO, A.C.R.; RANGEL, E.F. A study of sandfly species (Diptera, Psychodidae: Phebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86: 405–410. 1991.

BACHA, H. A.; TUON, F. F.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; OLIVEIRA, J.; NICODEMO, A. C.; QUIROGA, M. M.; MASCHERETTI, M.; BOULOS, M.; AMATO, V. S. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Transations of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Londres, 105: 173-178. 2011.

BARKER, D.C. DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitol Today* 3: 177-184. 1987.

BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In: COOK, G.C. (Ed.), *Leishmaniasis*. Manson's Tropical Diseases, 12th ed. WB Saunders, London, pp. 1213–1245. 1996.

CABRERA, O.L.; MUNSTERMAN, L.E.; CARDENAS, R.; GUTIERREZ, R.; FERRO, C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomedica* (Bogota) 22 (3): 296–302. 2002.

CACERES, A.G.; VILLASECA, P.; DUJARDIN, J.C.; BAÑULS, A.L.; LOPEZ, R.I.M.; ARANA M. Epidemiology of Andean cutaneous leishmaniasis: incrimination of *Lutzomyia ayacuchensis* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania* in

geographically isolated, upland valleys of Peru. *Am J Trop Med Hyg* 70: 607-612. 2004.

CASANOVA, C.; MAYO, R.C.; RANGEL, O.; MASCARINI, L.M.; PIGNATTI, M.G.; GALATI, E.A.B.; GOMES, A.C. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz and Neiva, 1912) infection in the valley of Mogi Guaçu river, state of São Paulo, Brazil. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* 35(1): 77–84. 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. Jr.; MOMEN, H. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91: 617– 626. 1997.

DEANE, L.; GRIMALDI Jr., G. *Leishmaniasis* in Brazil. In: CHANG, K.P., ed. *Leishmaniasis*. Berlin, Elsevier, p. 247-280. 1985.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, V. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89: 463-469. 1994.

DONELSON, J.E.; ZENG, W. A. Comparison of trans-RNA splicing in trypanosomes and nematodes. *Parasitology Today*. 6:327-703. 1990.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, Washington, 252 (5013): 1643-1651. 1991.

FERNANDES, O.; MURTHY, V.K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W.M.; CAMPBELL, D.A. Mini-éxon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 66: 261-271. 1994.

GOMES, L.H.M. Variação mensal e infecção em *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha 1977, *Lutzomyia anduzei* Rozeboom 1942, *Lutzomyia flaviscutellata* Mangabeira 1942 e *Lutzomyia olmeca nociva* Young & Arias 1982 (Diptera: Psychodidae) por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas de treinamento militar na Amazônia. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 101pp. 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36: 71-80. 2003.

KARAMIAN, M.; MOTAZEDIAN, M.H.; FAKHAR, M.; PAKSHIR, K.; JOWKAR, F.; REZANEZHAD, H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 22(8): 958-62. 2008.

KATO, H.; CÁCERES, A.G.; GOMEZ, E.A.; MIMORI, T.; UEZATO, H.; MARCO, J.D.; BARROSO, P.A.; IWATA, H.; HASHIGUCHI, Y. Molecular mass screening to incriminate sand fly vectors of Andean-type cutaneous leishmaniasis in Ecuador and Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 79:719-721. 2008.

KATO, H.; UEZATO, H.; KATAKURA K.; CALVOPINA, M.; MARCO, J.D.; BARROSO, P. A.; GOMEZ, E. A.; MIMORI, T.; KORENAGA, M.; IWAGA, H.; NONAKA, S.; HASHIGUCHI, S. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean area of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72: 87Ð93. 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4: 1-24. 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis, pp. 1–116. In W.H.R. Lumsden and D. A. Evans [eds.], *Biology of the Kinetoplastida*. Academic, New York. 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; READY, P.D.; MILES, M.A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies wild mammals and man in north Pará State with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* agent of “pian-bois”. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 530-536. 1981.

LUZ, E.; MEMBRIVE, N.; CASTRO, E.A.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J.A.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V) *braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94: (6): 623–631. 2000.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, D.N.; BECK, H.P.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and NewWorld *Leishmania* species by PCR–RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46: 115–124. 2003.

MICHALSKY, E.M.; FORTES-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C.; DIAS, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 44(5): 255–259. 2002.

MIRANDA, J.C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONCALVES, M.; REIS, M.G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania brasiliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 97 (2): 185–188. 2002.

MONTENEGRO, L. M. et al. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, 98 (10): 619-625. 2004.

MOREIRA, M.A.B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4): 245-252. 2007.

MUKHERJEE, S.; HASSAN, M.Q.; GHOSH, A.; GHOSH, K.N.; BHATTACHARYA, A.; ADHYA, S. Leishmania DNA in Phlebotomus and Sergentomyia species during a kalazar epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 57: 423-425. 1997.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, New York, 155: 335-350. 1987.

OLIVEIRA, J.G.; NOVAIS, F.O.; de OLIVEIRA, C.I.; da CRUZ JUNIOR, A.C.; CAMPOS, L.F.; da ROCHA, A.V. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop.* 94(1): 55-9. 2005.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N.O.; REBÊLO, J.M.M.; MORAES, J.L.P.; PEREIRA, S.R.F.P. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 540-543. 2006.

OSKAM, L.; SCHOONE, G.J.; KROON, C.C.M.; LUJAN, R.; DAVIES, J.B. Polymerase chain reaction for detecting *Onchocerca volvulus* in pools of blackflies. *Trop. Med. Int. Health* 4: 522–527. 1996.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C.; NASCIMENTO, J.C.; PIMENTA, P.F.; GALATI, E.A.; JUNIOR, H.F. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop* 99: 252-259. 2006.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; MALAFRONTTE, R.S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad Saúde Pública* 23: 87-94. 2007.

PARVIZI, P.; MAURICIO, I.; ARANSAY, A.M.; MILES, M.A.; READY, P.D. First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribossomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta Trop* 93: 75-83. 2005.

PINHEIRO, F.G.; FREITAS, R.A.; ROCHA, L.C.; FRANCO, A.M.R. Primeiro Registro de *Lutzomyia (Trichopygomyia) conviti* Ramirez Perez, Martins & Ramirez (Diptera: Psychodidae) no Brasil. *Neotrop Entomol* 39(4): 676-677. 2010.

PINHEIRO, F.G.; LUZ, S.B.; FRANCO, A.M.R. Infecção natural por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 38: 165-172. 2008.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C.R.; SOUZA, M.B.; BRAZIL, R.P.; BERTHO, A.L.; BARBOSA, A.F. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 905-913. 2005.

QUEIROZ, N.M.G.P. de et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online)* [online].19(1): 32-38. 2010.

QUEIROZ, R.G.; VASCONCELOS, I.A.; VASCONCELOS, A.W.; PESSOA, F.A.; SOUSA, R.N.; DAVID, J.R. Cutaneous leishmaniasis in Ceara state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania (V) braziliensis* in Baturite municipality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50(6): 693–698. 1994.

RANGEL, E.F.; RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Além Paraíba, State of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania (V) braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 80(3): 373–374. 1985.

REIS, S.R.; MICHALICK, M.S.M.; FRANCO, A.M.R. Leishmaniose tegumentar experimental e natural no cão doméstico (*Canis familiaris*), Município de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* [online]. 2(2): 81-81. 2011.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 71: 267–275. 1990.

ROTUREAU, B.; RAVEL, C.; COUPPIÉ, P.; PRATLONG, F.; NACHER, M.; DEDET, J.P. Use of PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.* 44: 459-467. 2006.

RYAN, L.; VEXENAT, A.; MARSDEN, P.D.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pinpointing the sandfly vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84(6): 786. 1990.

SAKI, J.; MEAMAR, A.R.; OORMAZDI, H.; AKHLAGHI, L.; MARAGHI, S.; MOHEBALI, M.; KHADEM VATAN, S.; RAZMJOU, E. Mini-éxon Genotyping of *Leishmania* Species in Khuzestan Province, Southwest Iran. 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, W.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SCHONIAN, G.; KUHL, K.; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitol.* 16: 1-21. 2010.

SHAHBAZI, F.; SHAHABI, S.; KAZEMI, B.; MOHEBALI, M.; ABADI, A. R.; ZARE, Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitology Research*, Berlin, 103(5):1159-1162. 2008.

SIBAJEV, A. Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para o Diagnóstico de Variedades de *Leishmania* Circulantes na Região Norte do Brasil. Tese (Doutorado) – UFAM, Manaus/AM. 2005.

SILVA, E.A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E.S.; BARROS, J.C.; BRAZUNA, J.C.M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Experimental Parasitology* 119: 343–348. 2008.

SILVA, O.S.; GRUNEWALD, J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (Viannia) infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94(5): 579–582. 1999.

TOLEDO, J.S.; SANTOS, A.F.J.; MOURA, T.R.; ANTONIAZI, S.A.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C.I.; BARRAL, A.; CRUZ, A.K. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* transfectants overexpressing the miniexon gene lose virulence in vivo. *Parasitol Int*. 2008.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* 54: 1-881. 1994.

8. CAPÍTULO V

CIRCULAÇÃO E DIVERSIDADE DE TRIPANOSSOMATÍDEOS NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, AM - BR

CIRCULAÇÃO E DIVERSIDADE DE TRIPANOSSOMATÍDEOS NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, AM - BRASIL

Francimeire Gomes Pinheiro^a, Jessica Sidou^a, Paula Figliuolo Cruz^a, Marcelo Ramalho –
Ortigão^b, Antonia Maria Ramos Franco^a

^aLaboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo N 2936, 69060001, Manaus, Brazil, ^b Department of Entomology Kansas State University, Manhattan, USA.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar é endêmica no Estado do Amazonas, onde apresenta um amplo espectro de variabilidade clínica devido à diversidade de espécies que circulam na região. Quatro espécies de *Leishmania* são responsáveis pela doença em seres humanos, a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi* e a *L. (Leishmania) amazonensis*. Os casos de LTA estão concentrados na região metropolitana de Manaus, com cerca de 600 casos/ano, porém poucas são as informações desta doença em locais mais distantes da capital, principalmente os que se localizam em áreas de fronteira. Nestas áreas há o livre acesso da população entre o países (Brasil, Colômbia e Venezuela), contribuído para a entrada de novas patologias e ou agentes etiológicos. Na colômbia é descrita a circulação das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) garnhani* e *L. (L.) mexicana* e na Venezuela *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*. Com o propósito de ampliar o conhecimento a respeito da circulação de espécies de tripanossomatídeos/*Leishmania* na região Amazônica, em especial na área de São Gabriel da Cachoeira (SGC), Amazonas, BR, o objetivo deste estudo foi o de realizar uma caracterização biológica e molecular das amostras de tripanossomatídeos isolados de insetos flebotômíneos e de humanos desta localidade. Taxa de infecção natural por tripanossomatídeos foi obtida em torno de 4,26% (42/981) sendo *Lutzomyia dendrophyla* a espécie que apresentou a maior taxa de infecção (3,6%) além de ser uma das mais frequentes na região. Em relação a caracterização bioquímica dos isolados tanto de flebotômíneos quanto de humano, estes não apresentaram perfis similares as cepas padrões de referência de *Leishmania* e *Endotrypanum*. Dos fragmentos de DNA seqüenciados verificou a formação de três grupos/espécies, sendo nove isolados com características biológicas similares ao subgênero *Viannia* e dois para o subgênero *Leishmania*. A participação de *L. dendrophyla* na transmissão de flagelados do gênero *Leishmania* no Amazonas foi evidenciada neste estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Seqüenciamento, ITS, *Leishmania*, Flebotômíneos, *Lutzomyia*

1. INTRODUÇÃO

Na família Trypanosomatidae, é conhecida a infecção por protozoários dos gêneros *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Trypanosoma*, *Crithidia*, e *Herpetomonas* em flebotomíneos (Phlebotominae, Diptera) [CAMARGO, 1999].

Dentre as numerosas espécies do gênero *Leishmania* encontradas em mamíferos (RYAN, 1987; MADEIRA et al., 2005) somente algumas também infectam e causam a doença no homem (CUPOLILLO et al., 2003; CUERVO et al., 2007). Provavelmente, isto se deve a uma combinação de fatores, incluindo a susceptibilidade intrínseca do homem à infecção e aos hábitos alimentares dos vetores (REITHINGER e DAVIES, 1999; OLIVEIRA et al., 2007).

As diferentes espécies de *Leishmania* são indistinguíveis morfologicamente, ademais nos gêneros *Endotrypanum* e *Leishmania* as formas promastigotas encontradas no trato digestório dos flebotomíneos são muito similares, dificultando assim a caracterização biológica destes flagelados, tornado essencial a utilização de marcadores moleculares que possibilite a sua correta identificação (FALQUETO et al., 2003; CUPOLILLO et al., 2003; BRITO et al., 2009; SILVA et al., 2012).

A expansão geográfica na transmissão de leishmaniose no Brasil é clara: na década de 80 foi notificada em 19 unidades federativas enquanto em 2003 foram confirmados casos autóctones, em quase todos os estados do país (SHAW, 2007; VOLF e MYSKOVA, 2007; TOLEZANO et al., 2007).

A diversidade genética do parasito em combinação com características do sistema imunológico do hospedeiro contribuem muito para a diversidade dos quadros clínicos na leishmaniose. Assim, a infecção pode se manifestar de quatro formas comuns: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose

cutânea difusa e leishmaniose visceral (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; MURRAY et al., 2005).

Os métodos moleculares têm se mostrado de grande valor na identificação de tripanossomatídeos, fato importante na taxonomia, e por outro lado, no diagnóstico, terapêutica, epidemiologia e controle parasitário. Métodos moleculares, ao nível do DNA genômico, são, sem dúvida, ferramentas necessárias aos estudos taxonômicos e evolutivos dos organismos. A caracterização dos parasitos permite, num enfoque epidemiológico, a identificação das cepas circulantes em determinada região, além de uma abordagem taxonômica com a caracterização de espécies e subespécies (ALAM et al., 2009; BOTILDE et al., 2006; TOJAL et al., 2006; DELGADO et al., 1997; CUPOLLILLO et al, 1998; 1994).

Apesar desta importância da Leishmaniose no cenário da saúde pública no Brasil, poucos estudos foram realizados em relação à variabilidade e características dos parasitos em relação à área de fronteira na região Norte do país. Nestas áreas há o livre acesso da população entre o países vizinhos, contribuido para a entrada desta patologia e ou agentes etiológicos.

Com o proposito de ampliar o conhecimento a respeito da circulação de espécies de tripanossomatídeos na região Amazônica, em especial na área de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, o objetivo deste estudo foi o de caracterizar por método bioquímico e molecular, amostras de tripanossomatídeos isolados de insetos flebotomíneos e de humanos desta localidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo - O estudo foi realizado no município de São Gabriel da Cachoeira (SGC), ao longo da BR 307 (estrada de Cucuí), entre as coordenadas (00°06'21S, 067°01'37"W e 00°35'30"N, 66°46'26"W) e na estrada da Usina Miuá, no trecho que compreende as coordenadas (00°04'18S e 068°00'07" W). Este município situa-se no extremo noroeste do estado do Amazonas. Sendo considerado o mais indígena do Brasil e cujo território é o terceiro maior do país. São Gabriel faz fronteira com os países Colômbia e Venezuela (CENSO, 2010).

Captura de Flebotomíneos - Os flebotomíneos foram coletados utilizando-se 16 armadilhas luminosas do tipo CDC (CDC "miniature" - Hausherr' Machine Works, New Jersey, EUA) instaladas em áreas de mata de terra firme a um metro do solo, durante a noite das 18:00 às 7:00h. Também foram feitas coletas por aspiração em base de árvores com armadilha do tipo CDC (modificada para aspiração em base de árvore), no momento da retirada das armadilhas luminosas entre 8h e 8h30. Foram selecionadas árvores com caules acima de 100 cm de circunferência e presença de buracos, facilitando o encontro destes insetos.

Isolamento de parasitos/Caracterização biológica:

a)Dissecção de flebotomíneos e infecção natural por flagelados- Logo após a coleta os insetos foram imediatamente encaminhados ao laboratório de Biologia do Instituto Federal do Amazonas (IFAM/SGC) para a realização do processo de triagem, identificação, segundo Young & Duncan (1994) e de dissecção das fêmeas vivas para a detecção e isolamento de flagelados (Arias & Freitas, 1977). A

dissecção de flebotomíneos e isolamento parasitário foram realizados de acordo com o procedimento a seguir: as fêmeas retiradas da gaiola de náilon foram lavadas em solução detergente a 2% e depois transferidas para solução de salina estéril. Posteriormente foram retirados os dois últimos tergitos abdominais e logo depois o aparelho digestivo; o conteúdo do tubo digestivo foi analisado em microscópio ótico para a ocorrência e localização dos protozoários; quando positivo era feito aspirado e semeado em meio de cultura bifásico NNN (Naiff *et al.*, 1988). As fases das mudanças observadas nos ovários estão de acordo com Forattini (1973). Os parasitos isolados foram mantidos em meio de cultivo bifásico NNN (Novy & MacNeal, 1904; Nicolle, 1908), acrescidos de fase líquida de Schneider (Sigma) completo [acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi/Cultilab)] (Hendricks *et al.*, 1978) e repicados em intervalos semanais. Os isolados foram expandidos em meio RPMI completo e criopreservados em nitrogênio líquido, sendo depositados no criobanco de parasitos do INPA/CSAS.

Taxa de infecção - A taxa de infecção natural (TIN) para tripanossomatídeos foi obtida pelo cálculo percentual da razão entre o número de fêmeas infectadas e o número de fêmeas dissecadas por espécie (FREITAS *et al.*, 2002, RODAS e POLETTO, 2001).

b) Amostras de isolados humanos- Foram enviadas para o Laboratório do IFAM/SGC, cinco biópsias de lesão de pacientes suspeitos para Leishmaniose (Figura 1), as coletas dos referidos pacientes foram realizadas no Hospital de Guarnição (HGU/SGC) pelos médicos que ali prestavam atendimento. Com as biópsias foram realizados os seguintes procedimentos: cultivo em meio NNN, escarificação da borda da lesão para pesquisa direta de amastigotas, biópsia para inoculação em hamster (*Mesocricetus auratus*) e estoque em etanol (PA) para testes

moleculares. Foi feita a inoculação das amostras biológicas nos animais de experimentação, apenas após a chegada do material ao INPA (Manaus, AM).

Aspectos éticos - Comitê de Ética do INPA (nº 001/2008).

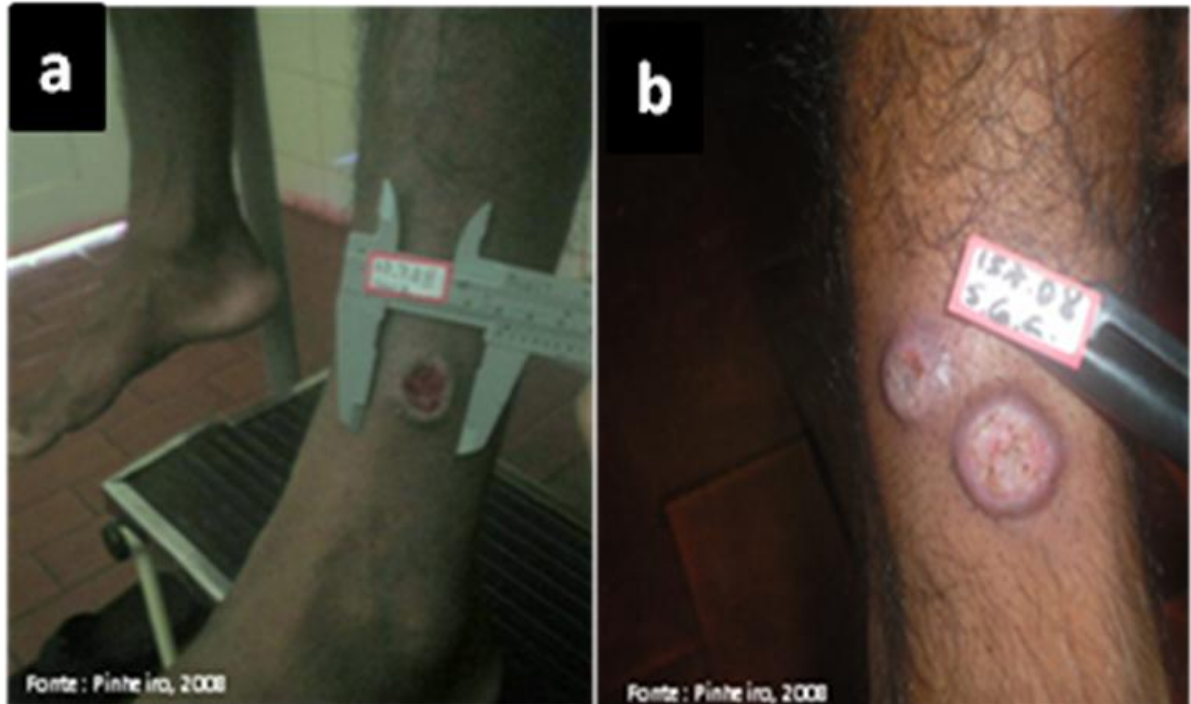


Figura 1. Lesões suspeitas para leishmaniose em pacientes de São Gabriel da Cachoeira. **a:** Lesão sob a forma de úlcera típica no membro inferior esquerdo (isolado MHOM/BR/2008/IM5742); **b:** Lesão verrucosa no membro inferior direito (MHOM/BR/2008/IM5743). Fonte: Pinheiro, 2008.

c) Caracterização isoenzimática – Os Isolados em cultivo foram expandidos em meio líquido Schneider completo e levados para análise em eletroforese utilizando como suporte agarose (MOMEN, 1983; FIGUEIRA et al., 2008). Os seguintes loci enzimáticos foram analisados: glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), glicose-fosfato isomerase (PGI, E.C.5.3.1.9) e fosfoglicomutase (PGM, E.C.1.4.1.9).

d) Caracterização molecular:

i) Extração de DNA - A extração do DNA das amostras de cultivo de isolados de flebotomíneos, cepas de referência e de biópsias, para os testes moleculares foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio, segundo Sambrook et al. (1989). As massas dos flagelados e as biópsias das lesões foram ressuspensas em 500µL de tampão de lise (SDS 10%, NaCl 5M, EDTA 0,5M), adicionado proteinase K (100µg/mL), incubando-se a 65°C, por 2h. Igual volume de fenol foi adicionado e as amostras foram centrifugadas por 5' a 1500g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, repetindo-se a extração agora com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Posteriormente, foram adicionados dois volumes de etanol absoluto gelado, para a precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas durante 10' a 1500g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi submetido a secagem a temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspenso em 200µl de TE (10mM Tris Cl, pH 8.0 e 1mM EDTA) e estocado a -20°C até o uso. A quantificação do DNA das amostras foi realizada em aparelho Nano Drop® Spectrophotometer ND-1000.

ii) PCR - Amplificação da região de ITS do rDNA (rRNA gene) - A região de ITS (espaçadores transcritos internos) do rRNA foi amplificada utilizando iniciadores: IR1 (5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3') e IR2 (5'-GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3') sintetizados pela Invitrogen® (HERNANDEZ et al., 1990; CUPOLILLO et al., 1995). As condições para a realização da PCR foram de 50 ng do DNA do parasito; 100 µM de cada (IR1 e IR2) iniciador; 250 µM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 1U Taq polimerase, com o ciclo de: 94° C/3 min; 94° C/1 min, 55° C/1 min, 72° C/2 min (32 vezes); 72° C/1min, com um volume final de 50µL em termociclador (Mastercycler personal - Eppendorf®). Os fragmentos de amplificação foram observados, em gel de agarose 1,5% em TAE 1X e corados com

Gel Red® (Biotium), os géis foram foto documentado usando o sistema fotográfico “Eagle Eye System” (Stratagene, La Jolla, USA) no Laboratório de Biologia Molecular do INPA.

iii) *Mini-éxon* - A metodologia utilizada para identificação dos isolados, também foi empregada por Pinheiro (2004) e os iniciadores da região de mini-éxon foram descritos por Cruz et al. (2002), sendo: Slrev, SL2, SLM1 e SLM2.

iv) *Origem das cepas de referência*: Neste estudo, foram utilizadas 08 cepas de referência (Tabela 1), recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e duas do gênero *Endotrypanum*, utilizadas como padrões na comparação dos perfis com as amostras isoladas.

Tabela 1. Origem e identificação das cepas de referência utilizadas para identificação preliminar das amostras isoladas

Nº. amostra	Designação ^a	Espécies ^b	Origem Geográfica
2773	MHOM/BR/00/IM2773	<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	BR, AM, Puraquequara
1245	IHAR/CO/85/CL500	<i>L. (V.) colombiensis</i>	Colômbia, Santander
1545	MCEB/BR/84/M8408	<i>L. (V.) shawi</i>	BR, PA, Serra dos Carajás
1367	MCOE/BR/82/1367	<i>L. (V.) lainsoni</i>	BR, RO, BR 364
565	MHOM/BR/75/M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>	BR, PA, Monte Dourado
566	MHOM/BR/75/M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	BR, PA
PH8	IFLA/BR/67/PH8	<i>L. (Leishmania)</i>	BR, PA, Utinga
EZ01	MCHO/BR/89/RO/9627	<i>amazonensis</i>	BR, RO
EZ12	MCHO/BR/88/M11602	<i>Endotrypanum</i> sp.; <i>E. schaudinni</i>	BR, PA

a: designação: hospedeiros[M=Mammalia: HOM: *Homo sapiens*; DID: *Didelphis*; CEB: *Cebus*; COE: *Coendou* I=Insecta, HAR: *Lutzomyia hartmanni*; FLA: *L. flaviscutellata*/país de origem/ano de isolamento/código de origem] **b:** identificação do estoque foi estabelecida através da análise de isoenzimas de acordo com o padrão isoenzimático e análise numérica (MOMEN,1984; CUPOLILLO et al.,1994).

v) *Purificação do produto da PCR* - Os produtos da região de ITS foram purificadas com PEG 20% (*Polyethylene Glycol 8000*) e álcool 80%, sendo ressuspendido em 20µL de água ultra-pura.

vi) *Sequenciamento, alinhamento e edição da região de ITS* - O sequenciamento dos isolados seguiu as instruções do Kit de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1* (Applied Biosystems®) para ABI 3130, conforme recomendações do fabricante. Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada amostra nos sentidos 5´- 3` em ambas as fitas L e H. Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por um processo de precipitação com isopropanol 65% e álcool 100%, conforme recomendações do fabricante, e a reação foi ressuspensa em formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems®). Em seguida, as amostras precipitadas foram eletro-injetadas em analisador automático ABI 3130. As sequências obtidas foram analisadas, alinhadas e editadas com o auxílio dos programas BIOEDIT 7.0.9.0 (Hall, 1999), as quais foram agrupadas em uma matriz de dados para confecção de cladogramas de Identificação molecular baseados em agrupamentos (NJ) [SAITO e Nei, 1987], foi utilizado o programa MEGA 5.0.1 (TAMURA et.al., 2007).

3. RESULTADOS

Caracterização biológica:

- *Infecção natural por tripanossomatídeos em flebotomíneos* – Do total de 6832 flebotomíneos coletados, 981 (14%) fêmeas foram dissecadas. Dos indivíduos dissecados, 71% (697) eram de coletas por aspiração em base de árvore, 29% (284) de capturas por armadilha luminosa. Verificou-se a infecção apenas em

flebotomíneos capturados nas bases das árvores. A taxa de infecção natural por tripanossomatídeos encontrada nos insetos dissecados em SGC foi: *Lutzomyia dendrophyla* 3,66% (36/981), *L. shannoni* 0,3% (3/981), *L. scaffi* 0,1% (1/981), *L. anduzei* 0,1% (1/981) e *L. davisii* 0,1% (1/981). Na área da estrada da Usina Miua, próxima ao porto de Camanaus, o número de flebotomíneos infectados foi mais elevado, encontrando-se 83% de *L. dendrophyla* (30/36), 100% de *L. davisii* (1/1) e 100% *L. scaffi* (1/1). A segunda área foi no Km 10 (Fazenda Tigre) da BR 307, que liga SGC com Cucuí (povoado de origem militar situado na fronteira Brasil-Venezuela) encontrando-se 16,6% de *L. dendrophyla* (6/36), 100% de *L. shannoni* (3/3) e 100% *L. anduzei* (1/1) [Tabela 2].

O conteúdo estomacal de 48% (20/42) das fêmeas positivas apresentou sangue em decomposição, sendo que 40% (17/42) com sangue fresco, além de 9,5% fêmeas *L. dendrophyla* (4/42) e 0,2% de *L. davisii* (1/42) sem a presença de sangue (IM5708, IM5731, IM5735, IM5890 e IM5891) [Tabela 2]. A maioria das fêmeas apresentou de 6 a 40 flagelados por campo com exceção de *L. dendrophyla* (IDEND/BR/2007/IM5710) com número acima de 40 flagelados por campo. Um grande número de fêmeas apresentou infecção por flagelados no triângulo posterior, intestino anterior e posterior. Em relação às condições dos ovários das fêmeas, a grande maioria apresentou oócitos entre os estágios de desenvolvimento II e V (Tabela 2).

Conforme observado, das 42 amostras positivas e cultivadas em meio de cultivo bifásico NNN (Novy & MacNeal, 1904; Nicole, 1908), apenas 23 cresceram em cultivo, sendo expandidas em meio líquido Schneider completo (HENDRICKS *et al.*, 1978). Entretanto algumas amostras apresentaram dificuldades de crescimento após alguns repiques em meio Schneider e/ ou RPMI. As amostras restantes

sofreram contaminação por micro-organismos e/ ou não ocorreu desenvolvimento parasitário.

Dos isolados em meio de cultivo foram confeccionadas lâminas coradas pelo método panótico para visualização das formas flageladas (Figura 2). Todas as formas observadas em cultivo eram promastigotas com tamanhos variados. E nos insetos eram promastigotas pequenas com um longo flagelo livre.

Em relação ao conteúdo estomacal e as condições dos ovários, três fêmeas de *L. dendrophyla* apresentaram a presença de sangue fresco com oócitos em estágios de desenvolvimento III, IV e V.

Isolamento de Leishmania (humanos): Foram isoladas cinco amostras de lesões cutâneas de pacientes provenientes de SGC (Tabela 3), tendo sido observadas formas amastigotas em todas as lâminas coradas. Não foi observado o desenvolvimento de lesões cutâneas em hamsters inoculados com amostra humana (M/HOM/BR/07/IM5741) pelo menos no período de um ano de observação, tendo sido feito exame parasitológico dos locais de inoculação.

Relato dos casos humanos (informações cedidas pelo Major Enf. Geanini - HGU/SGC):

M/HOM/BR/07/IM5741: Paciente sexo masculino, R. T. S., branco, 48 anos, procedente do bairro do Areal (SGC). Procurou o HGU/SGC no dia 15/01/2007, apresentando lesão, com evolução de aproximadamente dois anos, localizada no membro inferior direito, o mesmo relatou que fez uso de tratamento caseiro (óleo de andiroba e sebo de cobra) e pernitoou em seu sítio no KM 19 da BR 307 e caçar no KM 60 e 65 (Figura 3F).

Tabela 2. Localização dos flagelados no tubo digestório das fêmeas de flebotomíneos infectadas coletadas na área de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil.

Código da Amostra ¹	Carga ² parasitária	Conteúdo ³ estomacal	Condições dos ovários ⁴	Distribuição dos flagelados ⁵			
				TM	ΔP	IP	IA
IDEND/BR/2007/IM5701*	++	SF	3			X	X
IDEND/BR/2007/IM5702	+	SF	2			X	X
IDEND/BR/2007/IM5703	+	SF	1			X	
IDEND/BR/2007/IM5704	+	SF	2			X	X
IDEND/BR/2007/IM5705	+	SF	3			X	X
IDEND/BR/2007/IM5706	+	SF	1			X	X
ISHAN/BR/2007/IM5707*	++	SD	2			X	
IDEND/BR/2007/IM5708*	+	SS	1				X
IDEND/BR/2007/IM5709	++	SF	2			X	
IDEND/BR/2007/IM5710*	++++	SD	3	X	X	X	X
ISHAN/BR/2007/IM5711*	++	SD	2		X	X	
ISHAN/BR/2007/IM5712*	+	SF	1		X	X	
IDEND/BR/2007/IM5713*	++	SF	2		X		
IDEND/BR/2007/IM5714*	++	SF	2		X		
IDEND/BR/2007/IM5715*	+	SF	1		X		
IDEND/BR/2008/IM5716	++	SF	2			X	
IDEND/BR/2008/IM5717*	++	SF	2		X		
IDEND/BR/2008/IM5718*	++	SD	2		X		
IDEND/BR/2008/IM5719*	+++	SD	2		X		
IDEND/BR/2008/IM5720*	++	SF	2		X		
IDEND/BR/2008/IM5721*	++	SD	2		X	X	X
IDEND/BR/2008/IM5722	+	SD	3		X		X
IDEND/BR/2008/IM5723*	+	SD	2		X		
IDEND/BR/2008/IM5724	+++	SD	3		X		X
IDEND/BR/2008/IM5725	+++	SD	3		X	X	X
IDEND/BR/2008/IM5726*	++	SD	2			X	
IDEND/BR/2008/IM5727	+++	SD	2		X	X	X
IDEND/BR/2008/IM5728*	++	SD	3		X		X
IDEND/BR/2008/IM5729*	+++	SD	3		X	X	X
IDEND/BR/2008/IM5730	++	SD	3	X	X		X
IDEND/BR/2008/IM5731	+	SS	3				X
ISCAF/BR/2008/IM5732	+	SD	2			X	X
IDEND/BR/2008/IM5733	++	SD	3			X	X
IDEND/BR/2008/IM5734*	+++	SF	3				X
IDEND/BR/2008/IM5735	+	SS	3		X		X
IDEND/BR/2008/IM5736*	++	SD	2			X	
IDEND/BR/2009/IM5737	+	SF	2				
IDEND/BR/2009/IM5738	+	SF	2		X	X	
IAND/BR/2010/IM5739*	+	SD	2		X		
IDEND/BR/2010/IM5740*	+	SD	2		X		
IDEND/BR/2011/IM5890*	+	SS	2		X		
IDAVI/BR/2011/IM5891	++	SS	2		X		

1: Código da amostra: I= insecta; DEND= *Lutzomyia dendrophyla*; AND= *L. anduzei*; SHAN= *L. shannoni*; SCAF= *L. scaffil*, DAVI= *davisi*, BR= país de origem (Brasil) / Ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA; 2: Quantidade de flagelados observados no exame: em torno de : 1 a 5 (+); 6 a 20 (++); 21 a 40 (+++) e mais de 41 (++++); 3: Sangue recente (SR); sangue em decomposição (SD); ausência de sangue (SS); 4: Ovários em desenvolvimento (1), oócitos em estágios I e II (2), oócitos em estágios III, IV e V (3); 5: TM= tubos de Malpighi; IA= intestino anterior; IP= intestino posterior; ΔP = triângulo posterior. *= amostras que cresceram e expandiram em meio de cultura.

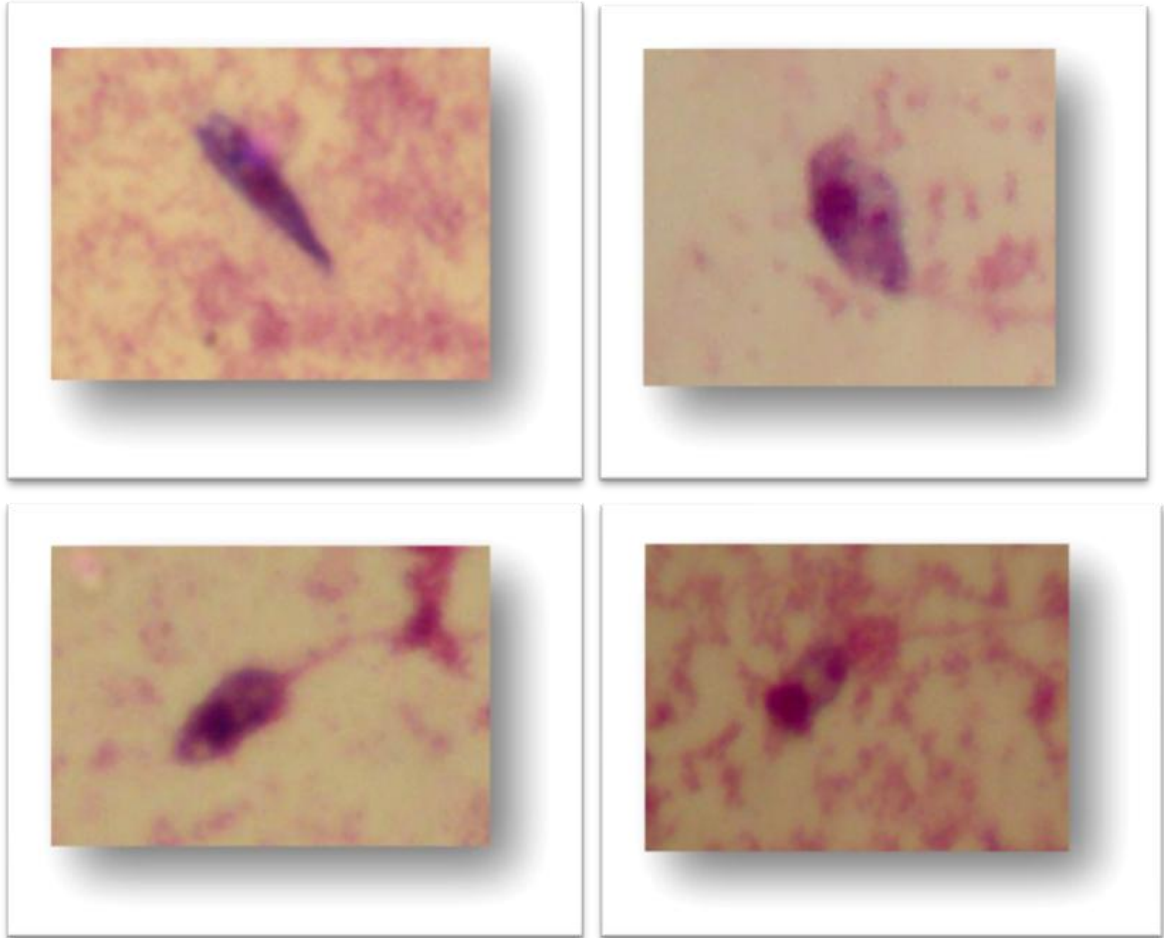


Figura 2. Fotomicrografias de formas promastigotas isoladas de flebotomíneos, lâminas coradas pelo método de Giemsa (1000X) Fonte: Pinheiro, 2011.

M/HOM/BR/08/IM5742: Paciente sexo masculino, J. V. P., da etnia Piratapua, 30 anos, procedente de Yuarete. Procurou o HGU/SGC no dia 16/07/2008, apresentando 15 lesões do tipo verrucosa, localizadas nos membros superiores e inferiores, com evolução de aproximadamente três meses (Figura 3A e B).

M/HOM/BR/08/IM5743: Paciente sexo masculino, R.C.V. branco, 31 anos, procedente de SGC. Procurou o HGU/SGC no dia 16/07/2008, apresentando uma lesão do tipo úlcera típica, localizada no membro inferior esquerdo, com dois meses de evolução (Figura 3D) .

M/HOM/BR/08/IM5744: Paciente sexo masculino, J. M. S., militar, 26 anos, procedente do Rio de Janeiro, Procurou o HGU/SGC no dia 28/07/2008, apresentando uma lesão do tipo ulcera típica, localizada no antebraço direito, com aproximadamente três meses de evolução, relatou que participou de um estágio de adaptação a vida na selva, na estrada da Usina Miua entre os meses de março e abril de 2008 (Figura 3C).

M/HOM/BR/09/IM5745: Paciente sexo masculino, A.F., indígena, 51 anos, procedente da Ilha das Flores (SGC), Procurou o HGU/SGC no dia 27/07/2000, apresentando uma lesão em placa, localizada na perna direita, com aproximadamente três meses de evolução (Figura 3E).

Tabela 3. Isolados humanos de *Leishmania* sp. do município de São Gabriel da Cachoeira, AM

Código da amostra ^a	Tipo de lesão	Exames realizados		
		Cultivo	Biópsia/escarificação	hamster
MHOM/BR/07/IM5741*	Ulcerada	X	X	X
MHOM/BR/08/IM5742	Ulcerada	X	X	-
MHOM/BR/08/IM5743	Verrucosa	X	X	-
MHOM/BR/08/IM5744	Ulcerada	X	X	-
MHOM/BR/09/IM5745	Ulcerada	X	X	-

a: Código da amostra: M - mamífero; HOM - *Homo sapiens*; BR= país de origem (Brasil) / Ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA. *: amostra Isolada e mantida em cultivo, X= exame realizado, - : exame não realizado.



Figura 3. Lesões leishmanióticas em pacientes do Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira - HGU/SGC. A e B: paciente a MHOM/BR/08/IM5742; C: paciente MHOM/BR/08/IM5744; D: paciente: MHOM/BR/08/IM5743; E: MHOM/BR/09/IM5745; F: MHOM/BR/07/IM5741. Fonte: Pinheiro, 2007; 2008.

Apenas de uma amostra (M/HOM/BR/07/IM5741) dos cinco pacientes examinados conseguiu-se o isolamento *in vitro*, as demais contaminaram e/ou não cresceram em meio bifásico, não sendo possível a inoculação em animais de experimentação (M/HOM/BR/08/IM5742, M/HOM/BR/08/IM5743, M/HOM/BR/08/IM5744, M/HOM/BR/09/IM5745). Os pacientes examinados apresentaram lesões características de úlcera típica e verrucosa (Figura 3).

Caracterização bioquímica e molecular: Foram utilizados três loci enzimáticos (GPI, G₆PDH e PGM) para a análise de 17 amostras: 16 isolados de flebotomíneo (*L. dendrophyla*: IM5721, IM5715, IM5710, IM5714, IM5707, IM5734, IM5717, IM5729, IM5705, IM5719, IM5701, IM5736, IM5720, IM5739, IM5723, IM5711) e um humano (IM5741). As amostras apresentaram perfis distintos às cepas de referência do gênero *Leishmania* que circulam no Brasil e Colômbia (Figura 4).

De acordo com os perfis isoenzimáticos obtidos dos isolados de flebotomíneos e o de humano, observa-se que estes não apresentaram perfil similar as espécies de leishmânias e endotrípano utilizadas.

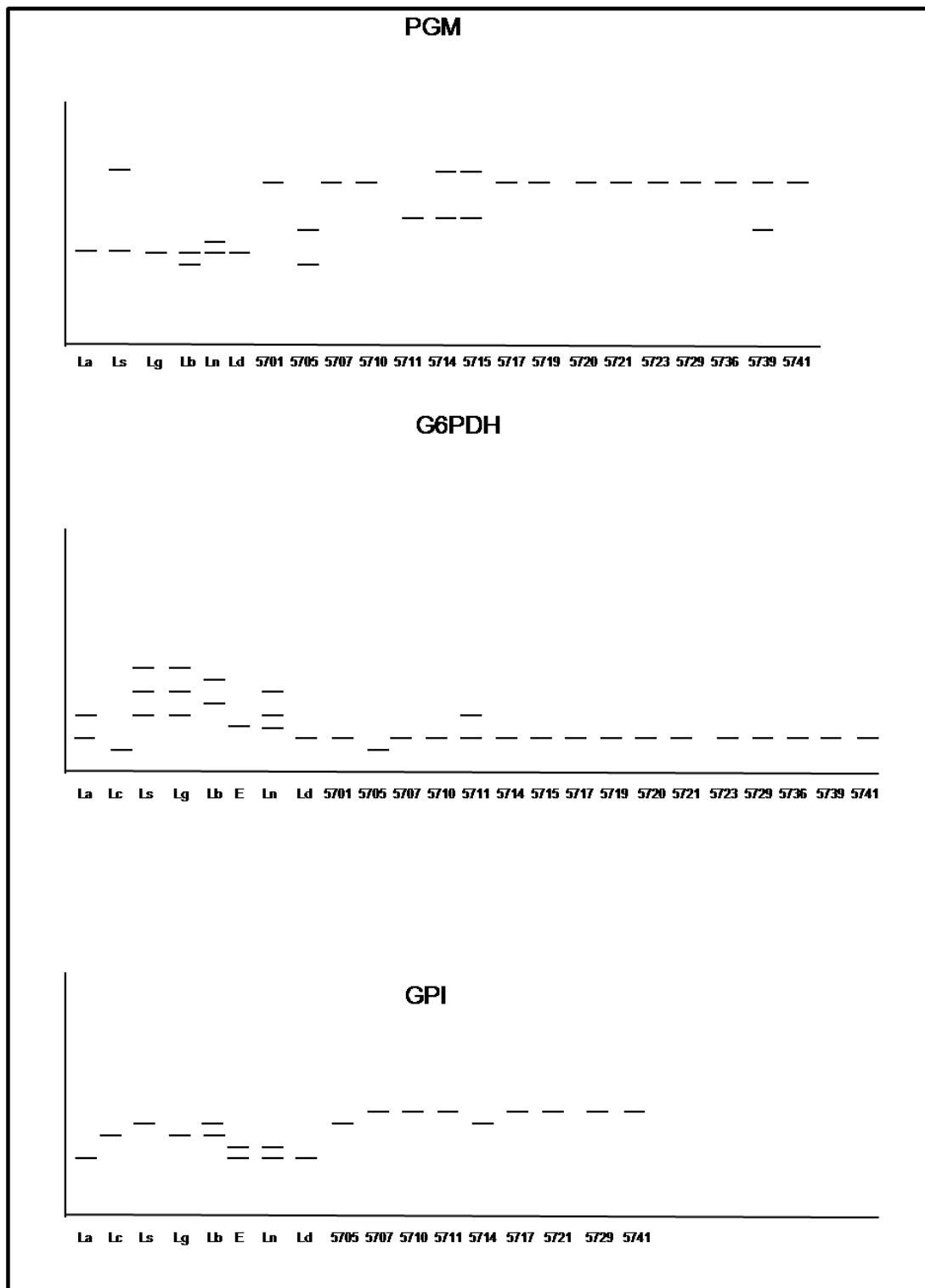


Figura 4. Perfis isoenzimáticos (PGM, G6PDH e GPI). de cepas de referência dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* e das amostras isoladas de flebotomíneos e de humano em São Gabriel da Cachoeira, AM. La: *Leishmania amazonensis*; Lc: *Leishmania colombiensis*; Ls: *Leishmania shawi*; Lg: *Leishmania guyanensis*; Lb: *Leishmania braziliensis*; E: *Endotrypanum* sp.; Ln: *Leishmania naiffi*; Ld: *Leishmania deane*.

Dos isolados em cultivo de flebotomíneos que não apresentavam sangue no trato digestório (*L. dendrophyla*: IM5708, IM5731, IM5890) apenas a amostra IM5708 cresceu em cultivo e agrupou com um isolado humano pela análise da sequência da região de ITS (Figura 7).

A amostra isolada de lesão humana (IM 5741) pela análise de isoenzimas apresentou perfil similar a alguns isolados de flebotomíneos, agrupando-se no tipo A pela análise das sequências da região de ITS (Figura 5). É sabido que o produto do amplificado da região do gene de mini-éxon em leishmanias do subgênero *Viannia* apresenta-se com o tamanho de 242 pb e os do subgênero *Leishmania* (302 pb e 451 pb). Foi possível amplificar por PCR a região de mini-éxon alguns dos isolados demonstrando-se que a amostra IM5707 isolada de *L. dendrophyla* com sangue em decomposição e flagelados no intestino posterior do trato digestório apresentou produto amplificado em torno de 242pb, assim como os isolados IM5719, IM5721 e IM5720 com sangue fresco, considerados como *Leishmania* subgênero *Viannia* (Figura 5). Também foi observado que o isolado humano IM5744 apresentou produto amplificado de 242pb. A amostra IM5728 de *L. dendrophyla* com sangue em decomposição e flagelados na região do intestino posterior apresentou produto amplificado com cerca de 400pb não observado em cepas de referência de parasitos do gênero *Leishmania* (Pinheiro, 2004).

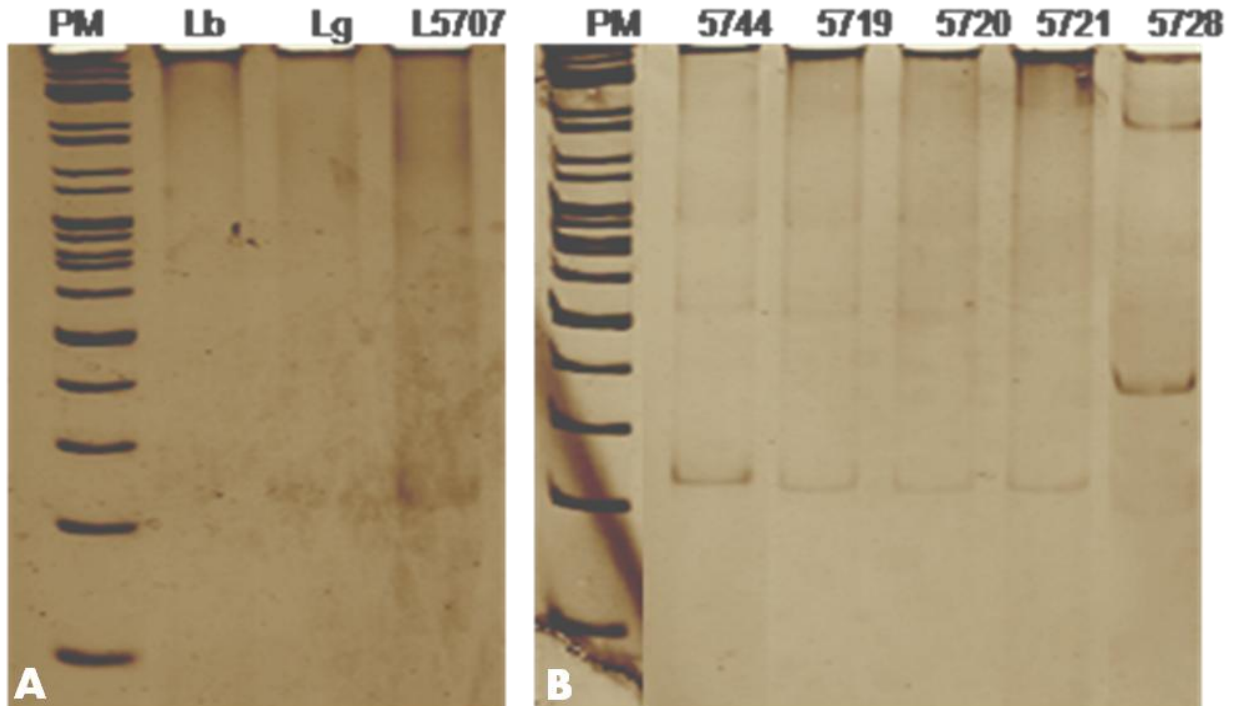


Figura 5. Produtos da amplificação da região de mini-éxon. Gel de poliacrilamida 12% corado por nitrato de prata, corrida de eletroforese em tampão TAE 1X. 6a: 1° poço - PM- marcador de peso Molecular 100pb; 2° e 3° poços: cepas de referência (*L. braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*); 4°poço: isolado de SGC 5707; 6b: 1° poço - PM- marcador de peso Molecular 100pb; 2° ao 6° poços: isolados de SGC 5744, 5719, 5720, 5721 e 5728.

Da avaliação das sequências obtidas com o programa de edição e alinhamento no site NCBI (National Center for Biotechnology Information) dos fragmentos de DNA sequenciados, dos 20 isolados de flebotomíneos e cinco de humanos, apenas 11 amostras foram adequadas ao estudo. Verificou-se a formação de dois grupos distintos, sendo nove isolados com características biológicas similares ao subgênero *Viannia* (A e B) e dois para o subgênero *Leishmania* (grupo C). Das sequências que agruparam para o grupo A, duas eram de humano, cinco de *L. dendrophyla* e uma *L. shannoni*. Um dos isolados de *L. dendrophyla* IM 5715, com

sangue fresco e flagelados na região posterior do trato digestório foi considerado de acordo com o agrupamento como tipo B. Para o subgênero *Leishmania* (grupo C), uma era de humano e a outra de *L. dendrophyla* (Figura 6).

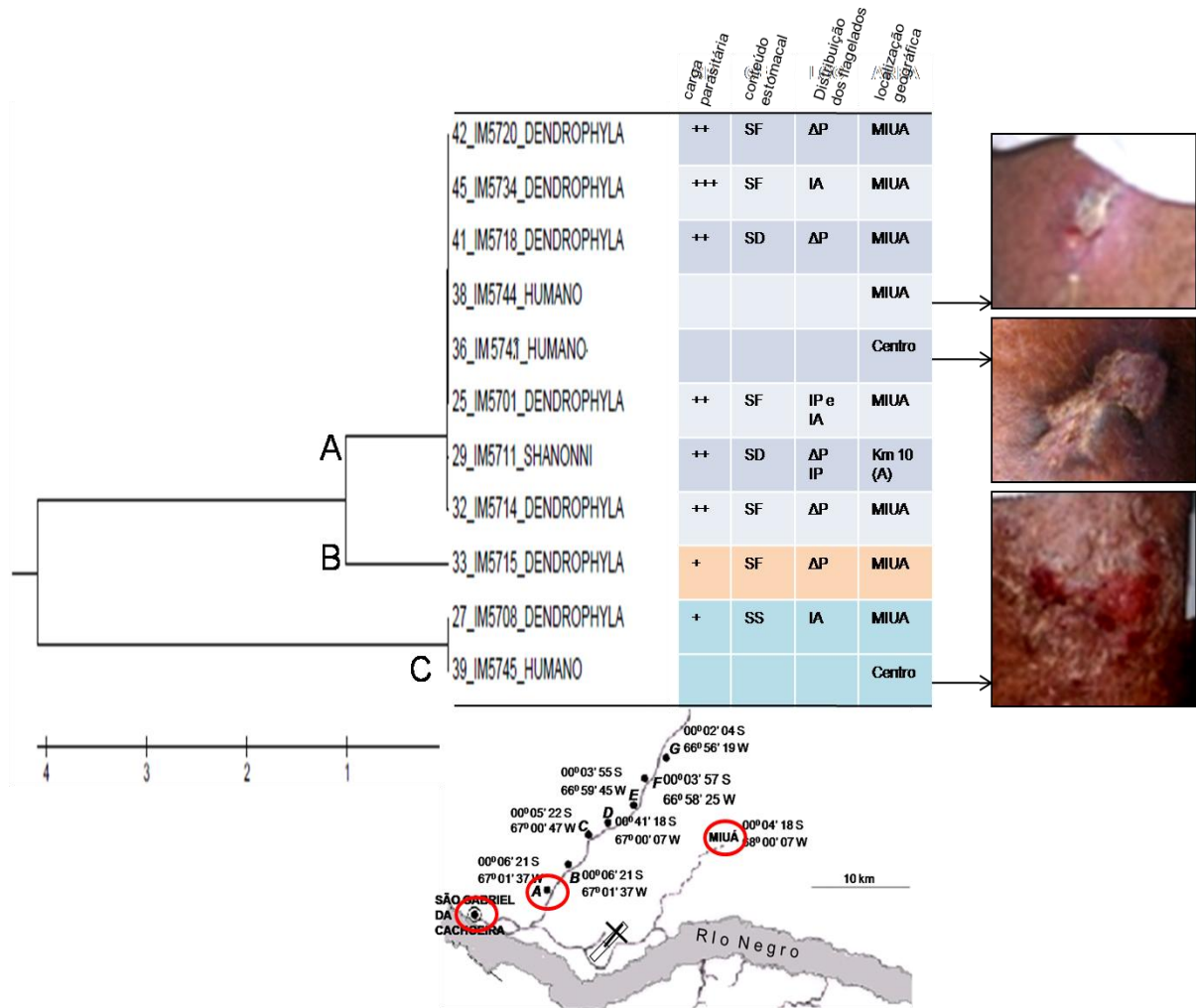


Figura 6. Dendrograma do sequenciamento segundo o algoritmo de neighbor-joining (NJ) dos isolados de SGC com a formação de três grupos com características biológicas similares para os subgêneros *Viannia* (A, B) e *Leishmania* do gênero *Leishmania* (C). Abaixo mapa com a localização (em vermelho) da coleta dos isolados humanos e de flebotomíneos, nos quais foram agrupados de acordo com o sequenciamento da região de ITS.

As sequências da região ITS dos isolados IM 5701, IM 5714, IM5718, IM5744, IM5741, IM5720, IM5711, IM5734 quando agrupadas com as sequências das espécies *L. (V.) guyanensis* (código de depósito AJ000300), *L. (V.) guyanensis* (AJ0003000), *L. (V.) panamensis* (FJ948440) e *L. (V.) braziliensis* (JQ061322) do *GenBank* apresentaram valores de similaridade (*bootstrap*) baixo de cerca de 64, 99 e 66% (figura 6). Enquanto os isolados IM5708 e IM5745 não se agruparam com espécies do subgênero *Viannia* e nem com *Leishmania* (*L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*) [figura 7].

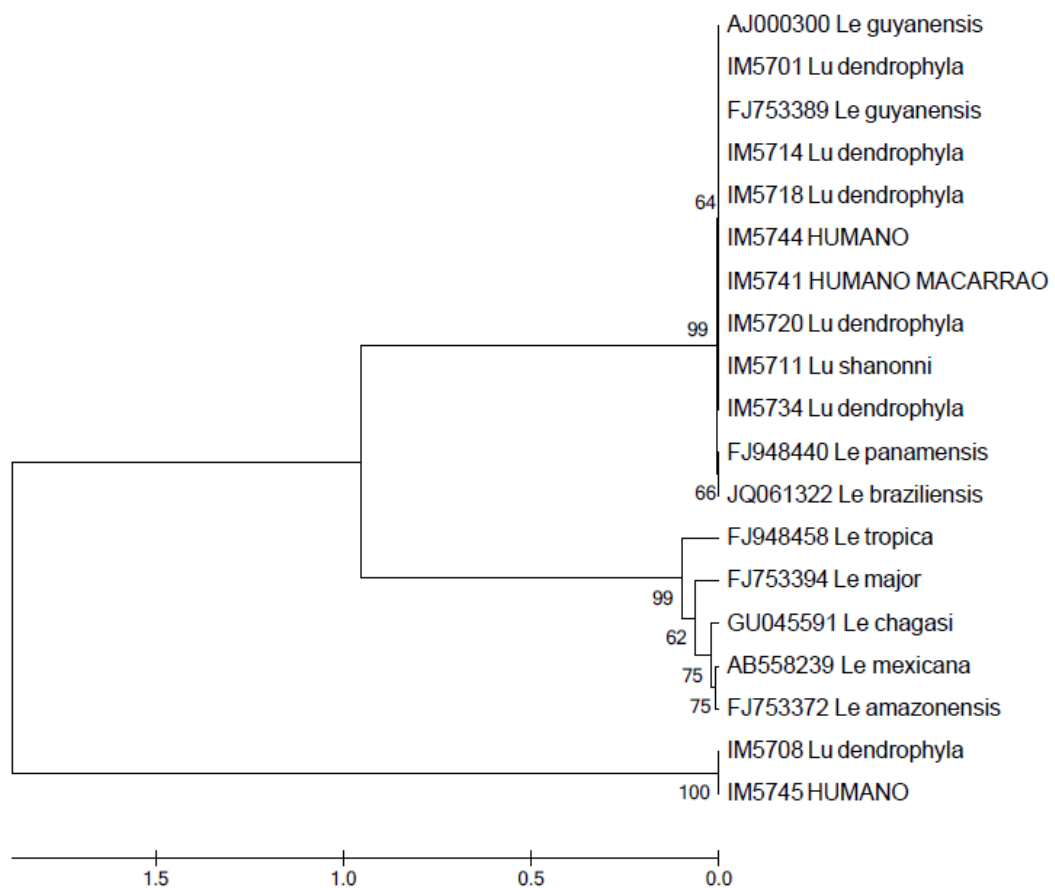


Figura 7. Dendrograma construído a partir de sequências da região ITS do rDNA dos isolados de São Gabriel da Cachoeira e de espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* depositadas no *GenBank*, utilizando o método *Neighbor-Joining*. Os números nos ramos se referem aos índices de *bootstrap*.

4. DISCUSSÃO

A correta indicação das espécies de vetores que ocorrem em uma área endêmica para leishmanioses, bem como a estimativa das taxas de infecção natural pelas diferentes espécies de *Leishmania*, auxiliam a compreensão da epidemiologia da doença e também na adoção de medidas de prevenção e controle (PEREZ et al., 1994; GRÜNEWALD, 1999; CARVALHO et al., 2008).

Até então, em SGC existia uma lacuna a respeito das prováveis espécies de vetores da Leishmaniose, pois o único levantamento realizado nesta área foi por Fé et al. (1998), mas este não direcionou o estudo para avaliar a infecção natural desses insetos. Assim como, coletou apenas 795 espécimes. Neste estudo o autor realizou levantamento em duas áreas de SGC (Morro de Fortaleza e Porto de Camanaus).

Lutzomyia dendrophyla foi uma das espécies mais frequentes nas coletas (Capítulo 1). Assim como, a maior taxa de infecção por tripanossomatídeos com 3,66% (36/981), mas segundo o CIPA (Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America), esta espécie não é incriminada como vetora de *Leishmania*. Entretanto, Freitas et al. (2002) realizando trabalho em uma área de Porto Grande no Amapá encontraram *L. dendrophyla* infectada com flagelados, sugerindo que fosse *Endotrypanum* devido a localização do flagelado nos tubos de Malpighi, mas após a caracterização isoenzimática o parasito apresentou perfil similar a *L. (V.) guyanensis*.

Segundo Killick-Kendrick e Ward (1981) e Killick-Kendrick (1990), certos critérios são exigidos para incriminar uma espécie como transmissora de *Leishmania*, como, apresentar: alto grau de antropofilia, infecção natural pelo

protozoário, o desenvolvimento do parasito no intestino na ausência de sangue e o parasito isolado do inseto deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos e a sua distribuição espacial coincidente com a doença.

Neste estudo quatro indivíduos de *L. dendrophyla* que estavam parasitados não apresentaram sangue no intestino e os parasitos ali encontrados provavelmente já teriam ultrapassado as barreiras imposta pela matriz peritrófica do intestino do inseto e conseguido colonizar o trato digestório. Conforme Pimenta et al. (2012), O parasito precisa vencer diversos obstáculos para completar o seu desenvolvimento no vetor. A expressão de moléculas específicas do próprio parasito tem se mostrado um evento crucial para esse processo. A ação de enzimas digestivas produzidas pelo intestino do vetor pode matar os parasitos presentes no bolo sanguíneo; a matriz peritrófica constitui uma barreira física para a sua migração para a parte anterior do intestino e a excreção do bolo fecal pode resultar na perda da infecção.

Para Lainson e Rangel (2003), essas barreiras naturais existentes nos flebotomíneos vão conduzir a resistência ou a suscetibilidade do inseto à infecção por protozoários. Conseqüentemente estes fatores determinarão a competência vetorial do inseto.

A infecção de flebotomíneo com *Leishmania* pode persistir por 15 dias, e alguns fatores são incriminados por Adler e Theodor (1957) como determinantes por afetar neste prazo: quantidade de sangue ingerido e tempo de digestão do alimento sanguíneo.

Em um segundo momento foi encontrado a mesma espécie com sangue fresco e os oócitos estavam nos estágios de desenvolvimento III, IV ou V, sugerindo que esta espécie teria realizado um segundo repasto sanguíneo (ADLER e THEODOR, 1957; TESH, 1988; BRAZIL e BRAZIL, 2003). Tanto as fêmeas como os

machos se alimentam de fontes de açúcar para produzir energia e manter a homeostasia (AZEVEDO et al., 2011), no entanto as fêmeas também necessitam de sangue na alimentação, para possibilitar a maturação de seus ovos (MONTEIRO, 2012).

Foram enfrentadas dificuldades para a manutenção dos isolados em cultivo, pois os mesmos não se expandiam após alguns repiques, o que tornou impossível a caracterização dos seguintes isolados: IM5712, IM5713, 5718, IM5726, IM5728, IM5739 e IM5890. É sabido que a escolha do meio de cultura pode afetar o índice de crescimento de *Leishmania*, já que os meios ao conter sangue ou soro, podem variar em sua composição química e provocar mudanças no metabolismo das células nele cultivadas (MELO, 1982), no entanto, meios enriquecidos foram utilizados. Também é sabido que espécies do sub-gênero *Viannia*, em particular, *L. (V.) braziliensis* são de difícil crescimento *in vitro* e demorada produção de lesões cutâneas em animais experimentais.

Conforme Hanham et al. (1990) e Al-Taqi e Evans, (1978), as espécies *L. (V.) colombiensis* e *L. (L.) venezuelensis* apresentaram certa dificuldades na manutenção de seus cultivos. Observaram que esses parasitos após alguns repiques em meio NNN não conseguiam mais se multiplicar.

Não obstante, outra observação importante em relação aos isolados, foi o acompanhamento dos animais de experimentação (*Mesocricetus auratus*), os quais não apresentaram desenvolvimento de lesão, após inoculação de isolados tanto de flebotomíneos quanto de humano, o acompanhamento destes isolados nestes animais foi num período de um ano. Segundo alguns autores *Endotrypanum* sp., *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) colombiensis* têm a característica de não apresentarem a

formação de lesões cutâneas visíveis nestes animais (ARIAS et al., 1985; NAIFF et al., 1989; KREUTZER et al., 1991).

A distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) indica que a espécie *L. (V.) braziliensis* é predominante ao sul do rio Amazonas (LAINSON, 1983), enquanto que na região de Manaus (norte do rio Amazonas) é a *L. (V.) guyanensis* (ROMERO et al., 2002; VAN DER MEIDE et al., 2008). No entanto, pouco se conhece sobre a distribuição geográfica dos casos de LTA em SGC (alto rio Negro), a fauna de vetores e muito menos das espécies que circulam nesta região, sendo este o primeiro estudo realizado nesta área com esta finalidade. Os pacientes atendidos no HGU/SGC que apresentavam lesões suspeitas de LTA apresentavam lesões com aspectos que variavam de uma úlcera simples até em forma de placa, muito comum em lesões causadas por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. Geralmente, a classificação clínico-dermatológica das lesões leishmanióticas é baseada em critérios bem definidos (TALHARI et al., 1988; FRANÇA, 1999), porém está sujeita à interpretação pessoal do examinador, podendo ocorrer algum grau de subjetividade.

Padrões das lesões dos pacientes atendidos em SGC, principalmente o IM5742, são similares também às causadas por *L. (L.) venezuelensis*, pois de acordo com Bonfante-Garrido (1980) e Lainson (2010), essa espécie provoca lesões cutâneas simples ou múltiplas, muito comum nas leishmânias do subgênero *Leishmania*. Apesar da espécie *L. (V.) colombiensis*, do subgênero *Viannia*, também apresentar as mesmas características das lesões (Lainson, 2010). Tais fatos são relevantes para a área estudada, pois o município de SGC faz fronteira com os países Colômbia e Venezuela.

Na eletroforese de isoenzimas, as enzimas G6PDH e ME são consideradas como diagnósticas para *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (CUPOLLILLO et al., 1994). Neste estudo não houve similaridade dos alelos com as cepas de referência utilizadas.

A análise dos produtos da reação de amplificação da região de mini-éxon de algumas das amostras (5707, 5744, 5719, 5720, 5721, 5728) amplificaram um produto de cerca de, 242 pb comumente encontrado em leishmânias do subgênero *Viannia* (PINHEIRO, 2004). Resultado este compatível com as características biológicas - localização no inseto, e o agrupamento obtido com a análise do sequenciamento da região de ITS.

Outros iniciadores da região de mini-éxon já foram utilizados com sucesso na identificação de *Leishmania* em insetos infectados experimentalmente (PAIVA et al., 2004; 2006). Já Marfurt et al. (2003) concluíram que a variação existente no gene de mini-éxon, permite que eles sejam utilizados para distinguir entre os gêneros da família Trypanosomatidae.

Katakura et al. (2003), utilizando iniciadores da região de mini-éxon avaliaram a estreita relação entre a espécie *L. (V.) equatorensis* e o gênero *Endotrypanum*, sugerindo a necessidade de novos estudos com o intuito de analisar esta espécie de *Leishmania* e sua similaridade com *E. monterogei*.

Após a realização do BLAST, as sequências (IM 5701, IM 5714, IM5718, IM5744, IM5741, IM5720, IM5711, IM5734) apresentaram perfis correspondentes as espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis*. Não corroborando com a caracterização isoenzimática dos isolados (IM5701, IM5711, IM5714 e IM5741). Para Cupollilo et al., (1994) o loco G₆PDH é um dos considerados diagnóstico para *L. (V.) guyanensis*.

Em relação às sequências IM5708 e IM5745, as quais não alinharam com nenhuma espécie depositada no GenBank, possivelmente trata-se de uma espécie nova ou híbrido.

É sabido que os mecanismos pelo quais os parasitos se tornam híbridos ainda não está bem esclarecido. Entretanto há evidência de reprodução sexual entre os organismos, onde fenômenos de recombinação genética (BĀNULUS et al., 1997) podem explicar a existência de híbridos em *Leishmania* detectados na natureza (DARCE et al. 1991; BONFANTE-GARRIDO et al., 1992; DELGADO et al. 1997). Tibayrenc e Ayala (1999) em trabalho sobre evolução genética do parasito sugerem que a recombinação genética entre *Leishmania* seria possível, porém rara em condições naturais. Estudos relatam que híbridos ocorrem essencialmente entre espécies próximas, como *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* ou *L. (V.) peruviana* (THOMAZ SOCCOL, 1993; BANULS et al., 1997; TORRICO et al., 1999).

Ravel et al. (2006), descreveram a ocorrência de híbridos naturais entre *L. (L.) infantum* e *L. (L.) major*. Na natureza, estas duas espécies de *Leishmania* são transmitidas por diferentes insetos vetores a distintos reservatórios. A descoberta de híbridos naturais entre espécies tão divergentes veio levantar a questão sobre o processo de troca genética neste parasito e a possível circulação de híbridos em condições naturais (RAVEL et al., 2006).

Coelho (2010) ao caracterizar as espécies de *Leishmania* spp. em amostras isoladas de pacientes com LTA de área endêmica da região Norte, observou a presença de infecção mista em cerca de 13% (26/209) dos isolados, e a espécie *L. (V.) guyanensis* estava presente na maioria das infecções.

Para um melhor esclarecimento a respeito das sequências IM5708 (*L. dendrophylla*) e IM5745 (humano), novas análises serão necessárias, assim como a clonagem das PCRs das referidas sequências.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados neste estudo concluiu-se que: a espécie *L. dendrophylla* está envolvida no ciclo de transmissão de *Leishmania* sp. no município de SGC. Além disso, a presença de pelo menos três espécies de *Leishmania* circulando entre os flebotomíneos e humanos na região, sendo uma do subgênero *Leishmania*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M.Z.; KUHLS, K.; SCHWEYNOCH, C.; SUNDAR, S.; RIJAL, S.; SHAMSUZ-ZAMAN, A.K.; RAJU, B.V.; SALOTRA, P.; DUJARDIN, J.C.; SCHONIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of *Leishmania donovani* strains in the Indian subcontinent. *Infect Genet Evol* 9: 24-31. 2009.
- ADLER, S.; THEODOR, O. Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. *Annual Review of Entomology* 2: 203-226. 1957.
- AI-TAQI, M.; EVANS, D.A. Characterization of *Leishmania* spp. from Kuwait by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72: 56-65. 1978.
- ARIAS, J.R.; FREITAS, R.A. Flebotomos da Amazônia Central do Brasil I. Resultados obtidos das capturas feitas com isca humana e equina (Diptera: Psychodidae). *Acta Amazonica* 7: 507-527. 1977.
- ARIAS, J. R.; MILES, M. A.; NAIFFI, R. D.; POPOVA, M. M.; FREITAS, R. A.; BIANCARDI, C. B.; CASTELLON, E. G. Flagellates infections of Brazilian sandflies

(Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* e *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34:1098-1108. 1985.

AZEVEDO, E. M. R.; DUARTE, S. C.; COSTA, H. X.; ALVES, C. E. F.; SILVEIRA NETO, O. J.; JAYME, V. S.; LINHARES, G. F. C. Estudo da leishmaniose visceral canina no município de Goiânia, Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 40(2): 159-168, 2011.

BANULS, A.L.; GUERRINI, F.; LE, P.F.; BARRERA, C.; ESPINEL, I.; GUDERIAN, R. Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 44: 408-411. 1997.

BRITO, M.E.F.; ANDRADE, M.S.; MENDONÇA, M.G. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest of northeastern Brazil. *Trop Med Inter Heal*, 14:1–9. 2009.

BOTILDE, Y.; LAURENT, T.; QUISPE TINTAYA, W.; CHICHARRO, C. CANAVATE, C.; CRUZ, I.; KUHL, K.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J.C. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection, genetics and evolution*, 6: 440-446. 2006.

BRAZILL, B.G.; BRAZIL, R.P. Preparation of Sand Fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Specimens for Histological Studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(2): 287-290. 2003.

BONFANTE-GARRIDO, R.; BARRETO, T. Leishmaniasis tegumentaria americana en el Distrito Urdaneta. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 1980.

BONFANTE-GARRIDO, R.; MELENDEZ, E.; BARROETA, S.; DE ALEJOS, M. A.; MOMEN, H.; CUPOLILLO, E.; McMAHON-PRATT, D.; GRIMALDI Jr., G. Cutaneous leishmaniasis in western Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86:141-148. 1992.

- CAMARGO, E.P. *Phytomonas* and other tripanosomatid parasites of plants and fruits. *Adv. Parasitol.* 42: 29-112. 1999.
- CARVALHO, G.M.; ANDRADE FILHO, J.D.; FALCAO, A.L.; ROCHA LIMA, A.C.; GONTIJO, C.M. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8: 407-414. 2008.
- COELHO, L.I.A.R.C. Caracterização de *Leishmania* spp. em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Região Norte, Brasil. Tese de Doutorado em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/ 2010.
- CUERVO, P.; de JESUS, J.B.; JUNQUEIRA, M.; MENDONÇA-LIMA, L.; GONZÁLEZ, L.J.; BETANCOURT, L.; GRIMALDI Jr., G.; DOMONT, G.B.; FERNANDES, O.; CUPOLILLO, E. Proteome analysis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular and Biochemical Parasitology* 154: 6–21. 2007.
- CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.Jr.; Momen, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*, 50: 250–311. 1994.
- CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 73:145–155, 1995.
- CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 663–668. 1998.
- CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L.R.; TOALDO, C.B.; de OLIVEIRA-NETO, M.P.; de BRITO M.E. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 41: 3126–3132. 2003.
- DA-CRUZ, A.M.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.; COUTINHO, S.G. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 251-256. 2002.

DARCE, M.J.; MORAN, J.; PALACIOS, X.; BELLI, A.; GOMEZ-URCUYO, F.; ZAMORA, D.; VALLE, S.; GANTIER, J.C.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr., G. Etiology of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 58-59. 1991.

DELGADO, O.; CUPOLILLO, E.; BONFANTE-GARRIDO, R.; SILVA, S.; BELFORT, E.; GRIMALDI, J.G. Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 92: 581-582. 1997.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; VIEIRA, V.P.; SANTOS, C.B. Epidemiological and clinical features of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 1003–1010. 2003.

FORATTINI, O.P. Entomologia Medica: Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose. São Paulo University, São Paulo, p. 658. 1973.

FIGUEIRA, L. D. E. P. et al. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, 41(5): 512-514. 2008.

FÉ, N.A.; FREITAS, R.A.; BARRETT, T.B. Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *douradoi* n.sp. (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 (3): 331-336. 1998.

FREITAS, R.A.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V. Species diversity and flagellate infections in the sandfly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 53-59. 2002.

HENDRICKS, L.D.; WOOD, D.E.; HADJUK, M.E. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitol.*, 76: 309-316. 1978.

- HERNANDEZ R, RIOS P, VALDES AM, PINERO D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA codig region: comparasion with other Trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 1990. 41: 2007-212.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95–98. 1999.
- HANHAM, C.A.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; MCMAHON-PRATT, D. Production of a specific monoclonal antibody for the identification of *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. *Am J Trop Med Hyg* 42: 453-459. 1990.
- KATAKURA, K.; MIMORI, T.; FURUYA, M.; UEZATO, H.; NONAKA, S.; GOMEZ, E.A.; HASHIGUCHI, Y. Identification of *Endotrypanum* sp. from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR and sequencing of the mini-éxon gene. *J Vet Med Sci* 65: 649-653. 2003.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4: 1-24. 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R.; WARD, R.D. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology*, 82: 143-152. 1981.
- KREUTZER, R.D.; SOURATY, N.; SEMKO, M.E. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 22-32. 1987.
- KREUTZER, R.D.; CORREDOR, A.; GRIMALDI, G. Jr.; GROGL, M.; ROWTON, E.D.; YOUNG, D.G.; MORALES, A.; MCMAHON-PRATT, D.; GUZMAN, H.; TESH, R.B. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida:Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg* 44: 662–675. 1991.
- LAINSON, R., 1983. The American Leishmaniasis: Some observation on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77:569-596.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, Ananindeua, 1(2): 13-32, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. Ecologia das leishmanioses. In: EF Rangel, R Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-310. 2003.

MADEIRA, M.F.; UCHÔA, C.M.A.; LEAL, C.A.; SILVA, R.M.M.; DUARTE R.; MAGALHÃES C.M.; SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 551-555. 2003.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C.L.; BECK, H.P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 3147-3153. 2003.

MELO, M.N. Cultivo de *Leishmania* em meio definido. Estudo de seus requerimentos nutricional. (Tese de Doutorado), Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Brasil, 133p. 1982.

MILES, M. A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; PÓVOA, M.; de SOUZA, A. A. Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *Leishmania braziliensis braziliensis* and *Leishmania braziliensis guyanensis*-aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. *Transactions the Royal Sociezy Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 524-529. 1981.

MOMEN, H. Parasite Characterization by zimodeme analisis. In: Morel,C.M., ed. Genes and antigens of parasites. *A laboratory manual*. Rio de Janeiro. UNPD/World Bank/WHO-FINEP, CNPq, FIOCRUZ p.111-120. 1984.

MOMEM, H.; GRIMALDI Jr., G.; DEANE, L.M. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:447-448, 1987.

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. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte. 71f. 2012.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-77. 2005.

NICOLLE, G.L. Culture du parasite du bouton d` Orient. *C.R. Acad. Sci.*, 146842-843. 1908.

NOVY, F.G.; MACNEAL, W. J. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. *J. Inf. Dis.* 1:1-30. 1904.

NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; FREITAS, R.A. Isolation of *Trypanosoma freitasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Psychodopygus claustris* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 273-275. 1989.

NAIFF, R.D.; TALHARI, S.; BARRETT, T.V. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 529–530. 1988.

OLIVEIRA, R.P.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol Today* 13: 196-200. 1997.

PAIVA, B. R.; PASSOS, L. N.; FALQUETO, A.; MALAFRONTTE, R. S.; ANDRADE, H. F. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46(6): 335-338. 2004.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.; NASCIMENTO, J.C.; PIMENTA, P.F. GALATI, E.A., JUNIOR, H.F.; MALAFRONTTE, R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-éxon gene PCR. *Acta Trop* 99: 252-259. 2006.

PEREZ, J.E.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; LOPEZ, M.; MONJE, J.; PAZ, L. NIETO, E.; AREVALO, J.; GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 161-164. 1994.

PINHEIRO, F.M.G. 2004. Infecção Natural em *Lutzomyia (N.) umbratilis*; Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae; Plebotominae) por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no estado do Amazonas, Brasil. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 114 p., Dissertação de Mestrado em Entomologia. 2004.

RAVEL, C.; CORTES, S.; PRATLONG, F.; MORIO, F.; DEDET, J.P.; CAMPINO, L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int. J. Parasitol.*, 36: 1383-1388. 2006.

REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61:530-541. 1999.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581–596. 2007.

RODAS, L.A.C.; POLETTTO, D.W. Leishmaniose Visceral Americana. Superintendência de Controle de Endemias SUCEN, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, 2001.

ROMERO, G.A.; ISHIKAWA, E.; CUPOLILLO, E.; TOALDO, C.B.; GUERRA, M.V.; PAES, M.G. Therarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 96:131–6. 2002.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil XXIV. Natural flagellate infections of sandfly (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania (Leishmania) brasiliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 353-359. 1987.

SAITO, N.; NEI, M. The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425. 1987.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, W.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SHAW, J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 541-547. 2007.
- SILVA, O.S.; GRUNEWALD, J. Contribution to the sandfly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 579-582. 1999.
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect. Chemotherap.* 10: 307-315. 2004.
- TALHARI, S.; ARIAS, Jr.; CUNHA, M.G.S.; NAIFF, R.D.; NAIFF, M.F.; FREITAS, R.A.; BARRETT, T.V. Leishmaniose no Estado do Amazonas – Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. *An Bras Dermatol* 63: 433-438, 1988.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599. 2007.
- TESH, R.B. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annual Review of Entomology* 33:169-181. 1988.
- THOMAZ-SOCCOL, V. *Les Leishmania du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relations phylogénétiques avec les Leishmania de l'Ancien Monde.* Montpellier, France. These de doctorat, Médecine, 190 p. 1993.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Evolutionary genetics of Trypanosoma and Leishmania Microbes. *Infect.*, 1: 465-472. 1999.
- TOJAL, A.C.; CUPOLILLO, E.; VOLPINI, A.C.; ALMEIDA, R.; ROMERO, G.A.S. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health* 11: 1388-1398. 2006.
- TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.B.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.L.; BARBOSA, J.A.L.; BARBOSA, J.E.R.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J.J. The first Record of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically

as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasit.*, 149: 280-284. 2007.

TORRICO, M.C.; DE DONCKER, S.; AREVALO, J.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J.C. In vitro promastigote fitness of putative *Leishmania* (Viannia) braziliensis/*Leishmania* (Viannia) peruviana hybrids. *Acta Tropica*. Jan 15;72(1):99-110. 1999.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*, 23:91–92. 2007.

VAN DER MEIDE, W.; GUERRA, J.; SCHOONE, G.; FARENHORST, M.; COELHO, L. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J Clin Microbiol* 46: 73–78. 2008.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* 54: 1-881. 1994.

9. DISCUSSÃO GERAL

Desde 1903, quando o gênero *Leishmania* foi descrito por Ross, o número de espécies identificadas neste grupo, continua crescendo. Nas Américas são conhecidas 14 espécies dermatólicas de *Leishmania*, causadoras de doença humana e somente uma espécie agente da doença visceral, *Leishmania (L.) chagasi* (GRIMALDI e TESH, 1993).

Atualmente no Brasil, há registro de sete espécies que são agentes etiológicos da LTA: *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (LAINSON et al., 1994; FURTADO e VALE, 2005; LAINSON, 2010). Destas quatro circulam no Amazonas: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* (ARIAS e NAIFF, 1981; PAES, 1991).

O Estado do Amazonas, por sua diversidade de ecossistemas e extensão geográfica, os estudos dos elos que compõem a cadeia de transmissão das leishmanioses são necessários para elucidar os ciclos que ocorrem na região (LAINSON e SHAW, 1972; TALHARI et al., 1988; BARRETT et al., 1989; GUERRA et al., 2006). Assim, levantamentos entomológicos que objetivem demonstrar a fauna flebotomínica devem fazer parte do estudo epidemiológico em áreas endêmicas ou regiões onde o conhecimento a respeito da população de insetos vetores e da circulação do agente etiológico, é escasso ou inexistente (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994).

Vários estudos ao longo dos anos vêm demonstrando o comportamento da ecoepidemiologia das leishmanioses em alguns municípios do Amazonas (ARIAS e NAIFF, 1981; CASTELLÓN et al., 1994; BARRET et al., 1996; BARROS et al.,

1998), seja no aspecto da fauna de flebotomíneos (ARIAS e FREITAS, 1977; 1982; PAES, 1991; BARRETT et al., 1996; FEITOSA et al., 2004; DIAS-LIMA et al., 2002; NERY, 2002; GOMES, 2002; SILVA et al., 2007), reservatórios (ARIAS et al., 1981; NERY, 2002; GUERRA et al., 2002; 2006; 2007) e aspectos clínicos e terapêuticos (BARROS et al., 1982; TALHARI et al., 1988; ANDRADE et al., 1997; ANDRADE, 1997; GUERRA et al., 2006; NAIFF-JUNIOR et al., 2009).

Entretanto ainda são escassos os estudos referentes à problemática desta doença nas localidades distantes da capital, principalmente em áreas de fronteira. Trabalhos pioneiros nestas áreas como de Fé et al. (1998) em São Gabriel da Cachoeira, no qual realizaram o primeiro levantamento da entomofauna na região e; Veloso, 2012 (Tabatinga), onde averiguou os aspectos epidemiológicos e entomológicos da leishmaniose corroboram ampliando informações de áreas no qual é comum a escassez de dados nas áreas longínquas do Amazonas.

Conforme alicerce dos estudos sobre a dinâmica da leishmaniose em áreas amazônicas, neste trabalho primeiramente objetivou-se realizar levantamento da fauna flebotomínica do município de São Gabriel da Cachoeira (SGC), área de fronteira com a Colômbia e Venezuela. Devido o único estudo com esta finalidade ter sido realizado por Fé et al. (1998) na década de noventa.

Dos 6832 flebotomíneos coletados nesse estudo, 50 espécies foram identificadas, sendo 49 do gênero *Lutzomyia* e uma do gênero *Brumptomyia*. É sabido que no Brasil, *Lutzomyia* é o grupo mais estudado devido apresentar espécies com papel vetorial na transmissão dos agentes causais das leishmanioses (GRIMALDI et al., 1991; GIL et al., 2003; RANGEL e LAINSON, 2003). No entanto em SGC, foi possível constatar que algumas espécies do gênero *Lutzomyia* registradas no município tem participação na transmissão de *Leishmania* ou outra

espécie de tripanossomatídeo no Amazonas (LAINSON et al., 1994; YOUNG e DUNCAN, 1994) e no Brasil (ARIAS et al. 1985; RYAN et al., 1987; SILVEIRA et al., 1991; YOUNG e DUNCAN, 1994), como é o caso das espécies: *L. ayrozai*, *L. dendrophyla*, *L. davisii*, *L. flaviscutellata*, *L. shannoni*, *L. anduzei* e *L. chagasi*, além também de espécies comuns nos países Venezuela e Colômbia que fazem fronteira com o município de SGC (*L. gomezi*, *L. davisii*, *L. scaffii* e *L. yuilli*) [CORREDOR et al., 1990; SARAIVA et al., 1998; OVALLE et al., 2006; URBANO et al., 2011].

Na área estudada foi observado um índice de diversidade considerável ($H'=1,19$), reforçado por estudos anteriores de Fé et al. (1998) que apresentaram um índice de $H'=2,86$. Em áreas adjacentes a fronteira do município, Bejarano et al. (2002), avaliando a associação de flebotomíneos em focos de leishmaniose na cidade de Sincelejo, Colômbia, obtiveram um índice de diversidade de $H'=0,38$, ao coletar um total de seis espécies de 486 espécimes do gênero *Lutzomyia*. Vívero et al. (2010) no mesmo País, constatou uma diversidade de flebotomíneos de $H'=0,843$ no departamento de Vichada, coletando um total de 182 insetos pertencentes a 15 espécies do gênero *Lutzomyia*.

Distinto ao trabalho de Fé et al. (1998), onde não foi capturado nenhum espécime de *L. dendrophyla*, neste estudo foi a terceira espécie mais abundante, sendo a primeira *L. ayrozai* a segunda *L. georgii*.

A correta identificação das espécies de vetores que ocorrem em uma área endêmica para leishmanioses, bem como a estimativa das taxas de infecção natural pelas diferentes espécies de *Leishmania*, auxiliam a compreensão da epidemiologia da doença e também na adoção de medidas de prevenção e controle (PEREZ et al., 1994; SILVA e GRÜNEWALD, 1999 CARVALHO et al., 2008).

Das espécies coletadas e dissecadas, a que chamou atenção foi *L. dendrophyla*, por ter sido a que apresentou a maior taxa de infecção natural por tripanossomatídeos (3,66%). Conforme Michalsky et al. (2002), apesar da existência de relatos de encontros desses protozoários no tubo digestório de flebotomíneos, a natureza dessas infecções por *Leishmania* só pode ser determinada pela realização de técnicas de isolamento ou inoculações experimentais.

Ainda em relação a *L. dendrophyla*, esta espécie poderá alavancar questionamento sobre o seu papel na transmissão de *Leishmania* no município de SGC, quíça no Amazonas fato este agregado à observação dos dados biológicos deste flebotomíneo como: a localização do parasito no trato digestório do inseto (suprapilaria) [LAINSON E SHAW, 1987] além da ausência de sangue na presença de parasito (KILLICK-KENDRICK, 1990), além das condições dos oócitos nos ovários (ADLER e THEODOR, 1957).

Conforme Freitas et al. (2002), esta espécie foi encontrada infectada com flagelados em Porto Grande no Amapá, os mesmos sugeriram que fosse *Endotrypanum* devido a localização dos flagelados nos tubos de Malpighi, mas após a caracterização isoenzimática o parasito apresentou perfil similar a *L. (V.) guyanensis*.

Vários estudos têm revelado as dificuldades envolvidas na detecção de *Leishmania* através do método de dissecção do trato digestório, mostrando geralmente taxas de infecção abaixo de 1% para distintas áreas endêmicas no Brasil (GALATI et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 1999; LUZ et al., 2000; MICHALSKY et al., 2002; PINHEIRO, 2004) e também em outros países da América do Sul (FELICIANGELI et al. 1994; SARAIVIA et al., 1998; JORQUERA et al., 2005; OVALLE et al., 2006; URBANO et al., 2011). Atualmente, ferramentas moleculares

vêm substituindo a dissecação, por permitir a detecção de DNA de um único parasito (MICHALSKY et al., 2002; PITA-PEREIRA et al., 2005) e representar um método de diagnóstico mais sensível do que a dissecação seguida de microscopia (NASCIMENTO et al., 2007).

Aliado a estas ferramentas, a escolha de um marcador molecular específico é indispensável. Dentre estes, o gene de mini-éxon tem sido utilizado na identificação de *Leishmania* e na avaliação da taxa de infecção em flebotomíneos por este flagelado (FERNANDES et al., 1993; KATAKURA et al., 1999; 2003; PINHEIRO et al., 2004; PAIVA et al., 2006; ALBUQUERQUE, 2009). Uma das principais características desse gene é estar presente em todos os membros da família Trypanosomatidae, incluindo os gêneros que infectam invertebrados: *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*, mas ausente nos mamíferos e flebotomíneos (FERNANDES et al., 1993).

No Amazonas, Pinheiro (2004) utilizou o gene de mini-éxon para detectar infecção natural em flebotomíneos por tripanossomatídeos em uma área endêmica para Leishmaniose. Nesse estudo, o gene foi utilizado com o mesmo objetivo nas espécies vetoras coletadas em SGC (*L. ayrozai*, *L. dendrophyla*, *L. davisii*, *L. flaviscutellata*, *L. shannoni*, *L. anduzei*, *L. scaffii*, *L. amazonensis*, *L. yuilli*, *L. paraensis*, *L. umbratilis*, *L. olmeca nociva* e *L. gomezi*). Além de comparar a infecção natural com amostras de *L. umbratilis* (principal vetor de *Leishmania* no Amazonas) coletadas em uma área endêmica de Manaus. A espécie *L. dendrophyla* foi incluída nesta análise, mesmo não sendo considerada como sendo vetora segundo o CIPA (1999), por apresentar a maior taxa de infecção natural nesse estudo pelo método de dissecação.

A taxa de infecção natural em *L. umbratilis* avaliada pela LN-PCR foi de 47% (332/720), mostrando-se um bom resultado nas amostras coletadas em Manaus, frente aos estudos realizados no Brasil, cuja estimativa de taxas de infecção são de 0,4% na Bahia e no Maranhão (MIRANDA et al., 2002; OLIVEIRA-PEREIRA, et al., 2006), 0,7% no Mato Grosso (MISSAWA et al., 2010), 0,9% em Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008), 2%, 1,1% e 0,3% nos Municípios do Rio de Janeiro, Corumbá e Porto Alegre, respectivamente (PITA-PEREIRA et al., 2005; 2008; 2009). Por outro lado, a mesma metodologia empregada nas amostras oriundas de SGC, obteve resultado negativo. Não obstante que outros indivíduos de *L. dendrophyla*, *L. shannoni* e *L. anduzei* quando direcionados para serem analisados pela técnica de dissecação nesse estudo, verificou-se infecção por flagelados. Apesar de, se for feita uma comparação, como a taxa de infecção geralmente é baixa em áreas endêmicas o número total de espécimes de SGC testados pela PCR possa talvez ter influenciado quanto a sua negatividade, o que não suporta a ausência de infecção por flagelados nesta área.

Aprimorar e introduzir ferramentas moleculares na detecção de infecção natural em flebotomíneos e na identificação da *Leishmania*, a qual possibilite detectar poucos flagelados, tem sido fundamental no auxílio nos estudos epidemiológicos das Leishmanioses (MICHALSKY et al., 2002; PINHEIRO et al. 2004; PAIVA et al., 2007).

Não obstante o resultado ter sido negativo nas amostras de SGC em relação a avaliação de infecção natural pela LN-PCR, utilizando os iniciadores descritos por Cruz et al. (2002). A mesma metodologia foi empregada na identificação das espécies dos isolados oriundos de flebotomíneos (IM5707, IM5719, IM5720, IM5721,

IM5728) e humano (IM5744), os quais produziram ampliações de 242 pares de base (pb), correspondente ao subgênero *Viannia* (242pb), conforme Pinheiro (2004).

Segundo Lainson (2010), as espécies deste grupo circulam no Amazonas e nos países Colômbia e Venezuela, entre elas: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) colombiensis* e *L. (V.) naiffi* (LAINSON, 2010; COELHO et al., 2011). Alias neste estudo foram coletados os respectivos vetores ou suspeitos de transmitirem essas leishmânias: 1) *L. umbratilis* e *L. anduzei* vetores de *L. (V.) guyanensis*; 2) *L. davisii*, *L. ayrozai* e *L. paraensis* vetores de *L. (V.) naiffi* e 3) *L. gomezi* vetor de *L. (V.) colombiensis* na Colômbia (RANGEL e LAINSON, 2003).

Em relação a espécie *L. (V.) braziliensis*, as incertezas referentes à exata distribuição geográfica desta *Leishmania*, dificultam a identificação de todos os seus vetores. Porém, pelo menos no Brasil, onde o parasito já foi registrado em todos os estados, está claro que há várias espécies de flebotomíneos envolvidas em sua transmissão, incluindo *L. intermedia*, *L. whitmani strictu sensu*, *L. wellcomei*, *L. migonei* e *L. neivae* (LAINSON, 2010). Já no Amazonas existe uma lacuna a respeito dos flebotomíneos incriminados como vetores desta espécie (RANGEL e LAINSON, 2003).

Aliada a metodologia de PCR, foi também empregada a técnica de isoenzimas para a identificação dos isolados, com as enzimas (PGM, G6PDH e GPI), principalmente aqueles cuja identificação não foi possível pela PCR (IM5701, IM5705, IM5710, IM5711, IM5714, IM5717, IM5719, IM5723, IM5729, IM5736, IM5739, IM5741). Sendo que os mesmos não apresentaram perfil similar as espécies de leishmânias e endotrípano utilizadas no estudo. Esta técnica foi estabelecida como padrão ouro na identificação de espécies de *Leishmania* por ser bastante sensível (MARZOCHI et al., 1980; HANHAM et al., 1990; ISHIKAWA et al.,

2002; CUPOLLILO et al., 2003; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2006). No entanto, esta metodologia apresenta limitações, pois é uma técnica muito laboriosa e requer grandes volumes de culturas “*in vitro*” de parasitos. Uma das vantagens desta técnica é o seu caráter codominante, que pode facilmente identificar perfis heterozigóticos (SCHÖNIAN et al., 2003). Fato não observado com as amostras aqui estudadas.

Os métodos moleculares têm se mostrado de grande valor na identificação de tripanossomatídeos, fato importante na taxonomia, e por outro lado, no diagnóstico, terapêutica, epidemiologia e controle parasitário (KREUTZER et al., 1987; 1991; GRIMALDI et al., 1992; MINODIER et al. 1997; FRANCO et al., 1996; XIAO-SU et al., 2000; MARFURT ET AL., 2003; SHAHBAZI et al., 2008; EROGLU et al., 2011; YANG et al., 2013).

A região de ITS (região dos espaçadores intergênicos transcritos do gene de RNA), a qual foi utilizada neste trabalho vem sendo empregada para estudo de filogenia (CUPOLLILO et al 1994; 1995; 1998), construção de iniciadores (SIBAJEV et al. 2005) caracterização e diagnóstico de *Leishmania* (CUPOLLILO et al., 2003; YANG et al., 2013). Essa região é variável, flanqueada por uma região altamente conservada entre vários tripanossomatídeos como *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Crithidia*. Os iniciadores utilizados no estudo dos tripanossomatídeos se baseiam nessas sequências, sendo o “primer” **IR1** a sequência conservada da extremidade 3'terminal de SSU -5' GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA GCT GGA TCA TT- 3' e o “primer” **IR 2** a sequência 5' terminal de LSU -5' GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCA GGT CTG- 3' (HERNANDEZ et al., 1990).

Conforme Cupollilo et al. (1995) quando analisaram vários isolados de *Leishmania* do Brasil, observaram que a região de ITS apresenta um alto nível de

variação intra e interespecífica nesses tripanossomatídeos. Também muitas das amostras isoladas ou depositadas no banco de leishmanias não apresentam identificação de espécie por não apresentarem similaridade com cepas padrões ou isolados já descritos (comunicação pessoal, Antonia Franco).

Em relação aos fragmentos de DNA sequenciados neste estudo, dos 20 isolados de flebotomíneos e cinco de humanos, apenas 11 amostras foram adequadas para análise. Várias pesquisas vêm utilizando o sequenciamento de DNA ou RNA, para identificação e caracterização genômica das espécies de *Leishmania* (BLACKWELL, 1992; MINODIER et al., 1997; XIAO-SU et al., 2000; MEDEIROS et al., 2002).

Para um melhor esclarecimento a respeito das sequências IM5708 (*L. dendrophyla*) e IM5745 (humano), novas análises serão necessárias, assim como a clonagem das PCRs das referidas sequências.

Apesar de inconclusiva a determinação das espécies isoladas seja de humanos ou de flebotomíneos em SGC, verificou-se neste estudo que as amostras isoladas não apresentam o mesmo perfil das cepas de *Leishmania* até então conhecidas, mas que confirma a circulação de parasitos do gênero *Leishmania* em humanos e flebotomíneos e nos possibilita indicar o envolvimento da espécie de flebotomíneo *L. dendrophyla* como transmissor de *Leishmania* sp. na região amazônica, em particular no município de SGC, AM.

Mais estudos são necessários na região de SGC para a confirmação de *L. dendrophyla* como vetora, assim como novas análises nas sequências dos isolados, com o intuito de podemos inferir como sendo uma espécie nova, uma variante de espécie já conhecida ou realmente se tratar de um híbrido, apesar de que as análises dos loci enzimáticos testados não levarem a este resultado. Esses estudos

epidemiológicos, aliados as ferramentas moleculares são de fundamental importância na compreensão da dinâmica de certas doenças, principalmente aquelas que possuem os insetos como vetores.

10. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados observados neste estudo concluiu-se que:

1. O município de São Gabriel da Cachoeira apresenta um índice de diversidade na fauna flebotomínica de $H' = 1,19$ e revelou *Lutzomyia ayrozai* e *L. georgii* como as espécies mais abundantes nos cinco anos de coleta enquanto que *L. dendrophyla* apresentou-se mais abundante apenas no ano de 2007;

2. Até o momento, este trabalho foi pioneiro na avaliação epidemiológica LTA no município, assim como o conhecimento dos flebotomíneos vetores potenciais que circulam no município de São Gabriel da Cachoeira;

3. Por fazer fronteira com os países da Colômbia e Venezuela, esta região torna-se uma porta de entrada de novos patógenos da doença. Um problema observado em São Gabriel da Cachoeira, que esta presente também em outras cidades do país é a subnotificação dos dados da doença;

4. Em relação aos vetores foi constatada a presença das seguintes espécies: *L. ayrozai*, *L. davisii*, *L. flaviscutellata*, *L. shannoni*, *L. anduzei*, *L. scaffi*, *L. yuilli*, *L. tuberculata*, *L. umbratilis*, *L. paraensis*, *L. o. nociva*, *L. gomezi*. Não obstante, algumas espécies são incriminadas como potenciais vetores nos países vizinhos Colômbia e Venezuela, como *L. gomezi*, *L. scaffi* e *L. yuilli*.

5. A técnica de Ln-PCR para o estudo da infecção natural em flebotomíneos por parasitos do gênero *Leishmania* e para isolados em cultivo, demonstrou ser útil, possibilitando discriminar representantes de seus subgêneros e de outros tripanossomatídeos. O fato de esta metodologia ser capaz de identificar

Leishmania em flebotomíneos será uma ferramenta útil nos estudos de campo e nas investigações epidemiológica;

6. A *Lutzomyia conviti* tem sido encontrada frequentemente em estudos da fauna flebotomínica em países vizinhos (Venezuela e Colômbia) e o registro da espécie no estado do Amazonas foi tardio, possivelmente pelos poucos estudos realizados nesta área fronteira do Brasil (município de São Gabriel da Cachoeira). Esses registros de ocorrência aumentam a área de distribuição dessas espécies, além de ser o primeiro registro de ocorrência da espécie para o país;

7. Algumas sequências de isolados apresentaram certa similaridade com as espécies *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, confirmando a circulação de parasitos do gênero *Leishmania* entre humanos e flebotomíneos;

8. Esse estudo possibilitou indicar o envolvimento da espécie de flebotomíneo *L. dendrophyla* como transmissor de *Leishmania* sp. na região amazônica, em particular no município de SGC, AM.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Na região amazônica existem diversos biomas, como o cerrado e a floresta, que juntamente com a mata atlântica formam o maior patrimônio de biodiversidade. A diversidade menos conhecida talvez seja a de micro-organismos, que convivem como epífitas, simbiontes, comensais ou parasitas de plantas e animais, como é o caso dos protozoários, cuja maior parte é de vida livre, podendo adquirir importância médica, devido a seu potencial de infectarem o homem.

Os resultados obtidos marcam o início dos estudos para avaliar a circulação de tripanossomatídeos e ampliar o conhecimento da entomofauna de flebotomíneos na região Amazônica. A partir das espécies encontradas, tem-se uma noção da composição da fauna, ampliando a ciência acerca da distribuição de espécies que reconhecidamente atuam como vetor das leishmanioses e de outros tripanossomatídeos.

A partir das sequências dos isolados o passo seguinte: é a construção de iniciadores espécie-específicos para a região de SGC e áreas adjacentes a Amazônia. O uso da PCR para *Leishmania* sp em vetores da região permitirá um estudo do ciclos epidemiológicos e um alerta da densidade de insetos infectados em determinadas regiões, auxiliando a vigilância epidemiológica.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER S., THEODOR O. Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. *Annual Review of Entomology* 1957. 2: p. 203-226.
- ALEXANDER B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 2000. 14: 109-122.
- ANDRADE FILHO JD, CARNEIRO APS, LIMA MLN, SANTIAGO RM, GAMA MA, SANTOS CA, FALCÃO AL, BRAZIL RP. Flebotomíneos de Timóteo, estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Cad Saú Públ* 1997. 13: 767-770.
- ARAÚJO-FILHO NA. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento da Amazônia. *Acta Amazônica*, 1981. 11(1): 87-189.
- ARIAS JR, FREITAS RA. Flebótomos da Amazônia Central do Brasil I. Resultados obtidos das capturas feitas com isca humana e eqüina (Diptera: Psychodidae). *Acta Amazonica*, 1977. 7: 507-527.
- ARIAS JR, FREITAS RA. On the vectors of cutaneous Leishmaniasis in Central Amazon of Brazil. *Acta Amazonica*, 1977. 7: 293-294.
- ARIAS JR, MILES MA, NAIFF RD, POPOVA MM, FREITAS RA, BIANCARDI CB, CASTELLON EG. Flagellates infections of Brazilian sandflies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* e *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 1985. 34: 1098-1108.
- ARIAS, J.R.; NAIF, R.D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniosis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1981. 76(3): 279-286.
- BAKER AJ, MOONEY A, HUGHE S, J. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *Journal Clinical Investigation*, 1994. 94(5): 2105-2116.
- BARRET TV, SENRA M.S. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitology Today* 1989. 8: 255-257.

BARRETT TV, FREITAS RA, ALBUQUERQUE MIC, GUERRERO JHC. Report on a collection of *Lutzomyia* sand fly (Diptera: Psychodidae) from the Middle Solimões (Amazonas, Brasil). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1996. 9 (1): 27-35.

BARROS M.B, PAES MG, TOLEDO LM. Considerações sobre a produção da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Amazonas *In: Espaço e Doença: um olhar sobre o Amazonas*. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro RJ. 1998. p. 105-113.

BARROS MLB, PAES MG, TALHARI S. Leishmaniose mucocutânea na Amazônia. Estudo dos casos diagnosticados em Manaus no período de 1976 a 1980. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1982. 57: 152-54.

BASANO SA, CAMARGO LMA. Leishmaniose tegumentar americana: história, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2004. 7: 328-337

BONFANTE-GARRIDO R, MELENDEZ E, BARROETA S, DE ALEJOS MA, MOMEN H, CUPOLILLO E, MCMAHON-PRATT D. E GRIMALDI JR G. Cutaneous leishmaniasis in western Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992. 86:141-148.

BONFANTE-GARRIDO R; BARRETO T. Leishmaniasis tegumentaria americana en el Distrito Urdaneta, Venezuela. *Bol. Ofic. sanit. panamer*, 1981. 91:30-1.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana– Diagnóstico Clínico e Diferencial*. Brasília/DF, 2007. 136.

CAMARGO EP. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv. Parasitol.* 1999. 42: 29–112.

CAMPBELL-LENDRUM D, DUJARDIN JP, MARTINEZ E, FELICIANGELI MD, PEREZ JH, SILANS LNMP, DESJEUX F. Domestic and peridomestic transmission of American Cutaneous Leishmaniasis: Changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001. 96(2): 159-162.

CARVALHO GML, ANDRADE FILHO JD, FALCÃO AL, ROCHA ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008. 8: 407-414.

CASTELLÓN EG, ARIAS JR, FREITAS RA, NAIFF RD. Os flebotomíneos da região Amazônica, estrada Manaus Humaitá, estado do Amazonas, Brasil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Acta Amazônica* 1994. 24 (1/2): 91-102.

CIPA GROUP. Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America, <http://cipa.snv.jussieu.fr/>, 1999 (acesso 07 de agosto de 2012).

COELHO LIC, PAES M, GUERRA JA, BARBOSA MG, COELHO C, LIMA B, BRITO ME, Brandão-Filho SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil *Parasitol Res* 2011. 108:671–677

COLACICCO-MAYHUGH MG, MASUOKA PM, GRIECO JP. Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. *International Journal of Health Geographics* 2010. 9(2):1-9.

COQUILLET DW. Discovery of blood sucking Psychodidae in America. *Entomological News*, 1907. (18): 101-102.

CORREDOR A, GALLEGO JF, TESH RB, PELAEZ D, DIAZ A, MONTILLA M, PALAU MT. *Didelphis marsupialis*, na apparent wild reservoir of *Leishmania chagasi* in Colombia, South America. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1989. 83: 195.

CORREDOR A, KREUTZER RD, TESH RB, BOSHELL J, PALAU MT, CÁCERES E. 1990. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop Med Hyg* 42: 206-214.

COURA JR, Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias. ed. Guanabara Koogan, vol I, 2005.

CUPOLILLO E, BRAHIM LR, TOALDO CB, DE OLIVEIRA-NETO MP, DE BRITO ME, FALQUETO A. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003. 41(7):3126-32.

CUPOLILLO E, GRIMALDI GJR, MOMEN H, BEVERLEY SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1995. 73: 145–155.

CUPOLILLO E, GRIMALDI GJR, MOMEN H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994. (50): 296-301.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 73:145–155, 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.JR.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*, 50: 250–311. 1994.

CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 663–668. 1998.

DANTAS-TORRES F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, Bari, 2009. 2(1):8.

DAVIES CR, REITHINGER R, CAMPBELL-LENDRUM D, FELICIANGELI D, BORGES R, RODRIGUEZ N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2000.16(4): 925–950.

DE SOUZA W, MOTTA, MCM. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiol Lett*, 1999. 173: 1-8.

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

DELGADO O, CASTES M, WHITE JR, AC & KREUTZER RD. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993. 48: 145-147.

DELGADO O, CUPOLILLO E, BONFANTE-GARRIDO R, SILVA S, BELFORT E, GRIMALDI JR G. & MOMEN H. Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1997. 92: 581-582.

DIAS-LIMA A, BERMUDEZ EC, MEDEIROS JF, SHERLOCK I. Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2002.18: 823-32.

EROGLU F, KOLTAS IS, GENÇ A. Identification of Causative Species in Cutaneous Leishmaniasis Patients Using PCR-RFLP. *J Bacteriol Parasitol* 2011. 2:113.

FÉ NA, FREITAS RA, BARRETT TB. Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia (Psychodopygus) douradoi* n.sp. (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998.93 (3): 331-336.

FÉ NA, FREITAS RA, BARRETT TB. Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia (Psychodopygus) douradoi* n.sp. (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1998. 93 (3): 331-336.

FELICIANGELI MD, RAMIREZ-PEREZ J & RAMIREZ A. First Venezuelan record of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae), a proven vector of *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1985. 79: 878.

FELICIANGELI MD, RODRIGUEZ N, BRAVO A, ARIAS F, GUZMAN B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. *Med Vet Entomol* 1994. 8: 317–324.

FELICIANGELI MD. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. I. Description of the study area, catching methods and species composition. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1987. 82: 119-124.

- FELICIANGELI MD. Hourly activity of *Lutzomyia ovallesi* and *L. gomezi* (Diptera: Psychodidae), vetores de leishmaniose cutânea northcentral na Venezuela. *J Med Entomol*, 1997. 34: 110-115.
- FERNANDES, O.; MURTHY, V.K.; KURAH, U.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D.A. Mini-éxon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1994.66: 261-271.
- FRANCO A.M.R; MOMEN H.; NAIFF R.D.; MOREIRA C.F.S; DEANE M.P.; GRIMALDI JR. G. Enzyme polymorphism in *Endotrypanum* and numerical analysis of isoenzyme data. *Parasitology* 1996.113: 39-48.
- FREITAS, R.A.; BARRETT, T.V. 2002. Descriptions of *Lutzomyia georgii* n. sp. and a synopsis of the series *infraspinoso* (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(2): 239-245.
- GALATI EA, NUNES VL, DORVAL ME, OSHIRO ET, CRISTALDO G, ESPÍNDOLA MA. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica* 1996. 30: 115-28.
- GALATI EAB, MARASSA AM & ANDRADE RMG. *Micropygomyia* (*Sauromyia*) *petari*, a new species of phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from Vale do ribeira, São Paulo State, Brazil. *Rev. Bras. Entomol*, 2003. 47 (3): 455-459.
- GIATTI LL, ROCHA AA, TOLEDO RF, BARREIRA LP, RIOS L, PELICIONI MCF, MUTTI LV, CUTOLO SA. Condições sanitárias e socioambientais em Iauaretê, área indígena em São Gabriel da Cachoeira, AM. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 2007.12 (6): 1711-23.
- GIL LHS, BASANO SA, SOUZA AA, SILVA MGS, BARATA I, ISHIKAWA ED, CAMARGO LMA, SHAW JJ. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003. 98: 751-755.
- GIL LHS, BASANO SA, SOUZA AA, SILVA, MGS, BARATA I, ISHIKAWA ED, CAMARGO LMA, SHAW JJ. Recent observations on the sand fly (Diptera:

Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003. 98: 751-755.

GOMES LHM. Variação mensal e infecção em *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha 1977, *Lutzomyia anduzei* Rozeboom 1942, *Lutzomyia flaviscutellata* Mangabeira 1942 e *Lutzomyia olmeca nociva* Young e Arias 1982 (Diptera: Psychodidae) por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas de treinamento militar na Amazônia. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. 2003. p 134.

GRIMALDI JR G, KREUTZER RD, HASHIGUCHI Y, GOMEZ EA, MIMORY T, TESH RB. Description of *Leishmania equatoriensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992. 87: 221-228.

GRIMALDI JR G, MOMEN H, NAIFF RD, MCMAHON-PRATT D, BARRETT TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sandflies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1991. 44: 645-661.

GRIMALDI JR G, TESH RB, MCMAHON-PRATT D. A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the New World. *Am J Trop Med Hyg*, 1989. 41: 687-725.

GRIMALDI JR, G. E TESH RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993. 6 (3): 230-250.

GUERRA J. A O, BARBOSA MG, LOURERO ACSP, COELHO CP, ROSA GG, COELHO LIACR. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil, Caderno de Saúde Pública 2007. (23) p. 2215-2223.

GUERRA JAO, RIBEIRO JAS, COELHO LIARC, BARBOSA MG, PAES MG. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cadernos Saúde Pública*, 2006. 22: 2319-2327.

GUERRA JAO, TALHARI S, PAES MG, GARRIDO M, TALHARI JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da LTA em militares simultaneamente expostos á infecção na Amazônia. *Rev Soc Brs Med Trop*, 2003. 36 (5): 587- 890.

GUERRA JAO. COELHO LIARC, CABRAL EG, ALMEIDA MRT, MOURA MA, PAES MG. Comparação entre métodos para coleta de amostra de sangue em inquérito sorológico para leishmaniose em cães procedentes de áreas de transmissão e não transmissão humana de leishmaniose tegumentar americana no município de Manaus. *NewsLab* 2002. 55: 72-80.

HANDMAN E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, 2001. 14:229–243.

HANHAM CA, SHAW JJ, LAINSON R, MCMAHON-PRATT D. Production of a specific monoclonal antibody for the identification of *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1990. 42: 453-459.

HOARE CA. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. Oxford: Blackwell, 1972. 749.

HONIGBERG BM, BALAMUTH W, BOVEE E C, CORLISS JO, GODJICS M, HALL RP, KUDO RR, LEVINE ND, LOEBLICH JR AR, WEISER J, WENRICH D H. A revised classification of the phylum Protozoa. *J. Protozoa*, 1964. 11 (1): 7-20.

ISA/FOIRN. *Socioeconomic and demographic enquiry of the city of São Gabriel da Cachoeira: results*, São Gabriel da Cachoeira, 2005. 25 p.

ISHIKAWA EA, SILVEIRA FT, MAGALHÃES AL, GUERRA JUNIOR RB, MELO MN, GOMES R, SILVEIRA TG, SHAW JJ. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil, *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg* 2002. 96:1. 111-121.

ISHIKAWA EA, SILVEIRA FT, MAGALHÃES AL, GUERRA JUNIOR RB, MELO MN, GOMES R, SILVEIRA TG, SHAW JJ. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil, *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg*, 2002. 96:1. 111-121.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990. 4: 1-24.

KILLICK-KENDRICK R. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. *In: Biology of Kinetoplastida*, 1979. vol.II (eds W.H.R. Lumsden & D. A. Evans) Academic Press, London/New York, 395-460.

KREUTZER RD, CORREDOR A, GRIMALDI JR G, GROGL M, ROWTON ED, YOUNG DG, MORALES A, MCMAHON-PRATT D, GUZMAN H, TESH RB. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg* 1991.44: 662-675.

KREUTZER, R.D., SOURATY, N. & SEMKO, M.E. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987. 36: 22-32.

LAINSON R, SHAW JJ, SILVEIRA FT, BRAGA RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987. 81(3):517.

LAINSON R, SHAW JJ, SILVEIRA FT, SOUZA AAA, BRAGA RR ISHIKAWA EAY *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994. 89: 435-443.

LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Brit Med Bull.* 1972. 28(1):44-

LAINSON R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond Serie B*, 1988. 321: 389-404.

LAINSON R. *On Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1997. 92: 377-387.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua* 2010. (2) p. 13-32.

LEONARDIN V. *Os historiadores e os rios*. Brasília, 1999. Editora da Universidade de Brasília.

LEVINE ND, CORLISS JO, COX FEG, DEROUX G, GRAIN J, RONIGBERG BM, LIEEDALE GF, LEOEBLICH AR, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC,

POLJANSKY G, SPRAGUE V, VÁVRA J, WALLACE FG. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozoology*, 1980. 27(1): 37-58.

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

LUZ E, CASTRO MEA, DEREURE J, PRATLONG F, DEDET JA, PANDEY A, SOCCOL VT. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, Southern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 2000. 94: 623-631.

MADEIRA MF, SCHUBACH A, SCHUBACH TM, PACHECO RS, OLIVEIRA FS, PEREIRA SA, FIGUEIREDO FB, BAPTISTA C, MARZOCHI MC. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, London, 2006. 100: 442-445.

MARFURT J, NASEREDDIN A, NIEDERWIESER I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of mini – exon sequence and subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 2003. 41: 3147-3153.

MARZOCHI M, MARZOCHI K. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Públ* 1994. 10 (2): 359-375.

MARZOCHI MCA, COUTINHO SG, SABROZA PC, SOUZA WJS. Reação de Imunofluorescência Indireta e intradermoreação de Montenegro para a leishmaniose Tegumentar Americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudos comparativos dos resultados observados em 1974 e 1978. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, 1980. 22: 97-155.

MICHALSKY EM, FORTES-DIAS CL, PIMENTA PF, SECUNDINO NF, DIAS ES Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected

individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002. 44: 255-259.

MINODIER P, PIARROUX R, GARNIER JM, UNAL D, PERRIMOND H, DUMON H. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. *Pediatr Infect Dis J* 1998. 17:701-4.

MIRANDA JC, REIS E, SCHRIEFER A, GONÇALVES M, REIS MG, CARVALHO L, FERNANDES O, BARRAL-NETO M, BARRAL A. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002. 97, 185-188.

MISSAWA NA, MACIEL GBML, RODRIGUES H. Distribuição geográfica de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008. 4: 369-373.

NAIFF MF, CUPOLILLO E, NAIFF RD, MOMEN H, BARRET TV, GRIMALDI JR. G. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, 1999. 32 (1): 243.

NAIFF MF. *Estudo demográfico da Leishmaniose Tegumentar na Amazônia e mapeamento geográfico dos agentes etiológicos na região*. Dissertação (Mestrado) Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1998. 120p

NAIFF-JUNIOR RD, PINHEIRO, FG, NAIFF MF, SOUZA IS, CASTRO LM, MENEZES MP, FRANCO AMR. Estudo de uma série de casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev Pat Trop* 2009. 38 (2): 103-114.

NERY LCR, LOROSA ES, FRANCO AMR. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004. 99: 571-574.

NEVES DP. et al. *Parasitologia humana*. 12. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2011.

NIEVES E., PIMENTA PF. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 2000. 37(1):134–140.

OVALLE CE, PORRAS L, REY M, RIOS M, CAMARGO YC. Distribución geográfica de espécies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Biomédica* 2006. 26: 145-151.

PAES MG. Estudo de quatro espécies de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodidae) em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas 1991.p 198.

PAIVA BR, SECUNDINO NFC, PIMENTA PFP. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad. Saúde Pública* 2007. 23 (1) .

PEREZ, J.E., OGUSUKU, E., INGA, R., LOPEZ, M., MONJE, J., PAZ, L., NIETO, E., AREVALO, J., GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994. 88, 161–164.

PERRUOLO G, NORIS RODRÍGUEZ N, FELICIANGELI MD. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from *Lutzomyia spinicrassa* (species group Verrucarum) Morales Osorno Mesa, Osorno and Hoyos 1969, in the Venezuelan Andean region. *Parasite*, 2006.13: 17-22

PINHEIRO FG, LUZ SLB, FRANCO AMR. Infecção natural por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, 2008.8:(1):165-172.

PINHEIRO FG. Infecção natural em *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Amazonas, Brasil. *Dissertação de Mestrado*. INPA/UFAM, Manaus. 2004. p 101.

PITA-PEREIRA D, ALVES CR, SOUZA MB, BRAZIL RP, BERTHO AL, DE FIGUEIREDO BA, BRITTO CC. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005. 99: 905-913.

PITA-PEREIRA D, SOUZA GD, ZWETSCH A, ALVES CR, BRITTO C, RANGEL EF. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg* 2009. 80:593-595.

PITA-PEREIRA, D., CARDOSO, M.A., ALVES, C.R., BRAZIL, R.P., BRITTO, C., 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop.* 107, 66–69.

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

RASSI Y, ALIREZA, SD, MOHAMMAD AO, MOHAMMAD RA, FATEMEH M, AHMADALI E, ZABIHOLAH Z, EZATOLDIN J. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in northwestern Iran. *Experimental Parasitology*, New York, 2012. 131(3): 344-349.

READY, P.D.; ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. A pilot study to control *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae), the major vector of *Leishmania braziliensis guyanensis*, in a peri-urban rainforest of Manaus, Amazonas state, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1985. 80(1): 27-36.

REBÊLO JMM, ARAÚJO JAC, CARVALHO ML, BARROS VLL, SILVA FS, OLIVEIRA ST. Flebotomos (Diptera: Phlebotominae) da Ilha de São Luis, Zona do Golfão Maranhense, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1999. 32: 247-253.

READY P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Rev Entomology* 2013; 58: 227-250.

RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E, PRATLONG E, BASTIEN P, PERIERES J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1990. 65: 111–125.

RODRÍGUEZ N, AGUILAR CM, BARRIOS MA, BARKER DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999. 93: 47-49.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I., Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Experimental Parasitology*, Orlando, 2006. p. 44-51.

ROGERS ME, BATES P A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*, 2007. 3(6): 91 p.

ROGERS ME, CHANCE ML, BATES PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 2002;124:495–508

ROMERO GA, GUERRA MV, PAES MG, CUPOLILO E, TOALDO CB, MACÊDO VO, FERNANDES O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop* 2001a. 79: 225-229.

ROMERO GA, GUERRA MV, PAES MG, MACÊDO VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg*, 2001b. 65: 456-465.

ROMERO GAS, GUERRA MVF, PAES MG, Macedo VO. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Clinical findings and diagnostic approach. *Clinical of Infectious Diseases*, 2001. 32: 1304-1312.

- ROMERO GAS. Estudo da doença cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2000. 222 p.
- ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Tropica*, Basel, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.
- ROMERO,G.A.S. et al. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. *Acta Tropica*, Basel, v. 82, p. 25-29, 2002.
- ROMERO,G.A.S. et al. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, Organização Mundial de Saúde has cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Liverpool, v. 96, n. 2, p. 131-136, 2002.
- ROWLAND MA, MUNIR N, DURRANI H, NOYES H, REYBURN NA. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in an Afghan refugee settlement in north-west Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*1999. 3: 133–136.
- RYAN L, LAINSON R, SHARU JJ, BRAGA RR, ISHIKAWA EAY. Leishmaniosis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of leishmaniosis in Pará State, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology* 1987. 383-395.
- SACKS D, SHER A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology* 2022. 3 (11) 1041-1047 p..
- SALOMÓN OD. Vectores DE Leishmaniasis en las Américas. *Gaz. Méd. Bahia* 2009. 79 (3):3-15.
- SARAVIA, N. et al. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore 1998. (59) p. 86–94.
- SCHONIAN G, NASEREDDIN A, DINSE N, SCHWEYNOCH C, SCHALLIG HD, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003. 47: 349–358.

SCORZA JV, MACIAS P, ROJAS J. Encuesta epidemiológica sobre leishmaniasis cutánea urbana en la ciudad de Trujillo, Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 1985. 25:73-81.

SHAHBAZI, F.; SHAHABI, S.; KAZEMI, B.; MOHEBALI, M.; ABADI, A. R.; ZARE, Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitology Research* 2008. 103(5) p. 1159-1162.

SHAW JJ, LAINSON R. Ecology and epidemiology: New World. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, W Peters, R Killick-Kendrick,(eds), *Academic Press*, London, 1987. 291-363.

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

SHAW JJ, LAINSON R. Leishmaniasis in Brazil: XI. Observations on the morphology of *Leishmania braziliensis* and *mexicana* complexes. *Journal Tropical Medicine and Hygiene* 1976. 79(1): p 9-13 p.

SHAW JJ. A possible vector of *Endotrypanum schaudinni* of the sloth *Choloepus hoffmanni* in Panama. *Nature* 1964. 201: 417- 418.

SHAW, J. J. et al. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondônia state, western Amazonia, Brazil. *Annals Tropical Medicine and Parasitology* 2007.101(8): 681-688 p.

SIBAJEV A. Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para o Diagnóstico de Variedades de *Leishmania* Circulantes na Região Norte do Brasil. Tese (Doutorado) – UFAM, Manaus, AM. 2005. p 190.

SILVA DF, FREITAS R A, FRANCO AMR. Diversidade e Abundância de Flebotomíneos do Gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em Áreas de Mata do Nordeste de Manacapuru, AM. *Neotropical Entomology* 2007. 36: 138-144.

SILVA OS, GRUNEWALD J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999. 94: 579-582.

SILVEIRA TGV, TEODORO U, LONARDONI MVC, TOLEDO MJO, VEDOVELLO D, BERTOLINI DA, ARRAES SMAA, GUILHERME ALF. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Cad Saúde Pública* 1996. 12(1) 89- 93 p.

SILVEIRA, F.T.; SOUZA, A.A.A.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y.. Cutaneous *Leishmaniasis* in the Amazon Region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1991. 86: 127-130.

SILVEIRA, FERNANDO TOBIAS ET al. Leishmaniose visceral americana. In: LE O, Raimundo Nonato Queiroz de. Doenças Infecciosas e Parasit rias: Enfoque Amaz nico. Bel m: Cejup UEPA, *Instituto Evandro Chagas*, 1997, 886 p.

SIMPSON RJ, JENSEN SS, LIM JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 2008 8: 4083-4099.

STEVENS J, RAMBAUT A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Inf Gen Evol* 2001. 1: 143-150.

TALHARI, S.; ARIAS, J.A.; CUNHA, M.G.S.; NAIFF, R.B. NAIFF, M.F.; FREITAS, R.A.; BARRETT, T. Leishmaniose no Estado do Amazonas - Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1988. 63(6): 433-438.

VALE ECS, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An Bras Dermatol*. 2005. 80: 421-8.

VAN EYS GJJM, SCHOONE GJ, KROON NCM, EBELLING SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites *Mol. Biochem. Parasitol* 1992. 51: 133-142.

- VICKERMAN K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA. Biology of the kinetoplastida. *Academic*, 1976.1 -34 p.
- VIVERO RJ, CONTRERAS-GUTIÉRREZ MA, BEJARANO EE. Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. *Biomédica* 2007. 27: 429-438.
- WALLACE FG, HERTIG M. Ultrastructural comparison of promastigote flagellates (leptomonads) of wild-caught Panamanian Phlebotomus. *J Parasitol* 1968. 54: 606-612.
- WALTERS LL., CHAPLIN GL, MODI GB, TESH RB. Ultrastructural biology of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989. 40:19-39.
- WARBURG A, SARAIVA E, LANZARO GC, TITUS R, NEVA F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and propensity to enhance leishmaniasis. *Phil Trans Roy Soc Lond* 1994. 345: 223-230.
- XIAO-SU H, WEN-TIAN Y, HONG-GANG L, HE-PING Y, JIAN-PING C, YING M, BAO-GIAN J, TAO Z. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J. Parasitol* 2000. 86, 822-826
- YANG BB, CHEN DL, CHEN JP, LIAO L, HU XS, XU JN. Analysis of kinetoplast cytochrome b gene of 16 *Leishmania* isolates from different foci of China: different species of *Leishmania* in China and their phylogenetic inference. *Parasites & Vectors* 2013. 6:32
- YOUNG DG, MORALES A, KREUTZER RD, ALEXANDER JB, CORREDOR A, TESH RB, Ferro-de-Carrasquilla C, De Rodriguez C. Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 1987. 24: 587-589.
- YOUNG DG, DUNCAN MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* 1994. 54: 1-881.

ZAMBRANO P. Informe de leishmaniasis, Colombia semanas 1 a 52 de 2005. *Inf. Quinc. Epidemiol. Nac.* 2006. 11 (3):40-43.

ZERPA O, CONVIT J. Leishmaniasis Cutánea Difusa en Venezuela. *Gaz. méd. Bahia* 2009. 79 (3):30-34

13. ANEXO

*Ethnobotanical
paper Rio Negro,*

tórias dos Hobo-

8, n.2, p.2-44,

em Abelhas -
a, São Gabriel

ina do Alto Rio

Cienc. Saúde-

avak) e desana
)

na) of Venezue-
ocidade: saúde e
J], Brasil.

s, No 28, ano

smologia Tupi.
na Amazônia.

Brasil. Taylor,
RA 1026 du

indio. Mana,

ntropologia, 2a.

o.22, p.5-13.

n, E. J. (org.).

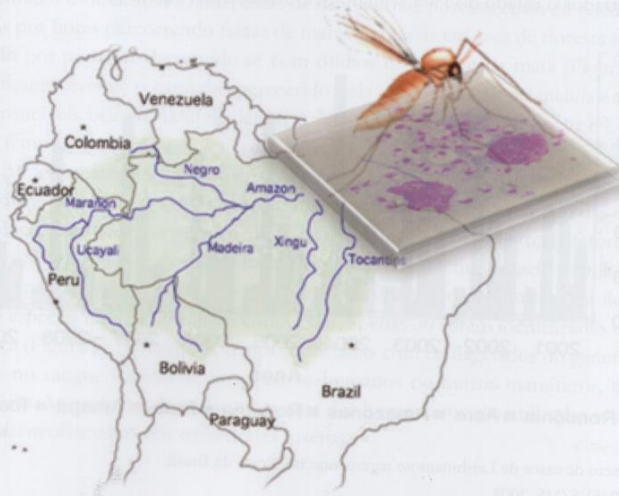
of Sustainable
or & Francis

DESVENDANDO AS FRONTEIRAS DO CONHECIMENTO SOBRE A LEISHMANIOSE NO EXTREMO NOROESTE DO BRASIL

Antonia Maria Ramos Franco¹, Francimeire Gomes Pinheiro¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Av. André Araújo 2936, C.P. 478, Aleixo, CEP 69060-000, Manaus, AM, afranco@inpa.gov.br

“... Tu lascerai ogne cosa diletta più caramente; e questo è quello strale che l'arco de lo essilio pria saetta. Tu proverai sì come sa di sale lo pane altrui, e come è duro calle lo scendere e 'l salir per l'altrui scale...”
“... Deixarás tudo aquilo que te agrada mais profundamente; e esta é a flecha que o arco do exílio lhe será disparado. E provarás como é a falta de sal no pão dos outros, e como é difícil subir a estrada e sair pelas escadas de outros...”
A Divina Comédia, Paraíso (Canto XVII) - Dante Alighieri



UM FATOR DE RISCO NO AMAZONAS: CASO IMPORTADO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Sonia Rolim Reis¹, Marilene Suzan Michalick¹, Francimeire Gomes Pinheiro¹, Luanda de Paula Figueira¹, Antonia Maria Ramos Franco¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas. Caixa Postal 478, CEP 69011-970 Manaus, AM.

Em 2008, veterinários do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia foram solicitados para auxiliar, junto ao médico veterinário do município de São Gabriel da Cachoeira, AM (Figura 1), no diagnóstico de um cão com suspeita de Leishmaniose Visceral. Foi realizado um exame clínico e foram levantados dados importantes do animal como naturalidade, procedência, tempo de residência no município, localização e tipo de residência, queixa do proprietário, antecedentes de Leishmaniose na família, etc. Verificou-se que o cão era proveniente de área endêmica e percorreram anteriormente vários outros estados considerados endêmicos para esta doença.

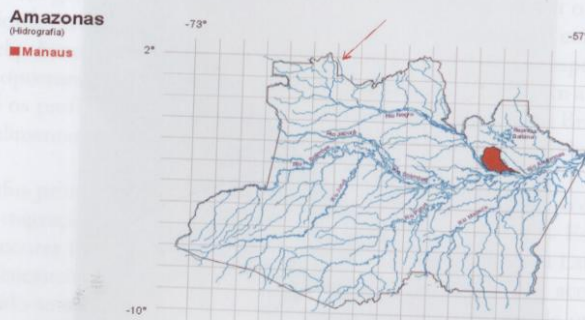


Figura 1. Mapa mostrando a região noroeste (seta) chamada "cabeça do cachorro".
 Fonte: www.inpa.gov.br

UM MUNDO DESCONHECIDO DOS INSETOS DE ASAS ENTREABERTAS: OS FLEBOTOMINEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

Francimeire Gomes Pinheiro¹, Liliâne da Rocha Nery¹, Luanda de Paula Figueira¹, Sonia Rolim Reis¹, Luis Henrique Monteiro Gomes¹, Rui Alves de Freitas¹, Antonia Maria Ramos Franco¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, , Av. André Araújo 2936, C.P. 478, Aleixo, CEP 69060-000, Manaus, AM, afranco@inpa.gov.br.



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: “Caracterização de isolados do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de reservatórios vertebrados e invertebrados no município de São Gabriel da Cachoeira, área de fronteira Brasileira”

Protocolo nº:

Investigador:

Instituição:

Você está com **Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**, uma doença causada por um parasito e transmitida pela picada de um inseto. Esta doença produz feridas na pele e não é transmitida por você a outra pessoa.

Estamos lhe convidando a participar, voluntariamente, de uma pesquisa que busca conhecer melhor as características da leishmaniose, para que no futuro, possamos oferecer um tratamento mais apropriado. Se você concordar será incluído num estudo científico a partir do material colhido de sua ferida e ou da cicatriz e sangue. Leia atentamente as informações antes de dar seu consentimento.

1. Esta pesquisa tem como principal finalidade procurar saber a espécie do micróbio da sua ferida;
2. Pelo menos 30 pacientes, entre homens e mulheres, participarão deste estudo. Após seu exame médico, serão feitos exames laboratoriais, incluindo biópsia (retirada de pequeno pedaço de pele) e escarificação (raspado das bordas da ferida);
3. A sua participação neste estudo é voluntária. Mesmo que você decida participar, poderá desistir em qualquer momento, sem prejuízo de seu atendimento e tratamento médico. O seu médico também poderá suspender a sua participação do estudo se assim julgar conveniente para sua saúde;

4. Participando desse estudo você estará ajudando muito para o avanço científico nas pesquisas relacionadas à leishmaniose e por isso mesmo você terá algumas responsabilidades: seguir as orientações de seu médico e comparecer as consultas nas datas marcadas;

5. Os pesquisadores não darão nenhum benefício em dinheiro ou algo em troca e o seu pedaço de pele será somente utilizado para essa pesquisa;

6. Em qualquer momento do estudo você poderá fazer perguntas e esclarecer suas dúvidas, seja com o médico ou com os demais pesquisadores;

7. Durante o estudo caso sinta-se mal, mesmo durante a noite, procure o Serviço Médico mais próximo de sua casa;

8. Sua participação será mantida em segredo, os resultados do estudo serão publicados sem revelar o seu nome. No entanto, o seu prontuário médico será visto pelo médico e equipe envolvida no estudo;

9. Você terá acesso a qualquer resultado de exames realizados com seu material coletado, além de obter o resultado caso positivo;

10. Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre. Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato com o(a) pesquisador(a) pelo telefone (92) 3643-3068 ou pelo E-mail: meireg@inpa.gov.br.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO:

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar desse estudo clínico. Declaro que li e entendi as informações referentes ao estudo e que minhas dúvidas foram esclarecidas.

OU



Impressão do dedo polegar
direito caso o responsável
não saiba escrever seu nome

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

Nome do médico e/ou enfermeiro (responsável pela coleta)

Assinatura: _____ CRM: _____

Local e data: _____

REGISTRO DO PACIENTE

No:

Data:

IDENTIFICAÇÃO / EPIDEMIOLOGIA	
Nome:	Sexo:
Grávida ()	Criança ()
Data de nascimento:	Idade:
Naturalidade:	Procedência (5 anos):
Endereço:	
Profissão:	
Local provável da infecção:	
Atividade na mata: () Não () Labor () Lazer	
Frequência de ida à mata: () diária () semanal () quinzenal () mensal	
DADOS CLÍNICOS	
Carac. da lesão: () quadro primário () Recidiva () Reinfecção () Cicatriz	
Tempo estimado de doença:	
CARACTERÍSTICAS DA CICATRIZ	Localização
Tipo de cicatriz:	() face () tronco
Nº:	() pescoço () MMSS
Tamanho:	() MMII () outros
Tempo de evolução:	
LOCALIZAÇÃO DA AMOSTRA RETIRADA?	
() face () tronco () pescoço	
() MMSS () MMII () outros	
TRATAMENTO UTILIZADO	
Droga:	Dose:
Data início:	Duração:
Total de doses:	
Presença de leishmaniose mucosa: () SIM () NÃO	
Exame parasitológico:	
Exame direto: () SIM () NÃO Resultado:	

ELISA: () positivo () negativo		
TRATAMENTO		
Tratamento anterior: () SIM () NÃO		
Droga:	Dose:	Kg/Peso:
Data início:	Duração:	
Total de doses:	Tempo para regredir:	
Infiltração intralesional: () SIM () NÃO		
Término do tratamento:		
Tratamento alternativo:		
Parafeitos:		
() artralgia	() inapetência	
() mialgia	() febre	
() astenia	() náuseas	
() desconforto gástrico	() vômitos	