



Universidade Federal do Amazonas
Universidade Federal do Pará
Centro de Pesquisas Leônidas & Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz
Mestrado Multidisciplinar em Saúde, Sociedade e Endemias na
Amazônia

**CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA* DO SUBGÊNERO
VIANNIA ISOLADAS DE FLEBOTOMÍNEOS DA SERRA DOS
CARAJÁS E SANTARÉM, ESTADO DO PARÁ, PELA REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE.**

ÉRICA MELONIO DA COSTA

BELÉM
2011



Universidade Federal do Amazonas
Universidade Federal do Pará
Centro de Pesquisas Leônidas & Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz
Mestrado Multidisciplinar em Saúde, Sociedade e Endemias na
Amazônia

ÉRICA MELONIO DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA* DO SUBGÊNERO *VIANNIA* ISOLADAS DE FLEBOTOMÍNEOS DA SERRA DOS CARAJÁS E SANTARÉM, ESTADO DO PARÁ, PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, Universidade Federal do Pará e Fiocruz como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre.
Orientador: Prof. Dra. Edna A. Y. Ishikawa**

**BELÉM
2011**

ÉERICA MELONIO DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA* DO SUBGÊNERO *VIANNIA* ISOLADOS DE FLEBOTOMÍNEOS DA SERRA DOS CARAJÁS E SANTARÉM, ESTADO DO PARÁ, PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, Universidade Federal do Pará e Fiocruz como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dra. Edna A. Y. Ishikawa

Banca Examinadora:

1- _____

Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

2- _____

Dr. José Ricardo dos Santos Vieira

3- _____

Dr. Fernando Tobias Silveira

4- _____

Dra. Marta Chagas Monteiro

5- _____

Dra. Ana de Nazaré Martins da Silva (suplente)

Julgado em : __/__/__

Conceito: _____

Dedico este trabalho a meus pais Elias Bechara e Carmem Melonio por jamais desistirem de mim, mesmo quando quase morri estiveram ao meu lado sem medir esforços, abdicando de todos seus afezeres em favor de minha recuperação. Essa vitória é para vocês!

Agradecimentos

A Deus, o ser supremo que rege todos os homens e todas as coisas, por me dar a graça do renascimento, me deixar chegar até onde cheguei e por inúmeras outras conquistas que virão.

A orientadora Dra. Edna Ishikawa, por me ensinar a ser disciplinada, por ter paciência e principalmente por dividir um pouco do seu vasto conhecimento em meu processo pessoal de crescimento profissional.

Ao Instituto Evandro Chagas, mais especificamente ao Programa de Leishmanioses, chefiado pelo Dr. Adelson Souza *in memoriam* por suas pesquisas em campo, que culminaram nas amostras essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao setor de entomologia do Instituto Evandro Chagas, em especial ao Fábio Márcio, pela contribuição imprescindível de dados para confecção desse trabalho.

Ao Dr. Sebastião Aldo, por sua valorosa contribuição em ceder tanto conhecimento técnicos quanto o material para agilizar as análises desse trabalho.

Ao colega Danilo, pela grandiosa contribuição, pela companhia no laboratório e por me ensinar que fazer ciência é persistência!

Aos colegas de laboratório Breno, Joriane e Camila, por serem prestativos e colaborarem nos momentos em que necessitei de auxílio para a confecção desse trabalho.

A bibliotecária Marta, por sua eficiência no processo de confecção da ficha catalográfica dessa dissertação.

A estagiária da biblioteca Jaqueline, pelas inúmeras vezes que facilitou minhas consultas ao acervo na biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical.

Aos meus pais, Elias e Carmen, por me ser minha luz quando tudo parecia escuro, por me dar forças quando parecia fraca, por me proporcionar a educação, a qual serei eternamente grata, e por todo amor incondicional.

Aos meus irmãos por acreditar no aperfeiçoamento de meus conhecimentos e me dar a força que necessitava para concluir o mestrado após o acidente.

Ao seu Ivan, dona Nelcy e Gisely, por ceder-me as dependências de sua casa e pela contribuição indireta neste trabalho.

Ao meu noivo, Gessé lobo, pelo amor incondicional, por acreditar em meu potencial, pela paciência e companheirismo e pelas madrugadas mal dormidas em apoio à construção desse conhecimento.

Essência

Com o tempo, os conceitos mudam...

os sonhos mudam...

os planos mudam...

a vida muda...

Mas não se mudam princípios e valores...

Mudei e continuo igual...

*Assim é o ser humano: tão coerente em suas
contradições...*

Desconhecido

RESUMO

As leishmanioses são doenças zoonóticas que apresentam duas formas de acometimento: a tegumentar e a visceral. São transmitidas pela picada de flebotomíneo (Diptera; Psychodidae). O parasita causador da doença é a *Leishmania* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae), um protozoário que apresenta características peculiares como único flagelo, um subcitoesqueleto de microtúbulos e um cinetoplasto relativamente pequeno com DNA condensado, capaz de infectar animais vertebrados e invertebrados. Esse estudo teve como objetivo a identificação por PCR dos protozoários do gênero *Leishmania* presentes em amostras de conteúdo intestinal de flebotomíneos capturados em Serra dos Carajás e Santarém, Pará. As capturas de flebotomíneos com armadilhas tipo CDC luminosas e Shannon foram feitas pelo IEC em quatro áreas de Serra dos Carajás e uma em Santarém totalizando dez amostras para análise por PCR, cinco amostras de Santarém e cinco amostras de Serra dos Carajás. Após extração do DNA e realização da técnica da PCR, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE e as bandas foram visualizadas em transluminador UV. Quatro amostras isoladas de flebotomíneos de Santarém, *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Psychodopygus welcomei/ complexus*, *Psychodopygus davisii* e *Psychodopygus whitmani* foram caracterizados como *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Uma amostra de Santarém isolada do flebotomíneo *Psychodopygus gomezi* e cinco amostras de Serra dos Carajás isoladas dos flebotomíneos *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Lutzomyia brachyptera*, *Lutzomyia richardwardi*, *Lutzomyia umbratilis* não foram caracterizadas. Os resultados da região de Santarém demonstraram que os flebotomíneos que se encontravam infectados por protozoários do gênero *Leishmania* do subgênero *Viannia* já apresentavam registros de infecção por este flagelado em estudos anteriores. Já em Serra dos Carajás os resultados evidenciaram que não foi possível identificar os parasitos contidos no tubo intestinal do flebotomíneo, somente foi possível afirmar que não são parasitos do gênero *Leishmania*. Esses dados reforçam a relevância de se manter um programa de vigilância entomológica nos flebotomíneos em Santarém e Serra de Carajás. Serão necessários novos estudos complementares para maior conhecimento das amostras não identificadas.

Palavras Chave: Flebotomíneos- *Leishmania*- PCR- Santarém- Serra dos Carajás.

ABSTRACT

The leishmaniasis are zoonotic disease that present two forms of involvement: the cutaneous and visceral forms. Both transmitted by the bite of sandfly (Diptera; Psychodidae). The disease is caused by infection with *Leishmania* (Kinetoplastid; Trypanosomatidae), a protozoan that has particular characteristics as single flagellum, sub cytoskeleton of microtubules and a relatively small kinetoplast DNA condensed be able to infect vertebrates and invertebrates. This study aimed to identify by PCR protozoa of the genus *Leishmania* present in samples of intestinal contents of sandflies captured in Santarém and Serra dos Carajás, Pará State. The sandflies captures with CDC light traps and Shannon were made by IEC in four areas of the Serra dos Carajás and one in Santarém, total of ten samples for PCR analysis, five samples from Santarém and five samples from Serra dos Carajás. After DNA extraction and PCR technique, the PCR product was loaded in 1,5% agarose gel in TBE buffer and bands were observed in UV transluminator. Four samples isolated from sandflies captured from Santarém, *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Psychodopygus welcomei/complexus*, *Psychodopygus davisii* and *Psychodopygus whitmani* were characterized as *Leishmania* subgenus *Viannia*. One sample of Santarém isolated from sandfly *Psychodopygus gomezi* and five samples of Serra dos Carajás isolated from sandflies *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Lutzomyia brachypyga*, *Lutzomyia richardwardi*, *Lutzomyia umbratilis* have not been characterized. The results of the Santarém region showed that sandflies which were infected by protozoa *Leishmania* subgenus *Viannia* had already been recorded in infection by this flagellate in previous studies. The Serra dos Carajás results evidenced that it was not possible to identify the parasites contained in the intestinal tube of the phlebotomine it was only possible to affirm that they are not parasites of the genus *Leishmania*. These data reinforce the importance of maintaining a program of entomological surveillance in sandflies in Santarém and Serra dos Carajás. Further studies will be needed for greater knowledge of the unidentified samples.

Keywords: Sand flies- *Leishmania*- PCR- Santarém- Serra dos Carajás.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1- Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> | 25 |
| FIGURA 2- Lesão de leishmaniose cutânea de bordas regulares | 26 |
| FIGURA 3- Lesão de leishmaniose mucosa localizada na cavidade oral em palato e lábios | 27 |
| FIGURA 4- Leishmaniose cutânea difusa evidenciada em face | 27 |
| FIGURA 5- Caso de leishmaniose visceral evidenciando hepatoesplenomegalia | 28 |
| FIGURA 6- Mapa do Estado do Pará, com as delimitações das cidades de Carajás e Santarém | 38 |
| FIGURA 7- APA do Gelado | 39 |
| FIGURA 8- Mina do Manganês Azul | 39 |
| FIGURA 9- Parque Zoobotânico da Quarentena | 40 |
| FIGURA 10- Reserva indígena Tapirapé-Aquirí | 40 |
| FIGURA 11- Flora de Belterra | 41 |
| FIGURA 12- Gel de eletroforese a 1,5% corado com brometo de etídio | 47 |
| FIGURA 13- Gel de eletroforese a 1,5% corado com brometo de etídio | 48 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| TABELA 1- Casos de LTA no Brasil no período de 2000 a 2009 | 20 |
| TABELA2- Perfis das reações de PCR das amostras estudadas em Santarém | 47 |
| TABELA 3- Perfis das reações de PCR das amostras estudadas em Serra dos Carajás | 48 |
| QUADRO 1- Identificação das amostras selecionadas ao estudo | 42 |
| QUADRO 2- Cepas-referência de <i>Leishmania</i> | 43 |
| QUADRO 3- Amostra de tripanossomatídeos, <i>Endotrypanum</i> e <i>Crithidia</i> | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| PCR | Reação em Cadeia Polimerase |
| MS | Ministério da Saúde |
| SESPA | Secretária de Saúde do Estado do Pará |
| SVS | Secretária Vigilância Saúde |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| LC | Leishmaniose Cutânea |
| LMC | Leishmaniose Mucocutânea |
| IRM | Reação Intradérmica de Montenegro |
| FG | Fentograma |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| RNA | Acido ribonucléico |
| IEC | Instituto Evandro Chagas |
| UV | Ultravioleta |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 16 |
| 3 OBJETIVOS | 17 |
| 3.1 OBJETIVOS GERAL | 17 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO | 17 |
| 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 4.1 GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> | 18 |
| 4.1.1 Epidemiologia das Leishmanioses | 18 |
| 4.1.2 Etiologia | 21 |
| 4.1.3 Classificação dos Parasitos e Distribuição geográfica | 22 |
| 4.1.4 Ciclo Biológico, Manifestações clínicas, Diagnóstico, Tratamento | 24 |
| 4.1.5 Caracterização do parasito | 29 |
| 4.2 FLEBOTOMÍNEOS | 30 |
| 4.2.1 Taxonomia do flebotomíneo | 31 |
| 4.2.2 Características do flebotomíneo | 31 |
| 4.2.3 Aspectos relacionados à transmissão | 32 |
| 4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE | 33 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 5.1 CAPTURA DOS FLEBOTOMÍNEOS | 37 |
| 5.2 LOCAIS DE COLETA | 38 |
| 5.2.1 Serra dos Carajás | 38 |
| 5.2.2 Santarém | 41 |

| | |
|---|----|
| 5.3 IDENTIFICAÇÃO DO FLEBOTOMÍNEO | 41 |
| 5.3 ISOLAMENTO DO PARASITO | 42 |
| 5.4 SELEÇÃO DE AMOSTRAS PARA O ESTUDO | 42 |
| 5.5 CEPAS REFERÊNCIA | 43 |
| 5.6 PROCEDIMENTO PARA PCR | 44 |
| 5.6.1 Extração de DNA | 44 |
| 5.6.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR) | 45 |
| 5.6.3 Eletroforese em Gel de Agarose | 46 |
| 6 RESULTADOS | 47 |
| 7 DISCUSSÃO | 49 |
| 7.1 REGIÃO DE BELTERRA EM SANTARÉM | 49 |
| 7.2 REGIÃO DE SERRA DE CARAJÁS | 53 |
| 8 CONCLUSÃO | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |
| APÊNDICE | 67 |

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciáveis que acometem a população em nível mundial estando amplamente distribuídas, atingindo principalmente as regiões tropicais e subtropicais, constituindo um complexo problema de saúde pública (DESJEUX, 2004; WHO, 2009).

De acordo com a OMS, o controle da disseminação da doença abrange a adoção de várias medidas. Em 2007, a resolução WHA 60.13 aprovada pela WHO, recomendou que os países mais afetados pelas leishmanioses intuíssem programas nacionais de prevenção, detecção e controle incluindo a criação de sistemas de vigilância, compilação e análises de dados que permitam avaliar a incidência real da doença (WHO, 2011).

No Brasil, muitos estudos foram realizados seguindo o que foi preconizado pela OMS. No entanto, foi na esfera da detecção de parasitos que vários trabalhos se destacaram, porém a maioria abordando o aspecto de detecção de leishmaniose em animais vertebrados.

Observando a necessidade de mais estudos relacionados à infecção e detecção do agente causador da doença em animais invertebrados, mais especificamente em flebotomíneos, tem-se empregado métodos de biologia molecular para detectar e refletir a situação real de infecções causadas por várias espécies de *Leishmania* nesses insetos.

Assim, a identificação das espécies de *Leishmania* circulantes pode auxiliar na descrição de um perfil de distribuição geográfica das espécies, além de um perfil de transmissão das leishmanioses, contribuindo para o diagnóstico etiológico e o conhecimento da epidemiologia da doença (GRIMALDI *et al.*, 1989).

Dessa forma, considerando as informações supracitadas, foi realizado um estudo em Serra dos Carajás e Santarém, municípios do Estado do Pará, para caracterizar parasitas do gênero *Leishmania* em flebotomíneos dessas duas áreas.

2 JUSTIFICATIVA

A identificação de *Leishmania* em flebotomíneos da fauna de Serra dos Carajás e Santarém no Estado do Pará é um parâmetro importante para a composição do cenário atual desse protozoário nas duas regiões.

A região de Serra dos Carajás é uma área que já apresenta histórico de infecção em flebotomíneos por *Leishmania* desde a década de 70, onde foram evidenciados através de estudos realizados pelo IEC, infecção por *Leishmania Viannia braziliensis* no díptero *Psychodopygus wellcomei*. Quarenta anos após os primeiros registros de infecção, torna-se necessário examinar novas espécies de flebotomíneos, com a finalidade de verificar a presença de infecção por parasitos do gênero *Leishmania* subgênero *Viannia* em flebotomíneos nessa região.

Quanto a Santarém, estudos preliminares realizado pelo Programa de Leishmanioses do IEC demonstraram a existência de várias espécies de parasitos do gênero *Leishmania* acometendo seres humanos nessa região. Além disso, o crescente aumento na última década nos dados epidemiológicos das leishmanioses nesta localidade despertou interesses no Programa de Leishmanioses do IEC para instituir um estudo sobre infecção por *Leishmania* em flebotomíneos da região.

Por essa razão, parte das amostras isoladas de ambas as localidades foram analisadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o intuito de esclarecer se há presença de parasitos do gênero *Leishmania* subgênero *Viannia* infectando diferentes flebotomíneos.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

- Identificar por método molecular os protozoários do gênero *Leishmania* presentes em amostras de conteúdo intestinal de flebotomíneos capturados em Serra dos Carajás e Santarém, Pará.

3.2 ESPECÍFICO:

- Caracterizar as amostras de *Leishmania sp.* isoladas em cultura, em nível de Subgêneros, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase com o uso de iniciadores que amplificam o gene de miniexon, S1629 e S1630.

- Correlacionar os subgêneros de *Leishmania* identificados com as espécies de flebotomíneos capturadas, com os dados literários.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 GÊNERO *LEISHMANIA*

Os parasitos do gênero *Leishmania* são definidos como seres digenéticos que apresentam duas fases distintas em seu ciclo de vida: fase promastigota representada por flagelados móveis que vivem no interior do trato digestivo dos vetores flebotomíneos, e fase amastigota que não possui flagelo livre e que ocupa os macrófagos do hospedeiro vertebrado (CUPOLILLO *et al*, 2000; CASTRO *et al*, 2002; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Este parasito transmite as leishmanioses que são doenças ocasionadas por transmissão vetorial, infecciosa e que apresenta evolução crônica. Essas enfermidades podem apresentar-se de duas formas distintas: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (LV) (MAGILL, 1995; GONTIJO & CARVALHO, 2003; GRAMICCIA & GRADONI, 2005).

4.1.1 Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses possuem uma importância distinta no cenário da epidemiologia tropical e o conhecimento aprimorado dos vetores transmissores dessa doença pode representar significativos avanços nas pesquisas do processo de transmissão da *Leishmania* ao homem, uma vez que são descritas mais de 800 espécies de insetos e estima-se que 81 são capazes de transmitir estes parasitas (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Estima-se que a leishmaniose (tegumentar e visceral) em dias atuais deva apresentar uma prevalência de 12 milhões de casos no mundo, sendo que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, com uma suscetibilidade em 88 países e uma incidência de 1-1.5 milhões de novos casos por ano de leishmaniose cutânea (WHO, 2009).

Essa realidade não é muito distante da brasileira em que dados mostram que no período de 1985 a 2005 registrou-se uma média anual de 28.568 casos autóctones de leishmaniose tegumentar com um coeficiente de detecção médio de 18,5 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período observou-se uma tendência ao crescimento, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994/1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2007).

Segundo Ministério da Saúde (MS), no início da década de 80 foi registrado casos em 19 unidades federadas, já no ano de 2003, o cenário alterou demonstrando registros em todas as unidades federadas. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos registrados no período (cerca de 36,0% do total de casos), com os coeficientes médios mais elevados também (85,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões nordeste (43,5 casos/100.000 habitantes) e Centro-oeste (37,5 casos/100.000 habitantes) (BRASIL, 2009).

Dados recentes na epidemiologia da doença mostram que no período entre 2000 a 2009 foram registrados 260.573 casos de LTA no Brasil (tabela 1). Houve registros de distribuição em todas as Unidades Federadas e a região Norte em 2009 representa 8272 registros de casos, seguida pelas regiões Nordeste com 6910 casos, Centro-Oeste com 4492 casos, Sudeste com 1605 casos e a região Sul com 464 registros, perfazendo um total 21824 casos nesse período. (SINAN/SVS/MS, 2010).

Tabela 1. Casos de LTA no Brasil no período de 2000 a 2009.

| UF | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Rondônia | 1421 | 1563 | 1812 | 1980 | 2181 | 1668 | 1204 | 971 | 941 | 1035 |
| Acre | 903 | 717 | 1076 | 1385 | 1532 | 1356 | 1124 | 913 | 972 | 906 |
| Amazonas | 1744 | 2153 | 2130 | 3816 | 2212 | 1957 | 1554 | 2219 | 1778 | 1439 |
| Roraima | 352 | 454 | 451 | 303 | 160 | 280 | 285 | 340 | 350 | 441 |
| Pará | 5565 | 2521 | 3741 | 4862 | 5324 | 4345 | 3554 | 4305 | 3623 | 3347 |
| Amapá | 592 | 52 | 377 | 555 | 1162 | 580 | 595 | 667 | 629 | 513 |
| Tocantins | 563 | 647 | 620 | 607 | 554 | 493 | 517 | 475 | 387 | 591 |
| Maranhão | 4488 | 5658 | 4364 | 3777 | 3072 | 3395 | 2174 | 2335 | 1661 | 1624 |
| Piauí | 95 | 164 | 151 | 126 | 117 | 257 | 152 | 108 | 73 | 104 |
| Ceará | 3043 | 2543 | 2123 | 1329 | 2054 | 1977 | 1006 | 935 | 700 | 993 |
| Rio Grande do Norte | 11 | 8 | 5 | 8 | 13 | 10 | 7 | 6 | 6 | 56 |
| Paraíba | 177 | 50 | 68 | 56 | 74 | 68 | 46 | 60 | 53 | 109 |
| Pernambuco | 1149 | 518 | 556 | 558 | 719 | 337 | 413 | 446 | 388 | 501 |
| Alagoas | 258 | 88 | 80 | 97 | 65 | 57 | 33 | 111 | 89 | 77 |
| Sergipe | 58 | 93 | 61 | 16 | 7 | 11 | 6 | 4 | 10 | 11 |
| Bahia | 3799 | 2027 | 1965 | 2018 | 1732 | 2000 | 2332 | 1920 | 3023 | 3435 |
| Minas Gerais | 1874 | 1116 | 1610 | 1767 | 1507 | 1802 | 1855 | 1322 | 1123 | 1021 |
| Espírito Santo | 548 | 351 | 209 | 234 | 146 | 193 | 241 | 109 | 76 | 100 |
| Rio de Janeiro | 250 | 169 | 289 | 226 | 209 | 317 | 283 | 119 | 55 | 92 |
| São Paulo | 266 | 476 | 786 | 1025 | 678 | 497 | 489 | 348 | 338 | 392 |
| Paraná | 850 | 553 | 909 | 886 | 579 | 444 | 409 | 438 | 533 | 409 |
| Santa Catarina | 1 | 10 | 14 | 28 | 17 | 84 | 158 | 67 | 87 | 45 |
| Rio Grande do Sul | 2 | 5 | 20 | 18 | 11 | 13 | 6 | 9 | 10 | 10 |
| Mato Grosso do Sul | 158 | 372 | 301 | 235 | 192 | 139 | 116 | 99 | 118 | 105 |
| Mato Grosso | 3921 | 3816 | 4067 | 4189 | 3752 | 3639 | 3181 | 2715 | 2521 | 3900 |
| Goiás | 525 | 411 | 441 | 500 | 458 | 578 | 505 | 246 | 351 | 460 |
| Distrito Federal | 1 | 30 | 30 | 56 | 58 | 32 | 50 | 35 | 15 | 27 |
| Ignorada | 1106 | 71 | 105 | 157 | 142 | 155 | 102 | 85 | 82 | 81 |
| Total | 33720 | 26636 | 28361 | 30814 | 28737 | 26685 | 22397 | 21407 | 19992 | 21824 |

Fonte: SINAN/SVS/MS atualizado em 10/08/2010.

O Estado do Pará nos últimos anos tem apresentado dados mais alarmantes em leishmaniose, fato este comprovado pelos números do Ministério da Saúde que registrou em

2009, a incidência de leishmaniose tegumentar de 53 casos/100 mil habitantes (SINAN/SVS/MS, 2010).

Segundo o Departamento de Controle de Endemias da Secretaria de Estado de Saúde Pública (Sespa), no Pará em 2005, foram notificados 4.400 casos de leishmaniose tegumentar, 3.844, em 2006, 4566, em 2007 e em 2008, 3729 casos. É importante frisar que os maiores registros de leishmaniose tegumentar foi no município de Santarém, fato comprovado pelos dados dos anos de 2002, 2003, 2004 e 2005 que apresentaram respectivamente 383, 273, 283 e 156 casos, sendo o ápice apresentado no ano de 2002 (PARÁ, 2009).

4.1.2 Etiologia da doença

Quanto à etiologia da doença admite-se que é causada por várias espécies de protozoários da ordem *Kinetoplastida* (VICKKERMANN,1976), Família *Trypanosomatidae* (GROBBEN,1905) pertencente ao gênero *Leishmania* (ROSS,1903) sendo agrupadas devido suas semelhanças nas características morfológicas (SIMPSON *et al*, 2002).

A leishmaniose humana é ocasionada por pelo menos 14 espécies de protozoários capazes de manifestar a LTA (LAINSON & SHAW, 1998). No Brasil, destas espécies descritas, pelo menos sete são encontradas causando patogenicidade ao homem (SILVEIRA, 2002).

As espécies de *Leishmania* que transmitem leishmaniose estão representadas pela forma tegumentar que é promovida principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e a *L(V) lindenbergi* além da forma visceral que é ocasionada pela *L. (L.) infantum chagasi*. Cada espécie tem suas características próprias relativas às manifestações clínicas, a vetores,

reservatórios e padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica e a conduta a resposta terapêutica (VALE & FURTADO, 2005).

4.1.3 Classificação dos parasitos e distribuição geográfica

De acordo com características peculiares as diversas espécies de *Leishmania*, como o perfil de desenvolvimento deste flagelado no trato digestivo do vetor, os autores Lainson e Shaw (1987) apresentaram uma subdivisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* com o objetivo de classificar melhor este parasito.

Assim, observaram que quando a espécie de *Leishmania* se desenvolve na região anterior, média e posterior do trato intestinal do inseto, região peripilária, é dita como pertencente ao sub-gênero *Viannia*. De mesmo modo, quando a espécie se desenvolve na região anterior e média do intestino, região suprapilária, é dita como pertencente ao subgênero *Leishmania*.

Baseado nesses critérios, as espécies de *Leishmania* foram divididas em dois grupos: velho mundo (espécies que agrupam o subgênero *Leishmania*) e novo mundo (espécies que agrupam o subgênero *Viannia*). É importante fazer essa diferenciação uma vez que as espécies do novo mundo estão associada com a doença mais grave e mais prolongada (BAILEY & LOCKWOOD, 2007).

Com respeito à distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* percebe-se que existe uma ampla distribuição (BRASIL, 2007), a citar:

Leishmania (Viannia) braziliensis que ocorre no Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia, Venezuela, Guatemala, Nicarágua, Panamá e Honduras (VALE & FURTADO, 2005) é transmitida por muitos vetores, destacando-se *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia carrerai*

carrerae, *Lutzomyia intermedia* (s.l.), *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia pessoai* e *Lutzomyia umbratilis*.

Leishmania (*Viannia*) *guyanensis* com distribuição na região Norte, no Suriname, Guiana, Guiana Francesa e Colômbia. Causa frequentemente lesões cutâneas múltiplas em pessoas que frequentam as florestas, e é transmitida pelos vetores *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia anduzei* (VALE & FURTADO, 2005).

Leishmania (*Viannia*) *lainsoni* tem distribuição mais concentrada no Estado do Pará, podendo ser encontrada também em outros estados como Rondônia e Acre, foi isolada em animais silvestres (*Agouti paca*), sendo transmitida por *Lutzomyia ubiquitalis* (SILVEIRA, 1991; BRASIL, 2007).

Leishmania (*Viannia*) *naiffi* foi isolada de animal silvestre (tatu) na Amazônia, apresentando-se em evidência no estado do Pará, onde foram registrados casos da infecção humana sendo responsáveis pela transmissão vetorial: *L. whitmani*, *L. ayrozai*, *L. paraensis* e *L. squamiventris* (BRASIL, 2007). Pode também ser encontrada na região do Equador, na área amazônica transmitida por *L. tortura* e ainda região da Guiana Francesa (KATO *et al*, 2008).

Leishmania (*Viannia*) *shawi* foi isolada de animais silvestres (macacos, preguiças, quatis) na Amazônia apresentando registros em humanos no Estado do Pará, sendo transmitida por *L. whitmani* (BRASIL, 2007). Há também registros da circulação dessa espécie na Zona da Mata em Pernambuco (BRITO *et al*, 2009).

Leishmania (*Viannia*) *lindenberg* foi isolada de infecções em soldados em treinamento em área de reserva florestal no Pará. Não existe relatos de infecções em animais ou flebotomíneos. A provável espécie vetora é *Lutzomyia antunesi* (SILVEIRA, 2002; BRASIL, 2007).

Leishmania (Leishmania) amazonensis tem distribuição ampla, principalmente nas florestas tropicais da região Amazônica. Ocorre no Brasil, Colômbia, Paraguai, Bolívia, Guiana Francesa. No Brasil, tem sido registrada também nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste sendo transmitida principalmente por *Lutzomyia flaviscutellata* mas também há registros do *Lutzomyia olmeca* como vetor e tem um importante papel como agente causador da Leishmaniose Anérgica Cutânea Difusa (BASANO & CAMARGO, 2004).

4.1.4 Ciclo Biológico, Manifestações clínicas, Diagnóstico, Tratamento

O ciclo inicia-se quando o flebotomíneo pica o hospedeiro vertebrado infectado ingerindo assim a forma amastigota contida no tecido do hospedeiro vertebrado. No intestino do vetor, as células se rompem e as formas amastigotas liberadas se diferenciam em formas promastigotas, as quais serão transmitidas para um hospedeiro mamífero não infectado. Durante um novo repasto sanguíneo, a fêmea infectada inoculará as formas promastigotas, juntamente com a sua saliva, dentro da pele do hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado, essas formas infectarão rapidamente células do sistema fagocítico (principalmente macrófagos), diferenciando-se em formas desprovidas de flagelo conhecidas como amastigotas (CHANG *et al*, 1990; ROMÃO *et al*, 2007). Essas formas amastigotas sobrevivem e se replicam por divisão binária no ambiente ácido do fagolisossomo. À medida que as formas amastigotas se multiplicam, as células infectadas são lisadas e as amastigotas são liberadas para parasitar novas células (ROMÃO *et al*, 2007) (Figura 1).

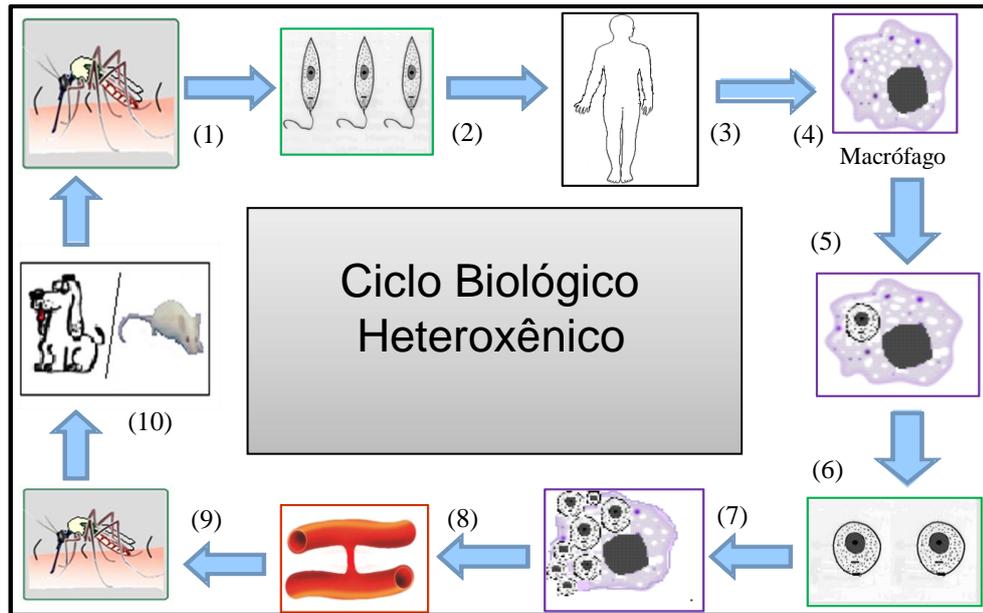


Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania*.

(1) Flebotomíneo; (2) Formas promastigotas presentes no intestino do flebotomíneo; (3) homem infectado pelas formas promastigotas; (4) macrófagos passível de infecção; (5) macrófagos infectados pela forma amastigota; (6) divisão binária da amastigota; (7) sucessivas divisões até rompimento do macrófago; (8) formas amastigotas caem em corrente sanguínea; (9) novo flebotomíneo faz hematofagia no homem (10) Hematofagia do flebotomíneo em mamíferos ou roedores.

De acordo com as manifestações clínicas, a virulência da espécie e do grau de suscetibilidade do hospedeiro as leishmanioses podem ser classificadas em três grupos importantes: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose muco cutânea (LMC), leishmaniose visceral (PEDROSA & ROCHA, 2004; CORRÊA *et al*, 2005; GIL *et al*, 2008).

No entanto, para que ocorra o desenvolvimento de manifestações, existem alguns fatores importantes para que a infecção pela *Leishmania* obtenha êxito, são eles: a) os eventos responsáveis pelo estabelecimento da infecção, representado pela interação macrófago-*Leishmania* ou a interação *Leishmania*-neutrófilo-saliva do vetor-macrófago; b) os eventos responsáveis pelo resultado da infecção representado pela interação *Leishmania*-Células Dendríticas e a interação das Células de Langerhans e linfócitos T (SILVEIRA *et al*, 2009).

No homem, quando as manifestações clínicas se instalam, abrangem desde formas inaparentes, lesões discretas de pele que podem evoluir espontaneamente para cura, ulcerações múltiplas, lesões de mucosas, até formas com tendência às metástases e recidivas,

de curso lento e tratamento difícil, com a presença de seqüelas desfigurantes, destrutivas e incapacitantes (RAZIERA *et al*, 2005; SANGIONI *et al*, 2007). Podendo ser classificadas em:

Leishmaniose Cutânea: apresenta lesões cutâneas ulcerosas ou não, únicas ou múltiplas, porém limitadas. As lesões apresentam bordas elevadas e centro papuloso e úmido, podendo apresentar-se de forma irregular com lesões vegetativas ou verrugosas ou de borda regular (Figura 2). Dependendo do agente etiológico pode ocorrer cura espontânea e o paciente pode ou não responder ao tratamento. Podem evoluir para forma mucosa em 3 a 5 % dos casos.

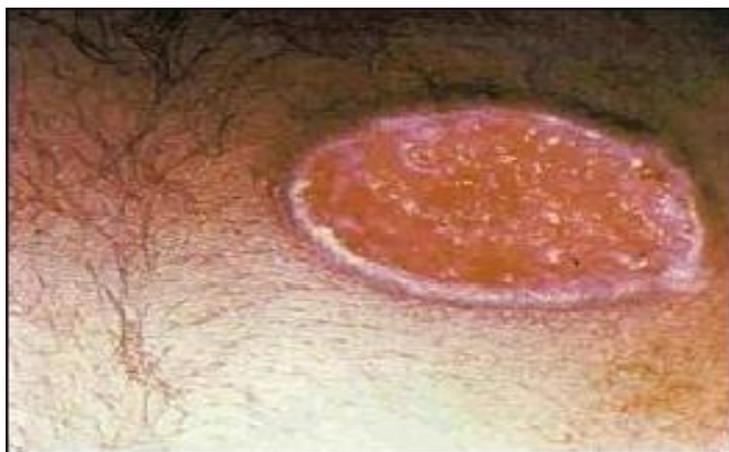


Figura 2 - Lesão de leishmaniose cutânea de bordas regulares.

Fonte: <http://www.coderp.com.br>

Leishmaniose Mucosa: as lesões na maioria das vezes apresentam-se secundárias as lesões cutâneas, porém podem se manifestar concomitante a lesão. Após terem cicatrizado a lesão cutânea podem levar meses a anos para se manifestar. Podem comprometer a cavidade nasal, faríngea, laríngea e a cavidade oral (figura 3) e geralmente não respondem bem ao tratamento tornando-se uma forma difícil de tratar.



Figura. 3- Lesão de Leishmaniose mucosa localizada na cavidade oral em palato e lábios.

Fonte: <http://www.i32.tinypic.com/b6ztb5>

Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa: Caracteriza-se pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme, que acometem várias partes do corpo, envolvendo, com frequência, a face e o tronco (Figura 4). É uma forma muito rara, apresenta nódulos e lesões infiltradas de maneira difusa pelo tegumento, em pacientes anérgicos a antígenos de leishmania (GUIMARÃES *et al*, 2005).



Figura 4 - Leishmaniose cutânea difusa evidenciada em face.

Fonte: <http://www.who.int/leishmaniasis>

Leishmaniose visceral: É uma doença febril de curso prolongado, caracterizada por palidez, emagrecimento, aumento do volume abdominal, hepatoesplenomegalia e edema (Figura 5). Observam-se ainda outras manifestações clínicas como tosse, diarreia, icterícia e sangramentos que dificultam o diagnóstico diferencial com outras doenças, retardando sua

identificação, e levando quase sempre o paciente à morte quando não tratada (WHO, 1982; PEDROSA & ROCHA, 2004).



Figura 5- Caso de Leishmaniose visceral evidenciando hepatoesplenomegalia.
Fonte: <http://www.vet.uga.edu/vpp/nsep/brazil2002/leishmania>

Para o diagnóstico de LTA é essencial a coleta de dados clínicos e epidemiológicos além da confirmação por meio de diferentes métodos laboratoriais. Dentre estes, são utilizados, com desempenhos variáveis, a reação intradérmica de Montenegro (IRM), a pesquisa de *Leishmania* em material de biópsia de pele ou mucosa e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (FERREIRA *et al*, 2006).

Em se tratando da LV, nos casos humanos o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas no que concerne o grande número de testes disponíveis para o diagnóstico (como fixação do complemento, imunofluorescência indireta, teste de aglutinação direta, Elisa, dot-Elisa e técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase) nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO & MELO, 2004), então o diagnóstico mais concreto baseia-se no

encontro do parasita em tecido de medula óssea, baço, fígado, ou linfonodo (QUEIROZ *et al*, 2004).

Quanto ao tratamento é interessante frisar que as intervenções terapêuticas e imunológicas podem afetar diretamente o resultado de infecções por *Leishmania*. Uma variedade de agentes terapêuticos pode atuar para abrandar ou tratar os sintomas da leishmaniose, reduzindo a carga parasitária, alterando a antígenos de *Leishmania* expostos ao sistema imune, por consequência alterando a cascata de citocinas e afetando diretamente a resposta imune (EHRENFREUND-KLEINMAN, 2005).

Sabe-se que parte dos casos de leishmaniose tegumentar (independentemente da espécie do parasito responsável) pode curar espontaneamente dentro de 3-18 meses, bem como a determinação do período da droga para verificar eficácia são diferentes daquelas apresentadas para LV. Um curso de três semanas do antimonial geralmente é o tratamento mais comum, especialmente em pacientes com desfigurações ou recidivas de leishmaniose cutânea ou mucocutânea, sendo que, para mucocutânea o tratamento pode se estender até 30 dias (HERWALDT, 1999; DAVIES *et al*, 2003).

A droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente, que foi padronizado pela OMS na dose entre 10 a 20mg/Sb⁺⁵/Kg/dia (Sb⁺⁵ significando antimônio pentavalente), por 20 a 30 dias para lesões de pele e até 40 dias para LV. Há drogas alternativas como stibugluconato de pentamidina e anfotericina B, utilizadas nas formas rebeldes ao tratamento convencional. Vale enfatizar que, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento mucoso é freqüente, sendo de 2% nos casos tratados e cerca de 10% nos casos não tratados (BASANO & CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007).

4.1.5 Caracterização do parasito

A caracterização de *Leishmania* é realizada por vários métodos a citar a biologia molecular, bioquímica e imunologia, o que configura novas perspectivas na taxonomia deste protozoário.

Os métodos que passaram a ser empregados incluem principalmente o estudo do desenvolvimento dos promastigotas no intestino do flebotomíneo, o estudo morfométrico das formas amastigotas e promastigotas à microscopia eletrônica, a mobilidade eletroforética de isoenzimas, a determinação da densidade flutuante do DNA do núcleo e do cinetoplasto, a análise de produtos de digestão do DNA por enzimas de restrição, a caracterização de antígenos específicos de membrana externa pelos anticorpos monoclonais, as técnicas de hibridização do DNA/RNA e a análise do DNA do cinetoplasto por meio da técnica de amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (VALE & FURTADO, 2005).

4.2 FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos (ordem: *Díptera*, família: *Psychodidae*, Sub-Família: *Phlebotominae*,) são insetos transmissores de várias zoonoses como as bartoneloses (BIRTLES, 2001), fleboviroses (TESH, 1988) e determinadas flaviviroses, orbiviroses e vesiculoviroses (COMER & TESH, 1991; ASHFORD, 2001).

Estes dípteros podem causar problemas de saúde para o homem e animais domésticos tornando-se de importância para área médica em pelo menos 80 países (ALEXANDER & MAROLI, 2003).

Em condições naturais, muitos microrganismos podem ser encontrados albergados em flebotomíneos incluindo bactérias, protozoários, gregarinos, fungos e nematódeos (SOARES & TURCO, 2003). Porém, para distinguir que tipo de infecção pode ocorrer em um díptero, é necessário fazer a identificação do parasita.

4.2.1 Taxonomia do flebotomíneo

Analisando os critérios taxonômicos de flebotomíneos, Young e Duncan (1994) propuseram uma classificação nos dípteros da família *Phlebotominae* baseada na classificação feita por Lewis em 1977, sendo feitas algumas adaptações. Assim, descreveram a existência de três gêneros responsáveis pela transmissão de leishmaniose no Novo Mundo, sendo o gênero *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Varileya*, além de mais três gêneros responsáveis pela transmissão da leishmaniose no Velho Mundo, descritos por *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*.

No entanto, Galati (2003) considerando que essa classificação necessitava ser complementada sugeriu modificações nesta taxonomia incluindo mais recentemente o gênero *Psychodopygus* no universo dos vetores responsáveis pela transmissão no Novo Mundo, com o objetivo de especificar melhor os gêneros para aperfeiçoar a compreensão da genealogia desses dípteros (RANGEL & LAINSON, 2009).

4.2.2 Características do flebotomíneo

Em relação às características do flebotomíneo, observa-se que é um díptero que geralmente não ultrapassa 0,5 cm de comprimento, tendo pernas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Têm como característica o voo curto e saltitante e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso, diferente de outros dípteros (MARZOCHI *et al.*, 1999; BASANO & CAMARGO, 2004).

É popularmente conhecido como mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado, sendo responsável pela transmissão dos parasitos aos hospedeiros (BASANO & CAMARGO, 2004).

Em se tratando dos hábitos alimentares, somente a fêmea executa a hematofagia no animal vertebrado ou invertebrado, com o objetivo de fazer a postura de seus ovos. A alimentação pode ser feita durante o dia, porém é mais frequentemente vista durante o período noturno (GOMES *et al.*, 1989; GALATI *et al.*, 1999).

4.2.3 Aspectos relacionados à transmissão

Considerando o número de espécies relacionadas ao processo de transmissão, observa-se que no velho mundo há registros de aproximadamente 40 espécies do vetor *Phlebotomus*, envolvidas na transmissão da leishmaniose, enquanto que no Novo Mundo, são consideradas em torno de 30 espécies do vetor *Lutzomyia* envolvidas na transmissão da leishmaniose nas Américas (ALEXANDER & MAROLI, 2003).

O gênero *Lutzomyia* ainda apresenta 350 espécies catalogadas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina, sendo que destas, pelo menos 200 ocorrem na bacia amazônica, estando inclusas as espécies suspeitas da transmissão da leishmaniose (BASANO & CAMARGO, 2004).

Para se afirmar que um flebotomíneo é vetor de um tipo de leishmaniose há necessidade de se basear em evidências sobre alimentação, transmissão entre homem, reservatórios silvestres e também na manutenção da infecção pelo parasita após repasto sanguíneo infectante. Além disso, outros fatores também precisam ser apontados como: a) proposição de uma distribuição similar do inseto e do parasita; b) formulação da conclusão do ciclo de vida do parasita no flebotomíneo; c) composição das evidências de transmissão por picada de inseto. Contudo, nem sempre é possível provar sua participação como vetor, e assim, considera-se como vetor suspeito a espécie que albergue a infecção natural (KILLICK & KENDRICK, 1999; ROTUREAU, 2006; ODORIZZI & GALATI, 2007).

Dessa forma, o reconhecimento do inseto, representa uma característica relevante para entomologia médica, principalmente nas regiões consideradas endêmicas para leishmaniose, pois através dessa identificação pode ser demonstrado como ocorre o processo de transmissão feito pelo flebotomíneo, ou ainda descrever o papel de um possível vetor de leishmaniose. (OLIVEIRA-PEREIRA *et al*, 2006).

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

É uma técnica descrita por Kary Mullis na década de 80 a qual tem como essência a reprodução de milhares de cópias de DNA *in vitro* catalisada pela enzima *Taq* polimerase que se mantém estável depois de repetidas exposições a 94°C (ROSELINO, 2008).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o PCR possibilitou a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em quantidades mínimas como 50 fentograma (fg) de DNA do parasita, facilitando a investigação da infecção de flebotomíneos que antes era feita através da dissecação do inseto e observação direta do parasita, o que consumia tempo e requeria grande habilidade técnica, principalmente no que concerne ao tamanho reduzido dos insetos (OLIVEIRA-PEREIRA *et al*, 2006).

A utilização dessa metodologia tem sido realizada para diagnóstico de leishmaniose (MICHALSKY, 2002) como também na identificação de reservatórios animais, detectando parasitas independentemente do local, estágio, abundância e transmissibilidade do mesmo (OLIVEIRA-PEREIRA *et al*, 2006).

DISCH *et al* (2004) demonstrou através de seu estudo feito em amostras de medula óssea, baço, linfonodo e sangue periférico que o diagnóstico de LV através da técnica de

reação de cadeia de polimerase (PCR), constituiu avanço importante, haja vista sua sensibilidade em sangue periférico apresentar-se em torno de 94%, e a especificidade 100%. Porém, o estudo de revisão de literatura realizado por Davies et al (2003), demonstrou que a sensibilidade diagnóstica do PCR é muito boa quando comparada a outros métodos como esfregaço (51%), cultura (47%) e o exame histopatológico (35%), registrando uma precisão diagnóstica de 88%, além disso, ainda afirmou que a sensibilidade do PCR aumenta quando os produtos amplificados são hibridizados, com sondas de DNA que permitam a identificação do subgênero ou espécie de *Leishmania*. Fato comprovado por Aviles e cols, quando utilizaram a técnica do PCR combinada com southern blotting, tendo a sensibilidade deste método aumentado para 93%, quando comparada à PCR (83%) utilizada isoladamente.

Para Kato *et al* (2007) a PCR apresenta boa sensibilidade e especificidade na amplificação de DNA e detecção de protozoários do gênero *Leishmania* e do gênero *Endotrypanum*, permitindo inclusive se estabelecer um método de detecção em larga escala de flebotomíneos infectados por estes protozoários.

Dessa forma, a técnica de amplificação de DNA por PCR que apresenta maior sensibilidade ou especificidade para o gênero *Leishmania* é a que alcança a sequência alvo no DNA do cinetoplasto do parasito, reconhecidas por primers universais específicos, se tornando a mais valiosa ferramenta para realização da análise e detecção de gênero ou até espécies (SCHALLIG & OSKAM, 2002; PAIVA *et al*, 2007).

Como demonstração de sua utilidade clínica oferece vantagens por ser altamente sensível e específico, e ainda, por ser mais rápido do que os métodos atualmente disponíveis para LTA, a saber, os testes sorológicos, o teste de Montenegro e exame microscópico da biópsia da lesão. Pode detectar tanto o DNA como o RNA do parasita em diagnóstico de

material humano, canino ou em flebotomíneos. (OLIVEIRA *et al*, 2003; JUNIOR *et al*, 2009).

Porém como toda técnica apresenta algumas limitações como à necessidade do uso de solventes tóxicos como fenol e clorofórmio, além de ser um método caro (kits comerciais baseados em silício) para realização da técnica pode consumir tempo considerável e restringe-se a nível laboratorial (MEDINA-ACOSTA & CROSS, 1993; ROTUREAU, GEGO & BERNARD, 2005). Em se tratando do DNA da amostra, tem-se ainda a necessidade do conhecimento da sequência a amplificar, pois somente assim é possível sintetizar primers específicos para identificação do tripanossomatídeo em questão. Além disso, por se tratar de um método muito sensível, pode ocorrer contaminação de DNA estranho na amostra, por isso, é interessante que se tenha áreas separadas para preparação da mistura do PCR, inclusão do DNA das amostras e área de amplificação e detecção da pesquisa. E ainda para tornar o teste mais seguro é apropriado incluir controles positivos e negativos nas análises a fim de confirmar sensibilidade e especificidade do experimento (SCHALLIG & OSKAM, 2002).

Quanto à realização do diagnóstico de leishmaniose em zona rural, constitui uma barreira muito grande devido à dificuldade em confirma-se os casos positivos somente pelo diagnóstico clínico, sendo então necessária a implementação da técnica de PCR, para auxiliar os profissionais de saúde na confirmação de casos, atrelando o diagnóstico clínico da patologia ao laboratorial. (AMPUERO *et al*, 2009).

Novas Abordagens utilizando a PCR tendem a ser promissoras para flagelados tripanossomatídeos. Particularmente à definição de marcadores conhecidos seriam necessários para identificar de forma fidedigna a espécie do protozoário em questão. No entanto, ainda não é possível devido aos dados limitados de marcadores (DÁVILA & LUKES, 2003).

Como exemplo, tem-se o gênero *Endotrypanum*, que por ser difícil de distinguir por morfologia do gênero *Leishmania*, se faz necessário a adoção de medidas que otimizem a diferenciação desses parasitos, com isso, é notável a presença das técnicas moleculares para auxiliar nesse processo. No entanto, para que as mesmas esbochem resultados satisfatórios, é essencial a presença de marcadores mais precisos para o gênero *Endotrypanum*, o que representaria um avanço significativo a metodologia de identificação molecular. (GREIG *et al*, 1989, LOPES *et al*, 1990, FERNANDES *et al*, 1993, FRANCO *et al*, 1997).

A PCR está sendo aplicada em identificação de culturas de parasitas, onde vem sendo considerada por alguns autores como padrão-ouro devido sua alta especificidade, no entanto, mesmo que seja bastante específica, ainda apresenta baixa sensibilidade, o que conduz a mais pesquisas nesse sentido para definição de padrões-ouro, onde o que mais se aproxima é a associação clínica ao diagnóstico molecular e laboratorial (AMPUERO *et al*, 2009).

Os estudos de epidemiologia molecular das doenças infecciosas tiveram um importante progresso graças às técnicas moleculares de identificação e esse avanço significativo da biologia molecular propiciou o desenvolvimento de novos métodos de determinação de tipagem genômica utilizando técnicas variadas complementares a PCR tradicional. (FERÁNDZ-CUENCA, 2004; CAVALCANTI *et al*, 2008).

Com isso, a PCR permitiu a detecção de amplificação em tempo real e está se difundindo rapidamente em termos clínicos, principalmente no que concerne ao contexto de diagnóstico personalizado (MONIS & GIGLIO, 2006). Nesse sentido, a PCR cada vez mais vem sendo utilizado para o diagnóstico de protozoários parasitas de interesse médico, demonstrando sua aplicação clínica além das leishmanioses, para a detecção amebas (BLESSMANN *et al*, 2002), doença de Chagas (FREITAS *et al*, 2005; MIYAMOTO *et al*, 2007), toxoplasmose (BASTIEN, 2002; COSTA *et al*, 2008) entre outros.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo biológico descritivo onde foram estudadas 10 amostras de protozoários tripanossomatídeos isolados do conteúdo intestinal de flebotomíneos provenientes dos municípios de Serra dos Carajás e Santarém capturados pelo Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (IEC) setor de entomologia, através do método de PCR.

5.1 CAPTURA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Em uma etapa prévia as análises moleculares, foram capturados exemplares de flebotomíneos pelo programa de leishmanioses do IEC, seção de entomologia chefiada pelo pesquisador Dr. Adelson Souza (o qual são feitos agradecimentos *in memoriam* por ceder-nos gentilmente as amostras do estudo) em dois municípios diferentes: Serra dos Carajás e Santarém (Figura 6), sendo utilizado para coleta armadilhas de luz: uma do tipo CDC armada em dois locais, a 1 metro do solo e entre 15 a 20 metros da copa, ligadas as 18:00 hs as 6:00 hs. E a outra armadilha do tipo SHANNON, armada em nível do solo, ligada das 18:00 as 20:00 hs.

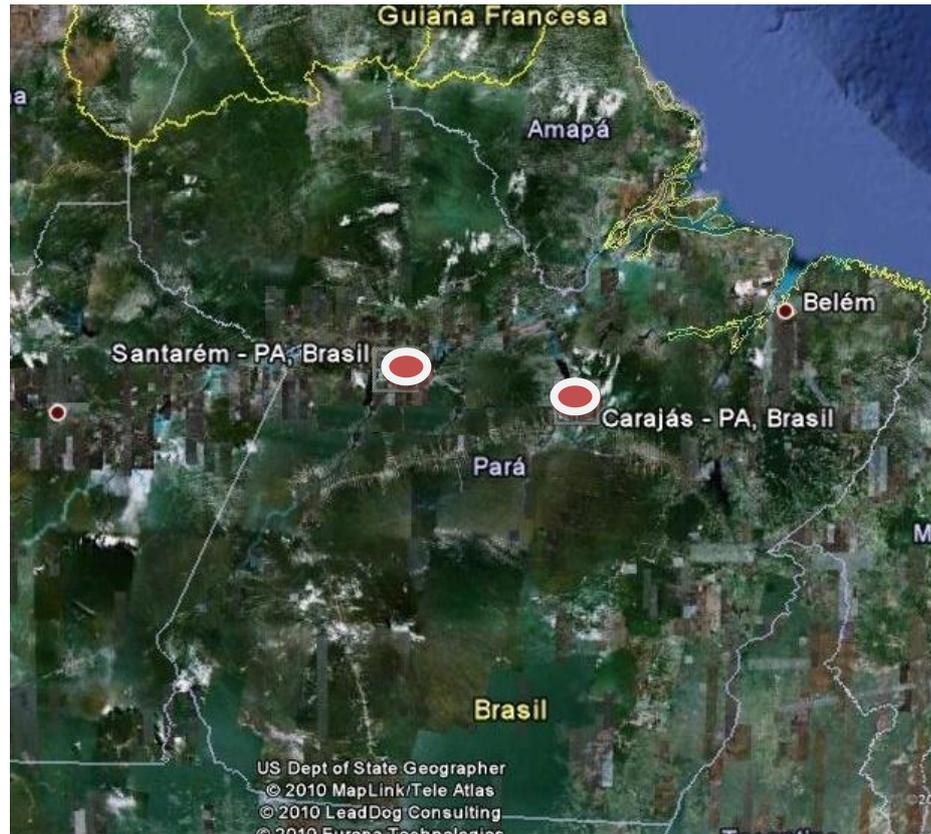


Figura 6- Mapa do Estado do Pará, com as delimitações das cidades de Carajás e Santarém.
Fonte : Google Earth

5.2 LOCAIS DE COLETA

5.2.1 Serra dos Carajás

A região de Serra dos Carajás faz parte da região Norte do território nacional, situa-se a Sudeste do Estado do Pará, no município de Parauapebas que compreende uma área territorial de 7.008 km². Apresenta as coordenadas 5° 35' 6" 00' latitude Sul e 50° 24' 51" 06' longitude Oeste (IBGE, 2010; SOUZA, 2010). Para a captura de flebotomíneos foram estudadas em Serra dos Carajás as seguintes áreas: Área de Proteção Ambiental do Gelado (APA do gelado) (Figura 7), Mina do Manganês Azul (Figura 8), Parque Zoobotânico de Quarentena (Figura 9) e Tapirapé-Aquirí (Figura 10).



Figura 7. APA do Gelado

Fonte : Google Earth



Figura 8: Mina do Manganês Azul

Fonte: Google Earth



Figura 9- Parque Zoobotânico da Quarentena

Fonte : Google Earth



Figura 10- Reserva indígena Tapirapé-Aquirí

Fonte: Google Earth

5.2.2 Santarém

A região de Santarém também faz parte da região Norte do território nacional, situa-se no estado do Pará, estando a aproximadamente, 710 quilômetros de Belém. Compreende uma área territorial de 22.887km². Pertence à Mesorregião do Baixo Amazonas e à Microrregião Santarém. A sede municipal apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 02° 25'30" Latitude Sul e 54° 42'50" Longitude Oeste (JACINTO *et al*, 2007). E para a captura de flebotomíneos estudou-se a região de Belterra (Figura 11).

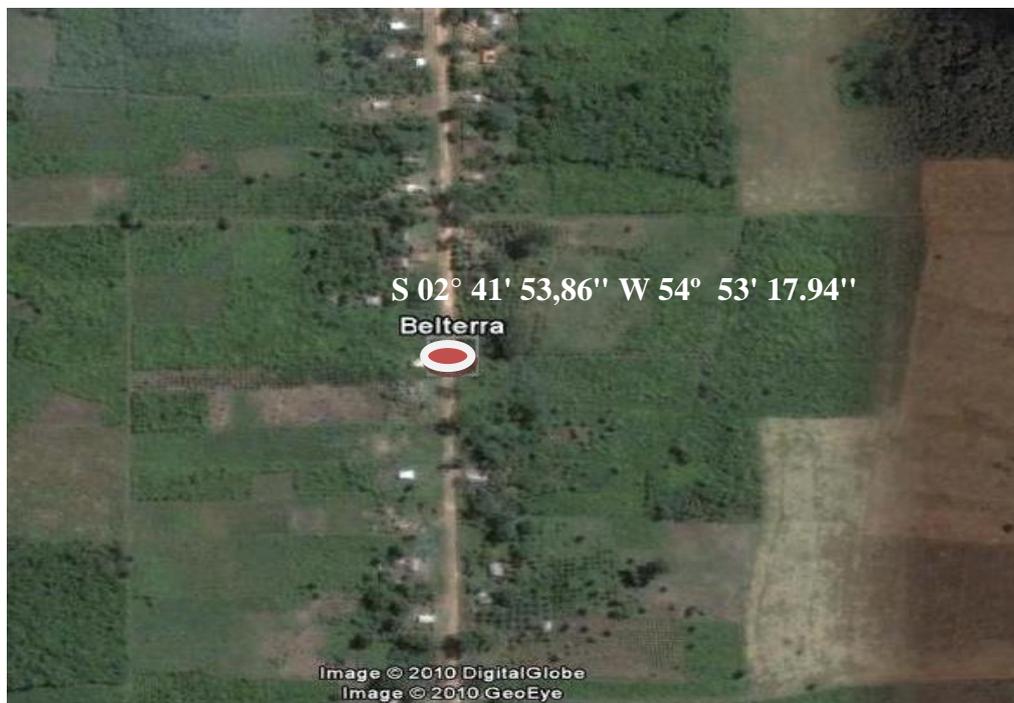


Figura 11. Flora de Belterra

Fonte: Google Earth

5.3 IDENTIFICAÇÃO DO FLEBOTOMÍNEO

O setor de entomologia do Programa de leishmanioses do IEC após a captura efetuou a identificação do flebotomíneo, iniciando pela separação do díptero de acordo com sexo, através do método de triagem com o auxílio de uma lupa, visualizando a morfologia externa da genitália do macho, com a finalidade de separação e identificação das fêmeas segundo Young e Duncan.

5.4 ISOLAMENTO DO PARASITO

Quando se visualizou parasitas flagelados no momento da observação microscópica, o conteúdo do aparelho digestivo foi triturado e inoculado em hamster e meio de cultura NNN (APÊNDICE I) para efetivação do isolamento do parasita.

Em seguida, as amostras de parasitas isoladas foram mantidas no criobanco do IEC para posterior análise bioquímica e molecular.

5.5 SELEÇÃO DE AMOSTRAS PARA O ESTUDO

As amostras presentes no criobanco do IEC foram selecionadas conforme o quadro 1.

Quadro1. Amostras selecionadas para o estudo.

| Amostra | Data de captura | Flebotomíneo capturado | Município |
|---------|-----------------|---|-------------------|
| M20906 | 23/04/2002 | <i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i> | Santarém |
| M21902 | 10/05/2003 | <i>Psychodopygus welcomei / complexus</i> | Santarém |
| M21903 | 11/05/2003 | <i>Psychodopygus davisi</i> | Santarém |
| M22340 | 28/10/2003 | <i>Lutzomyia gomezi</i> | Santarém |
| M22341 | 28/10/2003 | <i>Lutzomyia whitmani</i> | Santarém |
| M24013 | 19/03/2006 | <i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i> | Serra dos Carajás |
| M24014 | 20/03/2006 | <i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i> | Serra dos Carajás |
| M24015 | 20/03/2006 | <i>Lutzomyia brachypyga</i> | Serra dos Carajás |
| M24016 | 22/03/2006 | <i>Lutzomyia richardwardi</i> | Serra dos Carajás |
| M24019 | 27/03/2006 | <i>Lutzomyia umbratilis</i> | Serra dos Carajás |

As amostras foram retiradas do criobanco e cultivadas em meio de cultura NNN modificado Difco B45 e após atingirem a fase estacionária foram lavadas em solução salina fosfatada e glicose (PSG) (APÊNDICE II) por duas vezes sob centrifugação a 3500 xg por 10 minutos a 4°C, para obtenção de DNA.

5.6 CEPAS-REFERÊNCIA

Para identificação de amostra do estudo foram utilizadas cepas-referência de *Leishmania* da OMS (boletim da OMS- The leishmaniasis Technical Report séries 701, 1984) (Quadro 2) e cepas de *Endotrypanum sp* e outros Trypanossoma como *T. rangeli*, *T. cruzi* além da espécie *Crithidia fasciculata* mantidas no criobanco do Programa de leishmaniose do IEC.

Quadro 2. Cepas-referência de *Leishmania*.

| Espécies de <i>Leishmania</i> | Cepas-Referência |
|--------------------------------------|-------------------------|
| <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> | MHOM/BR/1975/M4147 |
| <i>Leishmania (V.) lainsoni</i> | MHOM/BR/1881/M6426 |
| <i>Leishmania (V.) naiffi</i> | MDAS/BR/1979/M5533 |
| <i>Leishmania (V.) shawi</i> | MCEB/BR/1984/M8408 |
| <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> | IFLA/BR/1968/PH8 |

Fonte: Laboratório do Programa de leishmanioses do IEC

Quadro 3. Amostra de tripanossomatídeos, *Endotrypanum* e *Crithidia*.

| Espécies | Número das amostras |
|---------------------------------|----------------------------|
| <i>Trypanossoma cruzi</i> | 21890 |
| <i>Trypanossoma cruzi</i> | 21891 |
| <i>Trypanossoma cruzi</i> | 21892 |
| <i>Trypanossoma rangeli</i> | 21893 |
| <i>Endotrypanum shaudini</i> | 11602 |
| <i>Crithidia flaviscutelata</i> | 11120 |

Fonte: Laboratório do Programa de leishmanioses do IEC

5.7 PROCEDIMENTO PARA PCR

5.7.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através de um kit comercial GenomicPrepTM blood DNA isolation da Amersham Biosciences, código 27-5236-01. Para execução da técnica, seguiu-se um protocolo que consiste de quatro etapas, descritas a seguir:

a) Processo de Lise Celular:

Para esse processo foi necessário adicionar 600 μ L de solução de lise do kit aos extratos de DNA e homogeneizar para efetivação da lise celular. Quando houve presença de grupos de células visíveis após a mistura, foi necessária incubação a 37°C por 10 minutos em estufa bacteriológica (Deo Leo).

b) Tratamento com a RNase

Adicionou-se 3 μ L de RNase A no lisado de células, para em seguida verter a mistura do tubo vinte e cinco vezes e incubar a 37°C por 30 minutos.

Após o resfriamento da amostra para a temperatura ambiente foi adicionado 200 μ L de solução de precipitação do kit no complexo células lisadas-RNase. Agitou-se por 20 segundos no agitador eletrônico (Vortex). Submeteu-se a uma centrifugação (HT centrifuge) de 14000 rpm por 3 minutos.

c) Precipitação de Proteínas

Retirou-se o sobrenadante contendo o DNA para outro tubo, adicionando-se 600 μ L de isopropanol. Em seguida, verteu-se novamente o tubo cinquenta vezes submetendo a centrifugação de 14000 rpm por 1 minuto.

Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e secou-se o tubo com papel absorvente limpo. Foi Adicionado 600 µL de etanol a 70% e mais uma vez o tubo foi invertido por 25 vezes para lavar os aglomerados de DNA e sofrer nova centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto. O etanol foi retirado totalmente do tubo e em seguida a amostra foi seca por 15 minutos.

d) Hidratação do DNA

Foi adicionado 50 µL de solução de hidratação de DNA e colocou-se em banho-maria a 65°C por 1 hora.

Armazenou-se o material a -20°C em freezer até o momento do uso.

5.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram testadas com os seguintes pares de iniciadores para a amplificação *in vitro* do DNA de *Leishmania*:

5.3.2.1 Marcadores do Miniexon:

a) Subgênero *Viannia* e *Leishmania*

S1629 (5'- GGG AAT TCA ATA WAG TAC AGA AAC TG- 3')

S1630 (5'- GGG AAG CTT CTG TAC TWT ATT GGT A - 3')

Para os marcadores S1629 e S1630, a PCR foi realizada em um volume total de 10 µL contendo dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 1,25 mM; MgCl₂ a 50 mM, solução tampão de PCR em uma concentração de 10x; DMSO; oligonucleotídeos sintéticos 200 ng/µL; Taq DNA polimerase a 5U/µL; DNA da amostra; água destilada estéril até o volume final de

10 μ L. Os marcadores utilizados amplificam aproximadamente 400pb do gene de Miniexon das espécies de *Leishmania* viscerotrópicas e 250 pb para o subgênero *Viannia* e 350 pb para a *Leishmania (L.) amazonensis* (FERNANDES *et al*, 1994; DEGRAVE *et al*, 1994).

Em termociclador (mastercycler personal) programado, a reação foi incubada a uma temperatura inicial de 95°C por 3 min. para a desnaturação do DNA; seguida de 5 ciclos nas seguintes temperaturas: 95°C por 1 min., 45°C por 30 segundos e 65°C por 1 min. Em seguida, a reação foi levada a uma temperatura de 95°C por um minuto, seguida de 35 ciclos nas condições de 95°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Ao final, a etapa de extensão foi mantida por 10 minutos a 72°C.

5.7.3 Eletroforese em gel de agarose

O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE (APÊNDICE III) com solução de azul de bromofenol, sendo submetida a 100V e 50 mA por 1 hora. O fragmento amplificado de DNA foi corado com brometo de etídio a 0,5 μ g/mL e as bandas foram visualizadas em transluminador UV. As imagens foram capturadas e fotodocumentadas.

6 RESULTADOS

O resultado da amplificação pela PCR das cinco amostras da região de Belterra no município de Santarém mostrou um perfil compatível com parasitas do gênero *Leishmania* do subgênero *Viannia* em 4 das 5 amostras estudadas (20906, 21902, 21903 e 22341), amplificando aproximadamente 250 pb, conforme demonstra a Figura 12.

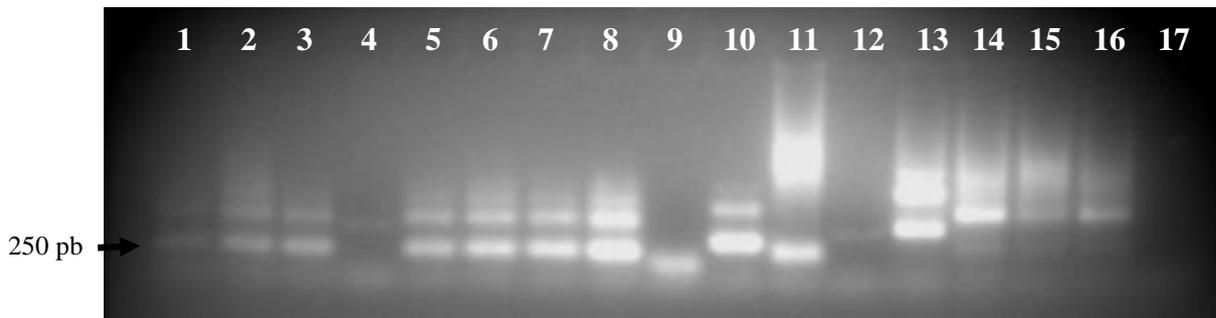


Figura 12. Gel de eletroforese a 1,5% corado com brometo de etídio. Produto da Amplificação do DNA com os primers S1629 e S1630. Em 1: 20906; 2: 21902; 3: 21903; 4: 22340; 5: 22341; 6: *L. shawi*; 7: *L. guyanensis*; 8: *L. naiffi*; 9: *L. lainsoni*; 10: *L. amazonensis*; 11: *T. rangeli*; 12: *E. shaudinni*; 13: *C. fasciculata*; 14: *T. cruzi*; 15: *T. cruzi*; 16: *T. cruzi*; 17: controle negativo.

Em contrapartida, não se observou reação positiva similar aos padrões de *Leishmania* nem aos padrões das espécies *Endotrypanum shaudinni*, *Trypanossoma rangeli*, *Crithidia fasciculata* e *Trypanossoma cruzi* na amostra 22340.

Tabela 2- Perfis das reações de PCR das amostras estudadas em Santarém.

| Amostra | Perfis dos Produtos Amplificados | | | | | | | | | | |
|---------|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Ls | Lg | Ln | Ll | La | Tr | Es | Cf | Tc ₁ | Tc ₂ | Tc ₃ |
| 20906 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 21902 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 21903 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 22340 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22341 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |

Ls: *Leishmania (Viannia) shawi*; Lg: *Leishmania (Viannia) guianensis*; Ln: *Leishmania (Viannia) naiffi*; Ll: *Leishmania (Viannia) lainsoni*; La: *Leishmania amazonensis*; Tr: *Trypanossoma rangeli*; Es: *Endotrypanum shaudinni*; Cf: *Crithidia fasciculata*; Tc₁: *Trypanossoma cruzi* cepa 1; Tc₂: *Trypanossoma cruzi* cepa 2; Tc₃: *Trypanossoma cruzi* cepa 3.

Os resultados da amplificação pela PCR das cinco amostras da região de Serra dos Carajás demonstraram não ser compatível com perfil de *Leishmania* e nem com outro tripanossomatídeo testado (conforme Figura 13).



Figura 13. Gel de eletroforese a 1,5% corado com brometo de etídio. Produto da amplificação do DNA com os primers S1629 e S1630. Em 1: 24013; 2: 24014; 3: 24015; 4: 24016; 5: 24019; 6: *L. shawi*; 7: *L. guyanensis*; 8: *L. naiffi*; 9: *L. lainsoni*; 10: *L. amazonensis*; 11: *T. rangeli*; 12: *E. shaudinni*; 13: *C. fasciculata*; 14: *T. cruzi*; 15: *T. cruzi*; 16: *T. cruzi*; 17: controle negativo.

A tabela 3 indica os resultados da PCR confirmando que não foi verificada reatividade comparável aos padrões testados nas amostras.

Tabela 3- Perfis das reações de PCR das amostras estudadas em Serra dos Carajás.

| Amostra | Perfis dos Produtos Amplificados | | | | | | | | | | | |
|---------|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----------------|-----------------|-----------------|---|
| | Ls | Lg | Ln | Ll | La | Tr | Es | Cf | Tc ₁ | Tc ₂ | Tc ₃ | |
| 24013 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24014 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24015 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24016 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24019 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Ls: *Leishmania (Viannia) shawi*; Lg: *Leishmania (Viannia) guianensis*; Ln: *Leishmania (Viannia) naiffi*; Ll: *Leishmania (Viannia) lansonii*; La: *Leishmania amazonensis*; Tr: *Trypanosoma rangeli*; Es: *Endotrypanum shaudinni*; Cf: *Crithidia fasciculata*; Tc₁: *Trypanosoma cruzi* cepa 1; Tc₂: *Trypanosoma cruzi* cepa 2; Tc₃: *Trypanosoma cruzi* cepa 3.

Portanto, esses resultados demonstram que as amostras de Serra dos Carajás não apresentaram fragmentos moleculares de DNA compatível com os padrões testados.

7 DISCUSSÃO

O estudo da amplificação do DNA pela utilização dos iniciadores S1629 e S1630 como marcadores específicos para subgêneros *Leishmania* e *Viannia* já foram descrito em vários trabalhos com sucesso (KATAKURA et al, 1999; IKUTA and ISHIKAWA, 2003). Nossos resultados lograram êxito para os marcadores em questão haja vista nossas análises conseguirem distinguir o protozoário *Leishmania* em detrimento dos demais protozoários da família Tripanossomatidae.

7.1 REGIÃO DE BELTERRA EM SANTARÉM

As análises de PCR realizadas nas amostras isoladas do tubo intestinal de flebotomíneos capturados na região de Belterra em Santarém mostraram que quatro, 20906, 21902, 21903 e 22341, apresentaram reação positiva, amplificando fragmento de 250 pb de DNA do gene de miniexon, similar ao de *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

Os flebotomíneos que continham esses protozoários em conteúdo intestinal eram *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Psychodopygus wellcomei* ou *Psychodopygus complexus*, *Psychodopygus davisi* e *Lutzomyia withmani*, respectivamente. Esses insetos têm sido descritos como vetores de leishmaniose pertencentes à fauna amazônica há muitos anos (FRAHIA et al, 1978; LAINSON, 1981; SOUZA et al 1996; PESSOA et al, 2007).

A amostra 21902 confirmou a ocorrência de infecção por *Leishmania* do subgênero *Viannia* no flebotomíneo da espécie *Ps. wellcomei/complexus*. Registros de infecções por *Leishmania* nesses flebotomíneos também foram observados por WARD et al (1973), RYAN et al (1987) em Serra dos Carajás e SOUZA et al (1996) em Paragominas.

Esses dípteros apresentam características próprias, sendo altamente antropofílicas e promovendo hematofagia inclusive em horários diurnos (WARD *et al*, 1973; RYAN *et al*, 1987; READY *et al*, 1991; RANGEL & LAINSON, 2009). Por essa razão, essas espécies deverão ser monitoradas, a fim de que se verifique seu potencial como espécie vetora de leishmaniose em Belterra.

Em relação aos resultados observados na análise da amostra 20906 notou-se a presença de *Leishmania* do subgrupo *Viannia* no conteúdo intestinal do flebotomíneo *Ps. davisi*.

Segundo Gil (2003) esta espécie é altamente antropofílica e capaz de completar o ciclo biológico, sendo considerado um vetor com potencial zoonótico para leishmaniose tegumentar, apresentando destaque no quadro da epidemiologia da doença na região central de Rondônia.

Considerando os resultados analisados na amostra 21903, comprovou-se que também estava infectada por parasitos do gênero *Leishmania* subgênero *Viannia*. O flebotomíneo que albergava este parasita era o *Ps. hisurtus hisutus*.

Essa espécie é descrita apresentando menor frequência de infecção por *Leishmania*. Rangel e cols. (1985) em Além da Paraíba, Minas Gerais e Ryan e cols. (1987) em Serra dos Carajás, no Pará, também verificaram a ocorrência de infecção por *Leishmania* neste flebotomíneo.

Quanto à amostra 22341, constatou-se também ser *Leishmania* do subgênero *Viannia* albergada no flebotomíneo *Lu. whitmani*. Este flebotomíneo é um reconhecido agente transmissor de *Leishmania (V.) shawi* na Amazônia e já se discute a possibilidade de ser considerado vetor de outras espécies de *Leishmania* como a *L. (V.) braziliensis* em diversas

regiões. Em grande parte do Brasil *Lu. whitmani* tem sido considerado como um dos mais importantes vetores transmissores de LTA (RANGEL & LANSON, 2003; LOIOLA *et al*, 2007). Autores como Queiroz *et al* (1994) reconhecem essa espécie como transmissora de LTA em Baturité, Ceará. Tojal (2003) envolve este flebotomíneo no ciclo de transmissão da LTA a humanos no Acre, bem como Oliveira-Pereira e cols. (2006) também admitem essa espécie como possível vetora de LTA no município de Buriticupu, Maranhão. Carvalho e cols (2010) confirmam a participação dessa espécie na transmissão da *L. (V.) braziliensis* no Distrito Federal em Brasília além de Shimabukuro e cols. (2010) que afirmam ser essa espécie um importante vetor de leishmaniose em São Paulo.

Salienta-se ainda que este flebotomíneo é um vetor pouco antropofílico, e apresenta pouca tendência a invadir casas ou o habitat peridomiciliar (LAINSON *et al*, 1994; RANGEL *et al*, 1996). Em contraposição a esses achados na região sudeste se mostra antropofílico e em ambiente domiciliar (SOUZA *et al*, 2002). Diante desses contrastes foi sugerido que *Lu. whitmani* poderia ser um complexo de espécies crípticas ou ainda que esse flebotomíneo esteja apresentando tolerância elevada para drásticas mudanças ecológicas (COSTA *et al*, 2007).

Em relação à amostra não identificada, a 22340, podemos afirmar que não se trata de uma espécie do gênero *Leishmania*, pois não houve amplificação de DNA comparável com os padrões dos dois subgrupos, todavia para perfeita comprovação de que tripanossomatídeo se trata, seriam necessárias outras análises complementares.

Essa amostra é oriunda do flebotomíneo *Lutzomyia gomezi*, o qual se destaca que já houve registros de infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* na Venezuela (FELICIANGELI *et al*, 1994; RODRIGUEZ *et al*, 1999) e também no Brasil na região de Serra dos Carajás (SOUZA *et al*, 1996). É uma espécie altamente antropofílica, e tem sido considerada como

um dos vetores suspeitos de *L. panamensis* no Panamá (CHRISTENSEN *et al.*, 1983). Embora haja relatos de infecção por *Leishmania sp.* em espécies de *Lu. gomezi* no Pará e em outras regiões, não foram encontrados registros de infecção na região de Belterra em Santarém.

Assim sendo, as análises das amostras da região de Santarém demonstraram que os flebotomíneos que se encontravam infectados por protozoários do gênero *Leishmania* do subgênero *Viannia* já apresentavam registros de infecção por este flagelado em estudos anteriores demonstrando sua importância em várias regiões do país.

Em estudo realizado por Bacha (2009), detectou-se *Leishmania* do subgênero *Viannia* em lesões de 47 (51,8%) pacientes oriundos de Santarém e em 39 (42,3%) pacientes de outros municípios fora de Santarém. Esses dados reforçam a relevância de se manter um programa de vigilância entomológica nos flebotomíneos em Santarém, já que nossos resultados demonstraram a presença de *Leishmania* do subgênero *Viannia* nos dípteros estudados.

7.2 REGIÃO DE SERRA DOS CARAJÁS

Em relação às amostras de Serra dos Carajás, o estudo realizado pela PCR evidenciou que o protozoário contido no conteúdo intestinal dos flebotomíneos capturados não se trata de parasitas do gênero *Leishmania*, e para uma caracterização correta do flagelado isolado serão necessárias novas análises com diferentes métodos e marcadores.

Ressalta-se que os parasitas foram encontrados nos seguintes flebotomíneos: dois exemplares de *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, um exemplar de *Lutzomyia brachypyga*, um exemplar de *Lutzomyia richardwardi*, e um exemplar de *Lutzomyia umbratilis*. Dentre as espécies referidas somente a *Lu. umbratilis* é considerada vetor de alta antropofilia e que está diretamente relacionado à transmissão do *L. (V.) guyanensis* (RANGEL & LAINSON, 2003).

Considerando as amostras 24013 e 24014 observou-se que essas amostras foram isoladas do díptero *Ps. hirsutus hirsutus*. É importante frisar que esse flebotomíneo já apresentou relatos de infecção por *Leishmania sp.* em outros estudos (RANGEL et al, 1985; RYAN et al, 1987) e que apesar de não ter sido identificado parasitas desse gênero no nosso estudo, não está excluída sua relevância ecológica dentro da fauna Amazônica, e principalmente dentro da localidade de Serra dos Carajás.

Com relação aos resultados das amostras 24015 e 24016 percebeu-se que ambas apresentaram um perfil de fragmentos de DNA diferentes entre si e dos padrões testados. Essas amostras são oriundas dos flebotomíneos *L. brachypyga* e *L. richardwardi*, respectivamente. Esses flebotomíneos podem apresentar parasitos no interior do seu intestino, porém não possuem hábitos antropofílicos. Por isso, atuam como reservatório de protozoários não apresentando registros de transmissão ao homem até esta data (RANGEL & LAINSON, 2003). Deste modo, mesmo que o flebotomíneo não tenha caráter antropofílico, é interessante

fazer a monitorização desses dípteros em Serra dos Carajás, uma vez que podem servir como fonte *in vivo* de várias espécies de flagelados, podendo transmiti-las a outros vertebrados.

Observando-se o resultado da amostra 24019 verificou-se que o fragmento molecular amplificado não era compatível com os fragmentos moleculares de *Leishmania*, bem como também era diferente dos fragmentos amplificados pelos outros protozoários. Além disso, notou-se muita semelhança aos perfis das amostras 24013 e 24014, embora tenha sido isolada de um flebotomíneo diferente, o *Lu. umbratilis*.

De acordo com Lainson (2010) o principal vetor transmissor da leishmaniose ocasionada pela *Leishmania (Viannia) guyanensis* é o *Lu. umbratilis*. No entanto, só há registros da distribuição geográfica de *L.(V.) guyanensis* ao Norte do rio Amazonas e em países vizinhos da Guiana Francesa e Suriname. Apesar de ter sido encontrado este inseto em Serra dos Carajás, ainda não existe registros de infecção por protozoários da espécie *L. (V.) guyanensis* nessa região.

Outro dado fundamental a se mencionar é que a espécie *Lu. umbratilis* já foi descrita sendo parasitado por outra espécie da família *Trypanosomatidae* em trabalhos anteriores. De acordo com Ryan e cols (1987), flagelados não identificados possivelmente *Endotrypanum sp* foram encontrados parasitando este flebotomíneo em Serra dos Carajás no Pará. Rogers e cols. (1988) também encontraram resultados semelhantes quando detectaram uma espécie de flagelado não-*Leishmania* parasitando este díptero na cidade de Manaus, Amazonas.

Esses achados mostram que a espécie *Lu. umbratilis* é um flebotomíneo importante no cenário das infecções ocasionadas por tripanossomatídeos de gêneros diferentes do *Leishmania*. Por esta razão, torna-se interessante a caracterização desses flagelados para

maior entendimento do papel desse díptero em relação ao parasita e dentro do nicho ecológico em Serra dos Carajás.

Ao descrever esses exemplares da fauna flebotomínica em Serra dos Carajás, não se pode deixar de citar que essa região é reconhecida por sua intensa zona de impacto ambiental sofrida pela exploração desordenada de minério. Na década de oitenta, com a instauração do Programa Grande Carajás (PGC) houve políticas de incentivo a exploração mineral, fato que ocasionou uma exploração de minérios na Serra dos Carajás e apesar da mesma estar sendo feita em área delimitada e organizada pela Companhia Vale do Rio Doce, não houve como controlar a migração de pessoas de todas as regiões do país para exploração mineral, como consequência da não instauração de medidas ordenadas do controle populacional, essa área sofreu mudanças drásticas no ambiente natural que passou a ser devastado (KOHLHEPP, 2002). Isso refletiu também sobre a interação harmônica do ambiente silvestre, onde o homem passou a adentrar a mata para explorar o minério causando um desequilíbrio no ambiente natural.

Deste modo, ratifica-se que não foi possível caracterizar as amostras oriundas de Serra dos Carajás. Contudo, ressalta-se que o desafio para trabalhos futuros, será detectar que tipo de flagelados tripanossomatídeos estão albergados no tubo digestivo dos flebotomíneos capturados e se o mesmo é capaz de causar patogenicidade ao homem, além de averiguar a relação deste com o meio ambiente.

8 CONCLUSÃO

As amostras oriundas de Belterra isoladas dos flebotomíneos *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Psychodopygus welcomei* ou *Psychodopygus complexus*, *Psychodopygus davisi* e *Psychodopygus whitmani*, foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Leishmania*, subgênero *Viannia*.

A amostra oriunda de Belterra isolada do flebotomíneo *Psychodopygus gomezi*, não pertence ao gênero *Leishmania*.

As amostras oriundas de Serra dos Carajás isoladas dos flebotomíneos *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Lutzomyia brachypyga*, *Lutzomyia richardwardi*, *Lutzomyia umbratilis*, não foram caracterizadas, somente demonstraram não pertencer ao gênero *Leishmania*.

Para futuras análises, as amostras em questão não identificadas deverão ser testadas por outros iniciadores, inerentes a cada espécie tripanossomatídea que se deseje investigar pela técnica da PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sand flies. *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 17, pp 1-18, 2003.

ASHFORD, R. W. **Phlebotomus Fevers**. The encyclopedia of arthropod-transmitted infections. CABI- Publishing, Wallingford, U. K., pp 397- 401, 2001.

BACHA, H. E. **Identificação Molecular das espécies de *Leishmania* em lesões cutâneas de pacientes atendidos no Centro de Controle de Zoonoses, em Santarém, Pará**. 105 f. Tese (Doutorado em Doenças infecciosas e Parasitárias) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous Leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, vol. 25, pp. 203-211, 2007.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, vol.7 (3), pp 328-337, Setembro, 2004.

BASTIEN P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 96, pp 205-215, 2002.

BIRTLES, R. J. **Phlebotomus Fevers**. In: The encyclopedia of arthropod-transmitted infections. CABI- Publishing, Wallingford, U. K., pp 104-106, 2001.

BLESSMANN, J. *et al.* Realtime PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *Journal Clinic Microbiology*, vol. 40, pp 4413-4417, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª Edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª Edição, Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

_____. _____. _____. **Guia de Monitoramento e Vigilância da Leishmaniose Tegumentar no Brasil**. 2. ed. atual. Brasília, 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. Acesso em: 22.04.2009.

BRITO, M. E. F. *et al.* Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Tropical Medicine and International Health*, vol. 14 (10), pp 1278–1286, 2009.

CARVALHO, M. S. *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, vol.19 (3), pp. 227-237, 2010.

CASTRO, E. A. *et al.* Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, vol. 5 (5), pp 445-452, Setembro/Outubro 2002.

CAVALCANTI, M. P. *et al.* Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, vol. 37 (1), pp 1-14, 2008.

CHANG, K. P. *et al.* Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annual Review Microbiology**, vol. 44, pp 499-529, 1990.

CORRÊA, J. R. *et al.* Axenic Promastigote Forms of *Leishmania (Viannia) lainsoni* as an Alternative Source for *Leishmania* Antigen Production. **The Journal of Parasitology**, vol. 91 (3), pp 551-556, 2005.

COMER, J. A.; TESH, R. B. Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculovirus: a review. **Parassitologia**, vol. 33 (supplementary), pp 143-150, 1991.

COSTA, S. M. *et al.* *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l . (Antunes & Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol 102 (2), pp 149-153, 2007.

COSTA, T. L. *et al.* *Toxoplasma gondii*: toxoplasmose, com ênfase no diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, vol. 37 (3), pp 191-207, julho/setembro, 2008.

CHRISTENSEN, H. A. *et al.* The ecology of cutaneous leishmaniasis in the republic of Panamá. **Journal of Medical Entomology**, vol. 20 (5), pp 463-484, 1983.

CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. vol. (16) 4, pp 142-144, April, 2000.

CUPOLILLO, E. *et al.* A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 50 (3), pp 296-311, 1994.

DAVIES, C. R. *et al.* Leishmaniasis: new approaches to disease control. **British Medical Journal**, vol. 326 (7385), pp. 377-382, February, 2003.

DÁVILA, A. M. R.; LUKES, J. Towards a framework for the evolutionary genomics of Kinetoplastids: what kind of data and how much? **Kinetoplastid Biology and Disease**, vol. 2 (16), pp 1-3, 2003.

DEGRAVE, W. *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 89 (3), pp 463-469, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease**, vol. 27, pp. 305- 318, 2004.

DISCH, J. *et al.* Rapid clearance of circulating Leishmania kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. **Acta Tropical**, vol. 92 (3), pp 279-283, 2004.

EHRENFREUND-KLEINMAN, T. *et al.* The effect of Amphotericin B derivatives on *Leishmania* and immune functions. **The Journal of Parasitology**, vol. 91 (1), pp 158-163, 2005.

FELICIANGELI M. D. *et al.* Vectors of cutaneous leishmaniasis in North-central Venezuela. **Medicine Veterinary Entomology**, vol. 8, pp 317-324, 1994.

FERÁNDEZ-CUENCA, F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, vol. 22 (6), pp 355-360, 2004.

FERNANDES, A. P *et al.* Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 90 (15), pp 11608-11612, 1993.

FERNANDES O, DEGRAVE W, CAMPBELL D. A. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. **Parasitology**, vol. 107, pp 219-224, 1993.

FERNANDES, O.; MURTHY, V. K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W. M.; CAMPBELL, D. A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**. vol. 66, pp. 261-271, 1994.

FERREIRA, M. P. *et al.* Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of ant-*L. brasiliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Revista Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, vol. 48 (4), pp. 215-217, Julho/Agosto, 2006.

FRANCO, A. M. R. *et al.* Characterization of Endotrypanum Parasites Using Specific Monoclonal Antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 92 (1), pp 63-68, 1997.

FREITAS, J. M. *et al.* A Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International Journal Parasitology**, vol. 35, pp. 411-417, 2005.

GALATI, E. A. B *et al.* Ecological aspects of the phlebotomine fauna from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brasil. **Programme and Abstract of the 3rd International Symposium on phlebotomine sand flies**. Montpellier, pp. 36, 1999.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia. In: **Flebotomíneos do Brasil**, EF Rangel, R Lainson (eds.), Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 23-176, 2003.

GALATI, E. A. B *et al.* Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 104 (8), pp. 1148-1158, dezembro, 2009.

GIL, L. H. S *et al.* 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 Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 98 (6), pp. 751- 755, 2003.

GIL, E. S. *et al.* Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 29 (3), pp. 223-230, 2008.

GOMES, A. C. *et al.* Aspectos da Leishmaniose Tegumentar Americana. Fauna flebotomínica antropófila de matas residuais situadas na região Centro-Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, vol. 31 (01), pp. 32-39, 1989.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 36 (1), pp. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, vol. 7 (3), 2004.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic Leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, vol. 35, pp. 1169-1180, 2005.

GRIMALDI, G. JR. *et al.* A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 41, pp. 687-725, 1989.

GRIMALDI, G. JR. *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 44, pp. 645-661, 1991.

GREIG, S. R. *et al.* The feasibility of discrimination between *Leishmania* and *Endotrypanum* using total DNA probes. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 8, pp. 196-197, 1989.

GUIMARÃES, L. H. *et al.* Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, vol. 75 (1), pp. 66-74, 2005.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinic Microbiology Review**, vol. 14, pp. 229-243, 2001.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, vol. 354 (9185), pp. 1191-1199, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades**. [S.l.] Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 07 de abril de 2010.

IEC. Instituto Evandro Chagas. **Histórico**. Disponível em: <<http://www.iec.pa.gov.br/iechist.htm>>. Acesso em 07 de abril de 2010.

IKUTA, Y. M.; ISHIKAWA, E. A. Y. Avaliação isoenzimática e molecular de cepas de leishmania (*Viannia*) *lainsoni* / Isoenzymatic and molecular evaluation of leishmania (*Viannia*) *lainsoni* strains. **Revista Paraense de Medicina**, vol. 17 (3), pp 6-10, 2003.

JACINTO, A. I. *et al.* Aspectos físico-territoriais e atrações turísticas do município de Santarém, Pará. **Revista Coordenadas Turismo e Gerenciamento**, vol. 2 (2), pp. 1-11, 2007.

JUNIOR, M. S. C. L. *et al.* Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, vol. 42 (3), pp. 303-308, 2009.

KATAKURA, K. *et al.* Leishmania Mini-exon Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis in China and Ecuador. The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine, vol. 23 (6), pp. 393-399, 1999.

KATO, H. *et al.* Natural Infection of *Lutzomyia* *tortura* with *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* in an Amazonian Area of Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 79 (3), pp. 438-440, 2008.

KATO, H. *et al.* Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for leishmania infection by molecular biological methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 77 (2), pp. 324–329, 2007.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, vol. 4, pp. 1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK R. The Biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinic Dermatology**, vol. 17 (3), pp 279- 289, 1999.

KOHLHEPP, G. Conflitos de interesse no ordenamento territorial da Amazônia brasileira. **Estudos Avançados**, vol. 16 (45), 2002.

LAINSON, R. Epidemiologia e ecologia de leishmaniose tegumentar na Amazônia. **Hiléia Médica**, vol. 3 (1), pp 35-40, 1981.

LAINSON, R. *et al.* The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazônia. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 89, pp 435-443, 1994.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Evaluation, classification and geographical distribution.** In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, W. Peters and Killick- Kendrick. Vol. 1, London, Academic Press, pp. 1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **New World leishmaniasis – the neo-tropical *Leishmania* species.** In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Cox FEG, Kreier JP & Wakelin D (eds), 9th edn. London, Parasitology, Arnold, vol. 5, pp. 242–266, 1998.

LOIOLA, C. F. *et al.* Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of America cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 102 (5), pp. 581-585, 2007.

LOPES A. H. C. S. *et al.* Evolution of nuclear DNA and the occurrence of sequences related to new small chromosomal DNAs in the trypanosomatid genus *Endotrypanum*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, vol. 40, pp. 151-162, 1990.

MAGILL, A.J. Epidemiology of the leishmaniasis. **Dermatology Clinic**, vol. 13, pág. 505-523, 1995.

MARZOCHI M. C. A. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais.** São Paulo, EditORA Atheneu, p. 39-64, 1999.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G.A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 59, pp. 327–329, 1993.

MCGHEE, R. B.; COSGROVE, W. B. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. **Microbiology Reviews**, vol. 44, pp. 140-173, 1980.

MICHALSKY, E. M. *et al.* Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotomíneos experimentalmente infectados (diptera: psychodidae: phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 44, pp 255-259, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009.** SINAN/SVS/MS. Atualizado em 18/08/2010.

_____. **Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009.** SINAN/SVS/MS. Atualizado em 18/08/2010.

MIYAMOTO, C. T. *et al.* Reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 39 (4), pp. 275-278, 2007.

MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. The Biology of Trypanosoma and Leishmania: Parasites of Man and Domestic Animals (Taylor and Francis, London), pp. 197-210, 1983.

ODORIZZI, R. M. F. N.; GALATI, E. A. B. Flebotomíneos de várzea do rio Aguapeí, região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, vol. 41 (4), pp. 17-22, 2007.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M. Flebotomíneos díptera de mata de terra firme e de várzea, do município de Paragominas, estado do Pará, Brasil. **Acta Amazônica**, vol 31 (1), pp 145- 154, 2001.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. *et al.* Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por Leishmania sp na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 39 (6), pp 645-652, 2006.

OLIVEIRA, C. I. *et al.* Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of Leishmania in the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 37, pp 149-153, 2003.

PAIVA, B. R. *et al.* Padronização de condições para detecção de DNA de Leishmania spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol. 23 (1), pp 87-94, 2007.

PARÁ. Secretaria de Saúde. Departamento de Endemias da Secretaria de Saúde. Gerência Técnica de Leishmanioses. **Dados de Leishmaniose Tegumentar Americana de 2003 a 2008**. Belém, 2009.

PARÁ. Governo do Estado. **Portal do Governo do estado do Pará: Meio ambiente**. Disponível em: <http://www.pa.gov.br/o_para/meioambiente.asp>. Acesso em: 07 de abril de 2010.

PEDROSA, C. M. S.; ROCHA, E. M. M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 37(4), pp 300-304, 2004.

PINHEIRO, F. G. *et al.* Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em Lutzomyia umbratilis (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, vol. 38 (1), pp 165-172, 2008.

PODLIPAEV, S. A. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, vol. 31 (5-6), pp 647-651, 2001.

QUEIROZ, R. G., *et al.* Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in northeastern Brazil: incrimination of Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae) as a vector of Leishmania braziliensis in Baturité municipality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** vol. 50, pp 693-698, 1994.

RANGEL E. F.; LAINSON, R. Ecologia da leishmanioses. In: **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, Fiocruz, pp. 190-191, 2003.

RANGEL E. F.; LAINSON, R. Distribuição e hábitos. In: **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, Fiocruz, pp 240- 245, 2003.

RANGEL E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 104 (7), pp 937-954, 2009.

RANGEL E. F *et al.* Observation on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Além Paraíba, State of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 80, pp. 373- 374, 1985.

RANGEL, E.F. *et al.* Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) *sensu lato* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 91, pp 43-50, 1996.

RODRIGUEZ , N. *et al.* Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 93, pp .47- 49, 1999.

ROGERS, W. O. *et al.* Detection of leishmania within sand flies by kinetoplast DNA hybridization. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 39, pp 434- 439, 1988.

ROMÃO, P. R. T. *et al.* Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, vol. 3 (1), pp 01-10, 2007.

ROTUREAU, B.; GEGO, A.; CARME, B. Trypanosomatid protozoa: a simplified DNA isolation procedure. **Experimental Parasitology**, vol. 111 (3), pp 207-209, 2005.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan Ecoregion Complex. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 74 (1), pp. 81-96, 2006.

ROSELINO, A. M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, vol. 83 (3), pp 187-203, 2008.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the rôle of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 81(3), pp. 353-359, 1987.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning: A laboratory Manual** (Cold Spring Harbor Laboratory), New York, 1989.

SANGIONI, L. A. *et al.* Busca ativa de casos de leishmaniose cutânea em humanos e cães em área periférica do município de Campo Mourão - PR, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 37 (5), pp. 1492-1494, 2007.

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, vol. 7 (8), pp 641–651, 2002.

SHAW, J. J. Taxonomia do gênero *Leishmania* – conceito tradicionalista x conceito moderno. **Anais brasileiros de Dermatologia**, vol. 60 (2), pp. 67-72, 1985.

SHAW, J. J. *Endotrypanum*, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater? **Ciencia e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)**, vol. 44 (2/3), pp. 107-116, 1992.

SHERLOCK, I. A.; MAIA, H.; DIAS-LIMA, A. G. Resultados preliminares de um projeto sobre a ecologia dos flebotomíneos vetores de leishmaniose tegumentar no Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 29 (2), pp 207-214, 1996.

SHIMABUKURO, P. H. F. *et al.* Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors**, vol 3 (121), pp. 1-12, 2010.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 86 (1), pp. 127-130, 1991.

SILVEIRA, F. T. *et al.* An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi*. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**, vol. 9, pp. 43-50, 2002.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of american cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 102, pp. 1075-1080, 2008.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, vol. 31, pp. 1–9, 2009.

SIMPSON, A. G. B. *et al.* The evolutionary history of Kinetoplastids and their Kinetoplasts. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 19 (12), pp. 2071-2083, 2002.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a Review. **Anais da Academia Brasileira e Ciência**, Rio de Janeiro, vol.75 (3), pp. 301-330, Setembro, 2003.

SOUZA, A. A. A. *et al.* *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* o humans in Pará State, Brazil. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 90 (2), pp 112, 113, 1996.

SOUZA, N. A. *et al.* Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (diptera: psychodidae: phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 97 (6), pp. 759-765, 2002.

- SOUZA, A. A. A. *et al.* Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, vol. 1 (1), pp 45-51, 2010.
- STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 118 (4), pp. 1301–1310, 2008.
- TESH, R. B. The genus *Phlebovirus* and its vectors. **Annual Review of Entomology**, vol. 33, pp. 169-181, 1988.
- TOJAL, A. C. *et al.* A diversidade das espécies causadoras de leishmaniose cutânea em Rio Branco, Acre. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 36 (Supl. I), 2003.
- VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, vol. 80 (4) pp. 421- 428, 2005.
- VERMELHO, A. B. *et al.* Trypanosomatidae Peptidases: A Target for Drugs Development. **Current Enzyme Inhibition**, vol. 3, pp. 19-48, 2007.
- VICKERMAN, K. **In: Biology of the Kinetoplastida**, eds. Lumsden, 48. W. H. R. & Evans, D. A. (Academic, London), vol. 1, pp. 1-76, 1976.
- VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal for Parasitology**, vol. 24, pp. 1317–1331, 1994.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, vol. 18, pp. 124-193, 1966.
- WARD R.D.; SHAW J.J.; LAINSON R.; FRAIHA H. Leishmaniasis in Brazil. Observations on the phlebotomine fauna of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis, in the Serra dos Carajás, Pará State. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, vol. 67, pp 174-183, 1973.
- WHO – World Health Organization. Control of Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis>>. Acesso em 11 de agosto de 2009.
- WHO – World Health Organization. Control of Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resolutions/en>>. Acesso em 30 de setembro de 2011.
- YOUNG D. C.; DUNCAN N. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memory of the American Entomological Institute**, pp. 54, 881p. 1994.

APÊNDICE

I- Meio de cultura NNN modificado

4% de ágar base (Difco B45) diluído em água

12% de sangue de coelho desfibrinado

400 µg/ml gentamicina

II- Solução salina fosfatada e glicose - PSG

0.023M Na₂HPO₄

0.0012 M Na₂HPO₄

0.018M NaCl

0.0055M C₆H₁₂O₆

Solução Estoque

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Solução de uso para lavagem de parasitos

20 mL de PSG Estoque

Água bidestilada qsp 1000 mL

III- Tampão TBE

89 mM Tris-HCl

89 mM ácido bórico

2 mM EDTA