

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**

**MANOEL GUACELIS DE SENA DIAS JUNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ISOLADAS DE  
FLEBOTOMÍNEOS *SP.* DE TRÊS ECÓTOPOS DA SERRA DOS CARAJÁS,  
PARÁ, BRASIL.**

**BELÉM – PARÁ**

**2008**

**MANOEL GUACELIS DE SENA DIAS JUNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ISOLADAS DE  
FLEBOTOMÍNEOS *SP.* DE TRÊS ECÓTOPOS DA SERRA DOS CARAJÁS,  
PARÁ, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Doenças Tropicais, área de concentração “Patologia das Doenças Tropicais”.

Orientadora: Dra.Edna Aoba Yassui Ishikawa.

**BELÉM – PARÁ  
2008**

**MANOEL GUACELIS DE SENA DIAS JUNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ISOLADAS DE  
FLEBOTOMÍNEOS *SP.* DE TRÊS ECÓTOPOS DA SERRA DOS CARAJÁS,  
PARÁ, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Doenças Tropicais, área de concentração “Patologia das Doenças Tropicais”. Avaliada pelos seguintes membros da Banca Examinadora:

1 – \_\_\_\_\_

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Edna Aoba Yassui Ishikawa (Orientadora) - Universidade Federal do Pará

2 - \_\_\_\_\_

3 - \_\_\_\_\_

4 - \_\_\_\_\_

Belém, de de 2008

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais que ajudaram com seus ricos trabalhos e vastos conhecimentos. A vocês, obrigado.

Agradeço ao Instituto Evandro Chagas, em especial ao Dr. Adelson Alencar Almeida de Souza pelas amostras de flebotomíneos e oportunidades para a execução deste trabalho.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Entomologia do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, com seus conhecimentos, experiências, dedicação e competência nos trabalhos de campo, em especial aos senhores integrantes José Aprígio Lima, Iorlando Barata, Antônio Machado. A vocês um muito obrigado.

Agradeço a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Edna Aoba Yassui Ishikawa, que com dedicação, paciência e competência passa gradativamente o seu conhecimento durante esses anos de trabalho. A essa pessoa um grande e especial Obrigado.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Thiago Vasconcelos, Nádile Castro e Carla Gama, que faziam o trabalho do dia-a-dia ficarem bem mais tranquilos e prazerosos obrigados pessoal.

Agradeço à UFPa/CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de Mestrado.

Agradeço a Deus e aos meus familiares que não estão mais aqui em nosso plano para presenciar esse momento especial, principalmente ao meu Pai, mas que com certeza “olharam” e estiveram presentes nos principais momentos que passei.

Agradeço a toda a minha família que me deu força para concluir mais uma etapa da minha vida profissional, em especial às três pessoas mais importantes da minha vida, minha Mãe Maria Ney de Sena Bittencourt, minha Irmã Thalya Bittencourt Moraes e minha namorada Daniela do Socorro Barros Guimarães, que deram tudo de si para que eu estivesse vivendo toda essa magia. A vocês só tenho a dizer que AMO todas vocês.

Enfim, desejo que tudo de bom aconteça na vida e no caminho a ser percorrido por todas essas pessoas.

Deus abençoe a todos

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, sendo uma zoonose de alta frequência, endêmica na região Amazônica, transmitidas por flebotomíneos dos gêneros *Psychodopygus* e *Lutzomyia*. A Serra dos Carajás, situada no Sudeste do Pará, é amplamente explorada por empresas extrativistas e como resultado, concerniu-se que a LTA transformar-se-ia em um dos principais perigos de saúde para os trabalhadores, devido à prática de desmatamento e a construção de estradas de acesso e escoamento do minério. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos da região da Serra dos Carajás através da técnica PCR. As capturas de flebotomíneos foram realizadas em três diferentes ecótopos, Parque Zoobotânico de Quarentena, APA do Gelado e Tapirapé-Aquirí, com auxílio de armadilhas de luz tipo CDC e Shannon, durante o período noturno a partir do crepúsculo vespertino. Os flebotomíneos capturados foram identificados de acordo com Young & Duncan, 1994 e congelados em N<sub>2</sub>. Foram congelados 5.947 flebotomíneos, com 3.495 fêmeas, dentre estas, 550 espécimes foram testadas. Foi realizada as extrações de DNA das amostras utilizando-se SDS e KOAc e precipitação com etanol 96%. Foi realizada a PCR, amplificando-se a região do gene do mini-exon com os iniciadores S1629 (5'GGGAATTCAATAWAGTACAGAACTG3') e S1630 (5'GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA 3'). O DNA de *Leishmania* foi detectado em 36 (6,5%) flebotomíneos, sendo 34 do subgênero *Viannia* detectados em 30 *Psychodopygus wellcomei/complexus*, três *Lutzomyia whitmani* e um *Lutzomyia shawi*. Duas infecções por *Leishmania amazonensis* foram detectados em *Psychodopygus wellcomei/complexus*. Tapirapé – Aquirí, APA do Gelado e Parque Zoobotânico de Quarentena apresentaram altas taxas de infecção natural em flebotomíneos 6,54 %, 5,96 % e 7,92%, respectivamente. *Psychodopygus wellcomei/complexus* ainda apresenta destacado papel de vetor de *Leishmania* causadoras de LTA na região em questão. Estudos sobre o poder vetorial das espécies *Lu. whitmani* e *Lu. shawi* infectados naturalmente por *Leishmania* na Serra dos Carajás devem ser intensificados, verificando se essas espécies podem estar atuando no ciclo de transmissão da LTA na Serra dos Carajás. Estudos que melhor esclareçam a variação da prevalência de diferentes espécies de flebotomíneos e o conhecimento das taxas de infecção também devem ser intensificadas na região da Serra dos Carajás.

Palavras-chaves: flebotomíneos, *Leishmania*, Serra dos Carajás

## ABSTRACT

The American cutaneous leishmaniasis (LTA) is an infectious disease, with a high frequency of zoonosis, endemic in the Amazon region, transmitted by sand flies of genera *Psychodopygus* and *Lutzomyia*. Serra dos Carajás, located in southeastern Pará, is widely exploited by extractive companies and as a result, the LTA would be transformed into a major health problem to workers because of the practice of deforestation and construction of roads for drainage of the ore. The purpose of this study is to evaluate the natural infection in the sand fly by *Leishmania* in the Serra dos Carajás region through the PCR. Catches of sandflies were held in three different areas, Parque Zoobotânico de Quarentena, APA do Gelado and Tapirapé-Aquirí, with CDC-type of light traps and Shannon, during the night from the evening twilight. The sand flies captured were identified according to Young & Duncan, 1994, and frozen in N<sub>2</sub>. 5,947 sandflies were frozen, being 3,495 females and among these 550 specimens were tested. The extraction of DNA was performed using SDS and KOAc and it was precipitated with ethanol 96%. Subsequently, the PCR was performed by amplifying the mini-exon gene with the primers S1629 (5' GGGAATTCAATAWAGTACAGAACTG 3') and S1630 (5' GGGAAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA 3'). The DNA of *Leishmania* was detected in 36 (6,5%) sand flies, 34 of subgenus *Viannia* detected in 30 *Psychodopygus wellcomei/complexus*, three *Lutzomyia whitmani* and a *Lutzomyia shawi*. Two infections by *Leishmania amazonensis* was detected in *Psychodopygus wellcomei/complexus*. Tapirapé - Aquirí, APA do Gelado and Parque Zoobotânico de Quarentena showed high rates of natural infection in sand flies 6.54%, 5.96% and 7.92% respectively. *Ps. wellcomei/complexus* still presents as *Leishmania* vector that cause LTA. Studies on the power of vector species *Lu. whitmani* and *Lu. shawi* naturally infected by *Leishmania* in the Serra dos Carajás should be intensified, if these species may be acting in the cycle of transmission of LTA in Serra dos Carajás. Studies that best explain the variation of the prevalence of different sandflies species and knowledge of the rate of infections should be also intensified in Serra dos Carajás.

Key words: sandfly: sandflies, *Leishmania*, Serra dos Carajás

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE LEISHMANIOSES DO NOVO MUNDO.....	10
1.2.JUSTIFICATIVA .....	24
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>26</b>
3.1. TIPO DE ESTUDO .....	26
3.2. ÁREAS DE TRABALHO .....	26
3.3. COLETA DE AMOSTRAS .....	30
3.3.1. MÉTODOS DE COLETA .....	30
3.3.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	32
3.4. CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	33
3.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA .....	33
3.4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	34
3.4.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	35
3.4.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	36
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	36
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 – PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	38

4.2 – POR ECÓTOPO DE COLETA .....	39
4.3 – DE ACORDO COM AS EXCURSÕES ÀS REGIÕES DE COLETA .....	42
4.4 – POR ARMADILHAS DE COLETA .....	44
5 – DISCUSSÃO .....	47
6 – CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICES .....	71
ANEXO 1 .....	72

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose é uma doença infecciosa, de natureza parasitária, causada por diferentes espécies de protozoário do gênero *Leishmania* Ross, 1903, sendo estes parasitos obrigatórios de células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado (Alexander *et al.*, 1999), podendo acometer humanos e outros vertebrados. Esta doença pode exibir diferentes manifestações clínicas que dependem não somente da espécie responsável pela infecção, como também da resposta imune do indivíduo infectado.

Os protozoários responsáveis por esta doença são pertencentes à família Trypanosomatidae, que são capazes de produzir um amplo espectro de doenças em humanos, se manifestando desde formas assintomáticas a formas mais graves e desfigurantes de leishmaniose cutânea ou então como doença visceral, denominado calazar, doença essa potencialmente fatal em muitos dos seus casos quando não tratado adequadamente (Grimaldi & Tesh, 1993).

No Brasil, Lindenberg em 1909, confirmou pela primeira vez a doença no país, onde observou formas amastigotas do parasito em material obtido de lesões cutâneas em indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo. Porém, coube a Gaspar Vianna, em 1911, nomear o parasito como *Leishmania braziliensis*, esta espécie foi considerada até a década de 60 como a única responsável pelas leishmanioses cutâneas ocorridas no Brasil. No entanto, estudos epidemiológicos realizados pelo Instituto Evandro Chagas, Belém - Pará, indicaram outras espécies de *Leishmania* infectando o homem na Região Amazônica (Lainson *et al.*, 1994).

Esses protozoários são transmitidos aos hospedeiros mamíferos na região Amazônica, por insetos conhecidos como flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Psychodopygus* e *Lutzomyia*, dependendo da localização geográfica. A transmissão de *Leishmania* é efetuada por diferentes espécies de flebotomíneos hematófagos, e exclusivamente pela fêmea, pois os machos alimentam-se apenas de açúcar dos sucos vegetais (Rangel & Lainson, 2003).

O interesse científico pelos flebotomíneos começou a crescer quando algumas espécies foram apontadas como vetores de *Leishmania*. As informações sobre a sua sistemática e biologia foram sendo acumuladas durante o século XX, a começar pela primeira descrição da espécie no Brasil, por Lutz & Neiva (1912). Até 1940, apenas 33 espécies desses mosquitos haviam sido descritas nas Américas. Hoje, apenas na América Latina tem-se aproximadamente 400 espécies relatadas, das 800 descritas em todo o mundo (Sherlock, 2003).

Os flebotomíneos são os vetores de todas as espécies de *Leishmania*, recebendo diferentes denominações populares de acordo com sua ocorrência geográfica, como “tatuquira”, “mosquito palha”, “asa dura”, “cangalhinha”, “birigui”, “catuqui”, entre outras. Esses insetos são dípteros nematócera, corpo densamente revestido de cerdas e escamas que lhes conferem um aspecto piloso e com sua cabeça voltada para baixo do tórax (giboso). Suas asas estreitas, lanceoladas, não justapostas, de venação com nervuras longitudinais dão um aspecto característico desses insetos, junto com suas asas eretas durante o pouso (Figura 1). Pertencente a família *Psychodidae*, sendo a única com fêmeas de hábito hematofágico e conseqüentemente potencial vetora de agentes patogênicos para o homem e animais (Silveira *et al.*, 1997).

Estes insetos têm preferência por viver em locais com muita umidade, devido ao seu pequeno tamanho e sua fina cutícula, normalmente são encontrados em ambientes

protegidos como buracos no solo, grutas de animais e ocos de árvores. Sua atividade se dá em geral no crepúsculo noturno, mas em alguns locais associados com extensa cobertura florestal, podem ocorrer os ataques durante as horas do dia, hábitos dioturnos, principalmente próximas às raízes de sapopemas e bases de árvores de grande porte (Castellon *et al.*, 1995).

A importância médico-sanitária dos flebotomíneos não se restringe apenas à transmissão de leishmânias para homens e animais, através de suas picadas dolorosas e causadoras de reações alérgicas. Podem também transmitir outros tripanossomídeos (especialmente os que estão associados com hospedeiros vertebrados), arboviroses, com sintomatologia semelhante ao da influenza, e bactérias do gênero *Bartonella*, causadora da Bartonelose, cuja taxa de mortalidade chega a 90% (Gray, 1990).



Fonte: Fotos cedidas por Dr. Adelson de Souza – IEC/SVS.

**Figura 1:** Flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*: Fêmea (à esquerda) e Macho (à direita).

Os flebotomíneos encontrados no Velho Mundo pertencem a nove gêneros distintos: *Australophelebotomus*, *Chinius*, *Grassomyia*, *Idiophelebotomus*, *Parvidens*, *Phlebotomus*, *Sargentomyia*, *Spelaemyia* e *Spelaephebotomus*. Apresentando apenas o gênero *Phlebotomus* como uma espécie transmissora de *Leishmania*. No Novo Mundo, as

espécies encontradas pertencem a quatro gêneros distintos: *Brumptomyia*, *Lutzomyia*, *Warileyia* e *Psychodopygus* (Lainson & Shaw, 1987; Williams, 2003).

No Brasil, tem-se conhecimento até o momento, de 229 espécies de flebotomíneos ocupantes de nossa região, das 800 espécies distribuídas pelo mundo, representando 28,6% do total e 47,7% das que ocorrem na região neotropical. Destas, 19 são incriminadas pela veiculação de leishmânias ao homem e animais (Aguilar & Medeiros, 2003).

A relação parasita-vetor para a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) vem se caracterizando da seguinte forma: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, apresentando distribuição em todo o território nacional, tendo como vetor na Serra dos Carajás, o *Psychodopygus wellcomei* além de outros em diferentes regiões como, o *Lutzomyia whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia*, *Lu. carrerai*; *L.(V.) guyanensis*, distribuída ao norte do rio Amazonas no Brasil transmitida pelos vetores *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani*; *L. (V.) lainsoni*, distribui-se pela região Amazônica, sendo descrita até então no Pará, e como único vetor conhecido a *Lu. ubiquitalis*; *L.(V.) naiffi*, sendo transmitido provavelmente por 3 espécies de flebotomíneos – *Ps. paraensis*, *Ps. ayrozai*, *Ps. squamiventris*; *L. (V.) shawi*, encontrada no Estado do Pará e Maranhão, sendo o vetor uma espécie do complexo *Lu. Whitmani*, *L. (V.) lindenbergi* encontrada na região metropolitana de Belém, ainda não se sabe muita coisa sobre seus reservatórios e vetores naturais e *L. (L.) amazonensis*, apresentando-se distribuída no Brasil, tem como principal vetor o *Lutzomyia flaviscutellata*. (Lainson & Shaw, 1992; Silveira *et al.*, 2002).

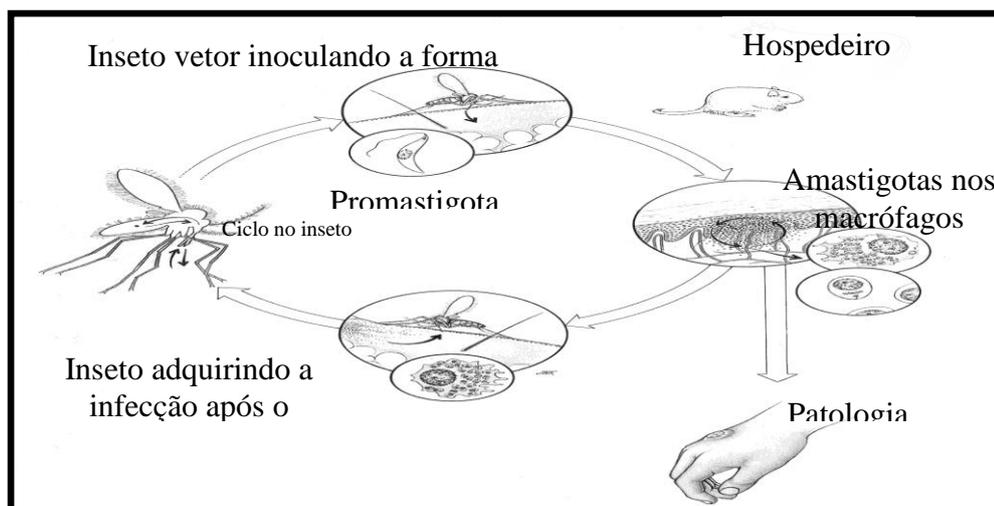
Biologicamente, essas leishmanias que infectam o homem e outros animais são protozoários digenéticos por apresentarem dois hospedeiros no seu ciclo biológico, um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. As formas promastigotas e amastigotas podem ser encontradas no interior do trato digestivo do inseto vetor. As formas amastigotas são encontradas no interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Ashford & Bates, 1997).

O ciclo de vida do protozoário é intracelular, se multiplicam dentro de células do sistema mononuclear fagocitário, em especial aos macrófagos. Morfologicamente estas formas evolutivas podem revelar diferenças de acordo com a espécie de *Leishmania*, sendo estas diferenças sutis ou discrepantes (Lainson, 1997).

A fêmea do flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere as formas amastigotas presentes no interior dos macrófagos, que são rapidamente conduzidos ao seu intestino médio. Neste local, os protozoários transformam-se em promastigotas, que posteriormente migram para a probóscita do inseto, sendo agora aptos para a transmissão dos protozoários. Esta forma é a observada na cultura *in vitro* (Lainson & Shaw, 1987).

No hospedeiro vertebrado, após a inoculação das formas promastigotas, ocorre a transformação dessas para amastigotas. Quando repleto de amastigotas, o macrófago se rompe, libertando-as na circulação, resultando na infecção de novos macrófagos, localizados na pele, sangue e/ou alguns órgãos internos dos vertebrados, tornado-se uma fonte de infecção para um novo flebotomíneo (Pimenta *et al.*, 1992; Alexander & Russel, 1992).

Na invasão dos protozoários no homem, a interação entre o parasito e as células hospedeiras, pode resultar em uma intensa reação imunológica. Apesar dos inúmeros estudos imunológicos realizados nos últimos anos, os mecanismos envolvidos na resposta imune de portadores da leishmaniose tegumentar americana não estão claramente elucidados. Admite-se que o sistema imunológico seja capaz de apresentar uma resposta celular e humoral contra a infecção leishmaniótica, contudo, uma variação no padrão desta resposta é constatada nas diferentes formas clínicas (Awasthi *et al.*, 2004).



Fonte: <[http://www.scielo.br/sciolo.phd?script=sci\\_arttext&pid=s0074-](http://www.scielo.br/sciolo.phd?script=sci_arttext&pid=s0074-)

**Figura 2:** Desenho esquemático do ciclo evolutivo da LTA

A LTA imunologicamente é caracterizada por uma forte resposta imunológica do Tipo I, estando localizada no período intermediário do espectro da doença. A Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM) está localizada no pólo de resistência da doença, havendo participação efetiva da resposta imune, de forma mais intensa, sendo esta a principal causa das lesões que levam a destruição tecidual da mucosa atingida. Já a Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa (LCAD) está localizada no pólo anérgico da doença, onde a atividade celular dos linfócitos T e macrófagos é insuficiente para conter a infecção, ocorrendo proliferação maciça do parasito (Carvalho *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de uma resposta imune protetora efetiva no combate ao parasita depende da produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T citotóxicos (Tc 1), cuja principal função é ativar os macrófagos infectados para eliminar os parasitas via Óxido Nítrico. Além disso, foi demonstrado ainda que a cura da LTA depende da geração de linfócitos T helper tipo 1 (Th 1). Tanto os Tc 1 como os Th 1 são induzidos por citocinas: IL-12, IL-27, IL-23, IL-1, TNF- $\alpha$ . Portanto, o alvo do sistema imune do hospedeiro infectado é desenvolver uma imunidade antígeno-específica célula T (Tc 1/Th 1) dependente (Convit *et al.*, 1993).

A resposta humoral está normalmente presente em todas as manifestações clínicas da LTA. Os níveis de anticorpos observados nos casos de leishmaniose difusa são elevados, no entanto, nos casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea, os níveis de anticorpos são baixos ou discretamente aumentados. A diversidade nas manifestações clínicas está na dependência de fatores como competência imunológica do homem, assim como o estado nutricional do indivíduo, e também, aos aspectos genéticos do hospedeiro (Barral – Netto *et al.*, 1986; Grimaldi & Tesh, 1993).

Em virtude desses fatores, a doença apresenta um comportamento espectral, caracterizada por um pólo de hiperreatividade celular, uma forma intermediária e outro pólo de hiporeatividade (Convit *et al.*, 1993).

Clinicamente, a LTA é uma doença capaz de produzir uma variedade de formas clínicas em humanos, no Brasil temos a leishmaniose cutânea localizada (LCL) acometida por diversas espécies de *Leishmania*, a leishmaniose mucocutânea (LMC) associada principalmente à *Leishmania (V.) braziliensis*, a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) associada à *Leishmania (L.) amazonensis*, e a leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) associada às duas espécies mencionadas (Silveira *et al.*, 2004) (Figura 3).

A interação entre o parasito e células hospedeiras, resultam inicialmente em uma pápula no local da picada do inseto após o período de incubação, em média de 1 a 3 meses, evoluindo geralmente para a “úlceras leishmanióticas”, a forma clássica de leishmaniose cutânea localizada, e a mais comum da doença. A qual se caracteriza por ser indolor, quando não há a presença de infecção secundária, apresentando bordas elevadas ou em moldura. Também podem manifestar-se como placas verrucosas, nodulares – infiltrativas, classificadas como LCAD, um tipo de manifestação mais raro que, além de produzir lesões multilantes extensas nos pacientes, se mostra resistentes a todos os tipos de terapia conhecidos até então (Silveira *et al.*, 1991).

A forma mucosa, secundária a cutânea, caracteriza-se por infiltração, ulceração e destruição dos tecidos mucosos dos pacientes, como os da cavidade nasal, faringe e laringe. Na LTA não há o comprometimento de órgãos internos (Lainson & Shaw, 1997).

A outra forma de leishmaniose ainda mais grave do que a LTA e muito freqüente no Brasil, que acomete alguns órgãos internos de mamíferos é a leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar americano (Figura 4), sendo uma doença de evolução crônica causada pela *Leishmania (L.) chagasi*. A infecção leva a um quadro clínico caracterizado por febre irregular prolongada, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, perda de peso, desnutrição e imunossupressão, frequentemente levando o paciente a óbito se não submetido a tratamento específico (Silveira *et al.*, 1997).

São observados casos de leishmaniose visceral que ocorrem de forma assintomática e subclínica. As pessoas mais atingidas são as crianças, e na sua maioria é representado pela população de baixa renda que não possui acesso ao diagnóstico e tratamento. A prevalência dessa doença parece estar aumentando em áreas suburbanas, onde o cão doméstico é considerado o principal reservatório de infecção para o homem (Peter, 2000).

Na tentativa de controle da doença, tem sido ainda fundamentada no binômio diagnóstico precoce e tratamento adequado, destacando-se o antimonial pentavalente N-metil glucamina como medicamento de primeira escolha recomendado pela OMS, na dose de 10-20 mg/Kg/dia, por via intramuscular ou endovenosa durante 20 a 30 dias. Drogas alternativas como estibogluconato, pentamidina e anfotericina B podem ser utilizadas nos casos não responsivos à terapia convencional (Ministério da Saúde, 2000).

Em contrapartida, como um provável agravante na evolução das leishmanioses está a progressiva dispersão do HIV das áreas urbanas para as rurais, a co-infecção por *Leishmania* e HIV aparece como ameaça de um crescente problema de difícil futuro. (Rangel & Lainson, 2003).



Figura 2 a (LCL)



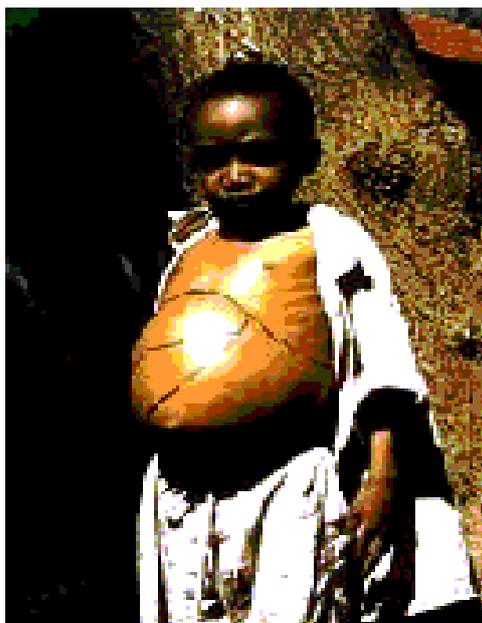
Figura 2 b (LCAD)



Figura 2 c (LCM)

Fonte: Figuras 2a e 2b cedidas por Dr. Fernando Silveira – Instituto Evandro Chagas, Programa de Leishmaniose. Figura 2c (<http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.theses.ulaval.ca>).

**Figura 3:** Formas clínicas de LTA. Figura 2a: leishmaniose cutânea localizada (LCL); Figura 2b: leishmaniose cutânea anérgica difusa; Figura 2c: leishmaniose mucocutânea.



Fonte: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.theses.ulaval.ca>

**Figura 4:** Caso de Leishmaniose Visceral humana.

Além das espécies causadoras de LTA, outras espécies de *Leishmania* neotropicais que não são encontradas infectando o homem, até o momento, deve-se possivelmente a incapacidade do parasita de sobreviver em tecido humano ou mais provavelmente porque seu inseto vetor ainda não foi encontrado fazendo o repasto sanguíneo no homem, como exemplo a *L. utinguensis* (Lainson & Shaw, 1997).

Atualmente na Região Amazônica são conhecidas 7 espécies de *Leishmania* causadoras de LTA humana, sendo estas: *Leishmania (V.) brasiliensis* Vianna, 1911, *Leishmania (V.) guyanensis* Floch, 1954, *Leishmania (V.) lainsoni* Silveira *et al.*, 1987, *Leishmania (V.) naiffi* Lainson & Shaw, 1989, *Leishmania (V.) shawi* Lainson *et al.*, 1989, *Leishmania (V.) lindenbergi* Silveira *et al.*, 2002 e *Leishmania (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 (Silveira *et al.*, 2002).

De acordo com a informação estatística mundial, estima-se uma prevalência de aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas, e um índice global de 350 milhões de pessoas no mundo que correm o risco de adquirir alguma forma de leishmaniose. Com isso, pela gravidade e recrudescimento da doença, a OMS incluiu-a no grupo das seis zoonoses infecto-parasitárias da UNDP/World Bank/WHO para investigação em doenças tropicais, ocupando o segundo lugar em importância entre as infecções por protozoários que acometem o homem (WHO, 1990).

Essa protozoose tem uma grande distribuição geográfica, tanto no Velho como no Novo Mundo, ocorrendo em países de climas tropical e subtropical, sendo o foco sul-americano da doença o de maior importância (Gontijo & Carvalho, 2003), embora não haja relatos na Austrália e parte do continente asiático (Figura 5).

No continente americano, as regiões endêmicas cobrem uma vasta área do continente, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, abrangendo pelo menos 24 países, no qual o Brasil constitui um dos focos mais importantes

dessa protozoose, sendo o principal foco de leishmaniose visceral, responsável por cerca de 90% dos casos registrados (Desjeux, 1992).



Fonte: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0074-02761999000300014&Ing=em&nrm](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0074-02761999000300014&Ing=em&nrm)>

**Figura 5** - Distribuição geográfica mundial da leishmaniose

A dermatose tem sido assinalada em todas as regiões brasileiras com distribuição do número de casos de caráter ascendente, onde se observa que a notificação eleva-se nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte. É exatamente nesta última onde também ocorre uma crescente expressão da doença, acometendo indivíduos de ambos os sexos e diferentes faixas etárias. Na última década, o registro de casos confirmados tem variado entre 30 e 40 mil por ano no Brasil (Ministério da Saúde do Brasil, 2004).

Dados do Ministério da Saúde indicam o crescimento contínuo da doença no Brasil, onde no período de 1980 a 2004 foram detectados coeficientes que oscilaram entre 3,8 a 22,9 casos por cada 100.000 habitantes, com a região Norte apresentado coeficiente mais elevado. Dados de 2004 mostram que só no Estado do Pará ocorreram 5.385 casos notificados e confirmados da doença (Ministério da Saúde, 2006).

Em referência ao Estado do Pará, de acordo com o boletim estatístico do Sistema de Vigilância em Saúde (SVS) (2005), foram registrados em 2003, a incidência de LTA foi de 83 casos/100 mil habitantes, o maior registros de casos da doença no país (5.479). Quanto à Leishmaniose Visceral, foram confirmados 226 casos, com 5 óbitos e uma incidência de 3,4 casos/100mil habitantes. Aproximadamente 50% dos casos foram registrados nos municípios de Cametá, Tomé-Açú, Santarém e Mojú (Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, 2005).

O gênero *Leishmania* certamente contém um grande número de espécies as quais precisam ser identificadas, determinando sua distribuição geográfica e seus mecanismos de transmissão no Novo Mundo. Entretanto, é importante ressaltar a diversidade de seus agentes, reservatórios, vetores e de situações epidemiológicas. Por outro lado, deve-se considerar que as informações sobre a espécie do parasita envolvido em um caso humano pode dar subsídios ao prognóstico e à terapêutica adequada aos pacientes considerando que algumas espécies são responsáveis por determinadas formas graves da doença (Grimaldi *et al.*, 1987).

Identificar e classificar as espécies de *Leishmania* constitui, sem dúvida, uma tarefa importante visto que a identificação do parasito não representa o fim, mas o meio para os estudos epidemiológicos das leishmanioses. Inicialmente, as investigações sobre as espécies eram fundamentadas basicamente na caracterização extrínseca, em observações clínicas, epidemiológicas e biológicas associadas às regiões geográficas, posteriormente, os critérios tornaram-se mais consistentes com a introdução de métodos laboratoriais representando importantes ferramentas para a caracterização intrínseca dos protozoários permitindo, assim, a identificação das leishmânias em nível específico. Entre os métodos, destacam-se a imunofluorescência indireta com o uso de anticorpos monoclonais específicos, como também à mobilidade eletroforética de isoenzimas (Lainson & Shaw, 1987).

Métodos imunológicos, como os anticorpos monoclonais, são amplamente utilizados em estudos epidemiológicos e taxonômicos, permitindo em grande parte, a

identificação de *Leishmania* em nível de espécie (MacMahon-Pratt & David, 1981), apresentando resultados rápidos e sensíveis para as amostras em estudo (Shaw *et al.*, 1989; Shaw, 1994).

A técnica dos anticorpos monoclonais foi introduzida por Kohler & Milstein em 1975 para ser utilizada na identificação específica de *Leishmania*. A importância desses anticorpos foi sendo gradativamente reconhecida por pesquisadores que estenderam seus estudos aplicando os monoclonais para a identificação entre membros do gênero *Leishmania*. No estudo realizado por McMahon-Pratt e colaboradores, 1984, os autores confirmaram relatos prévios sobre a aplicabilidade dos anticorpos monoclonais no diagnóstico, estudos epidemiológicos e classificação das espécies de *Leishmania*.

Outra ferramenta importante para a determinação das espécies está representada pela eletroforese de isoenzimas, sendo uma técnica analítica à disposição da investigação bioquímica. É um método que requer grande quantidade do parasito cultivado e as vantagens desse sistema se resumem no alto grau de definição analítica das frações separadas e na reprodutibilidade dos resultados (Kreutzer *et al.*, 1983).

Técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas como alternativa para a detecção e identificação de parasitas em amostras clínicas, com o objetivo de aperfeiçoar estudos e diagnósticos das doenças, apresentando alta sensibilidade, podendo ser realizada a partir de diferentes materiais, tais como, cultura, biópsia, escarificação, sangue, vetores, entre outros. Métodos moleculares permitiram o desenvolvimento de testes de identificação de *Leishmania* ainda mais sensível que os classicamente utilizados, através de seqüências de DNA do núcleo e do cinetoplasto (kDNA) dos parasitas. Seqüências de kDNA de *Leishmania* têm sido utilizados na tentativa de estabelecer ferramentas úteis à identificação e diagnóstico desses organismos, gene presente em abundancia no parasita, aproximadamente 10.000 círculos por parasita (Barker *et al.*, 1991).

O gene do minixon de protozoários kinetoplastida vem sendo descritos na literatura como um bom alvo para testes de detecção e identificação que utilizem PCR (Fernandes *et al.*, 1994), devido ser uma sequência conservada e que este gene é ausente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (Marfut *et al.*, 2003). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método altamente sensível capaz de ter acesso para a detecção e caracterização desses protozoários, tanto de organismos cultivados *in vivo* ou *in vitro*, como daqueles isolados diretamente do hospedeiro (Barker *et al.*, 1991; Smyth *et al.*, 1992).

Santamaría e colaboradores em 2005 realizaram um estudo sobre a validação da PCR na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.* em *Lutzomyia*, demonstrando a sensibilidade e especificidade da técnica, recomendando o seu uso na determinação de infecções naturais em populações silvestres de flebotomíneos infectados por *Leishmania*.

## 1.2. JUSTIFICATIVA

O controle das leishmanioses em áreas endêmicas requer o conhecimento da ecologia e epidemiologia das espécies de *Leishmania* presentes na região. E o maior problema para os epidemiologistas está na identificação dos reservatórios selvagens e na detecção dos seus prováveis vetores. A procura de infecções naturais em flebotomíneos é dessa forma essencial nos estudos das espécies vetoras de *Leishmania* e nos casos de infecções leishmanióticas em áreas endêmicas. A sabedoria da prevalência de *Leishmania* e a fauna de flebotomíneos nessas regiões, são de extrema importância para a detecção e determinação dos riscos e expansão da doença na área em estudo.

Nas décadas de 60 e 70, Lainson e colaboradores em estudos realizados sobre flebotomíneos presentes na Região da Serra dos Carajás, revelou a sua fauna e caracterizou a relação parasita-vetor para *Leishmania (V.) brasiliensis* e o *Psychodopygus wellcomei*, fornecendo assim um conhecimento prévio dos vetores da LTA na região. No entanto, se passado mais de 30 anos desde o estudo de Lainson, faz-se necessário a realização de um novo levantamento e atualização da fauna desses flebotomíneos circulantes nessa região, observando as espécies de flebotomíneos com as espécies de *Leishmania* presentes nesse vetor e os dados obtidos no presente estudo com aqueles já conhecidos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos da região da Serra dos Carajás, através de técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detecção da infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania*.
- Caracterização das espécies através do PCR utilizando diferentes marcadores moleculares.
- Correlacionar espécie *Leishmania*-flebotomíneo vetores de leishmanioses na referida região.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. TIPO DE ESTUDO

O tipo de estudo empregado neste trabalho é transversal ou seccional.

#### 3.2. ÁREAS DE TRABALHO

- Serra dos Carajás

A Serra dos Carajás, província mineral situada no Mesorregião Sudeste do Pará, município de Parauapebas (Figura 6), abundante em minérios de ferro, manganês, cobre, ouro, níquel e outros, que são amplamente explorados pelas empresas de mineração e como resultado, pequenos campos de mineração foram estabelecidos nessa região, onde a partir daí concerniu-se que as leishmanioses cutâneas (localizada e mucosa) entre outras doenças se transformariam provavelmente em um dos principais perigos de saúde para os trabalhadores, especialmente devido à prática de desmatamento e a construção de novas estradas e rodovias de acesso e escoamento do minério (Lainson & Rangel, 2005).

Localizada a 800-900 m acima do nível do mar, com grande domínio vegetal da floresta de terra firme, a qual sofre alterações tipológicas, de acordo com as variações de solo e relevo.

O seu clima insere-se na categoria de equatorial superúmido, possui temperaturas médias anuais de 26,35 °C, apresentando a média máxima em torno de 32,01 °C e mínima de 22,7 °C. A umidade relativa é elevada, apresentando oscilações entre a estação mais chuvosa e a mais seca, que vai de 100 a 52%, sendo a média real de 78%. O período chuvoso ocorre, notadamente, de novembro a maio, e o mais seco, de junho a outubro, estando o índice pluviométrico anual em torno de 2.000 mm (Governo do Pará – <http://www.pa.gov.br/conhecaopara/parauapebas1.asp>).

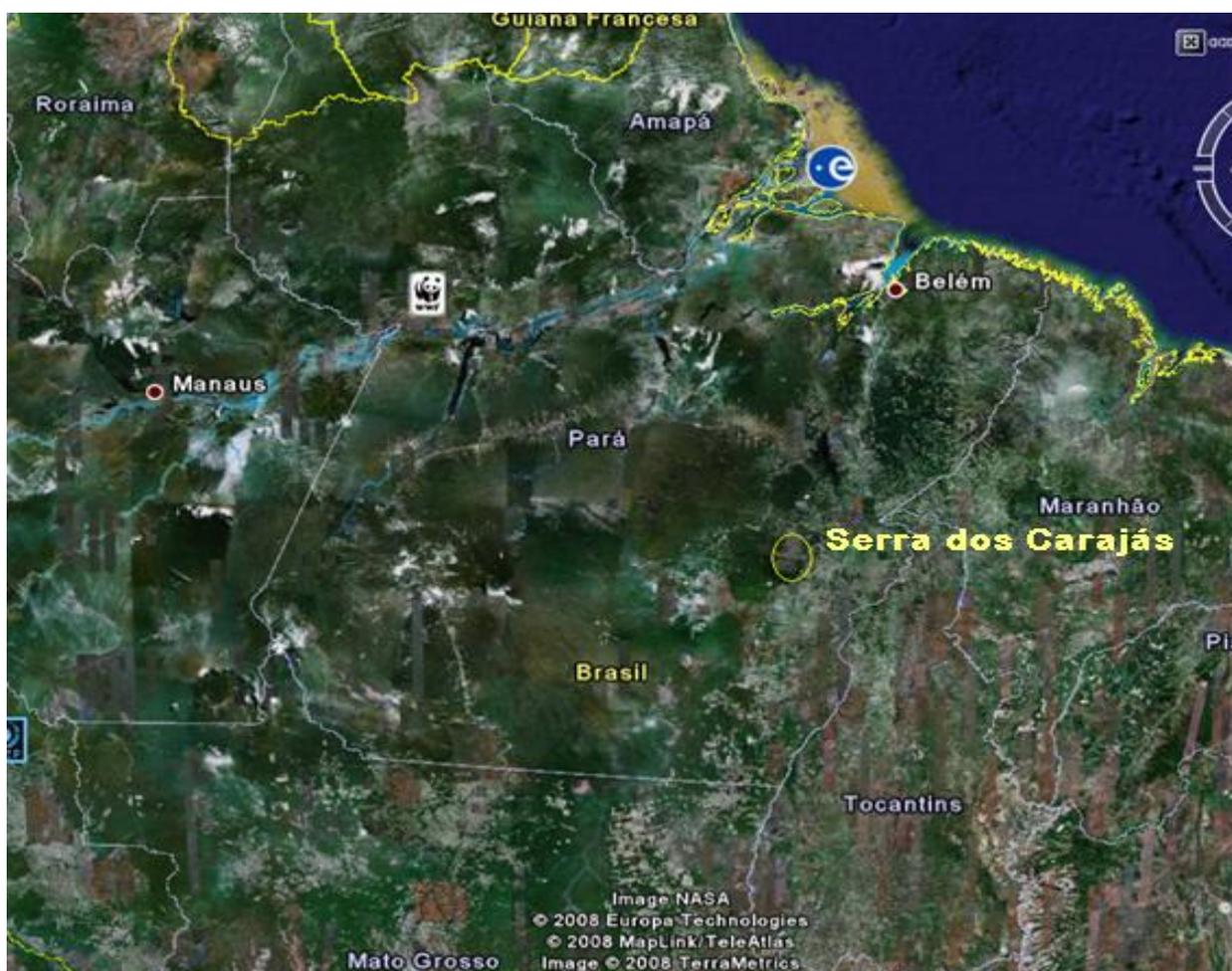


Figura 6: Mapa do Estado do Pará, destacando a região da Serra dos Carajás.

- Locais de Captura:

A captura dos flebotomíneos foi realizada em platôs da Serra dos Carajás por equipes constituídas de membros da entomologia do Programa de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas – SVS (IEC/SVS), Belém – Pará.

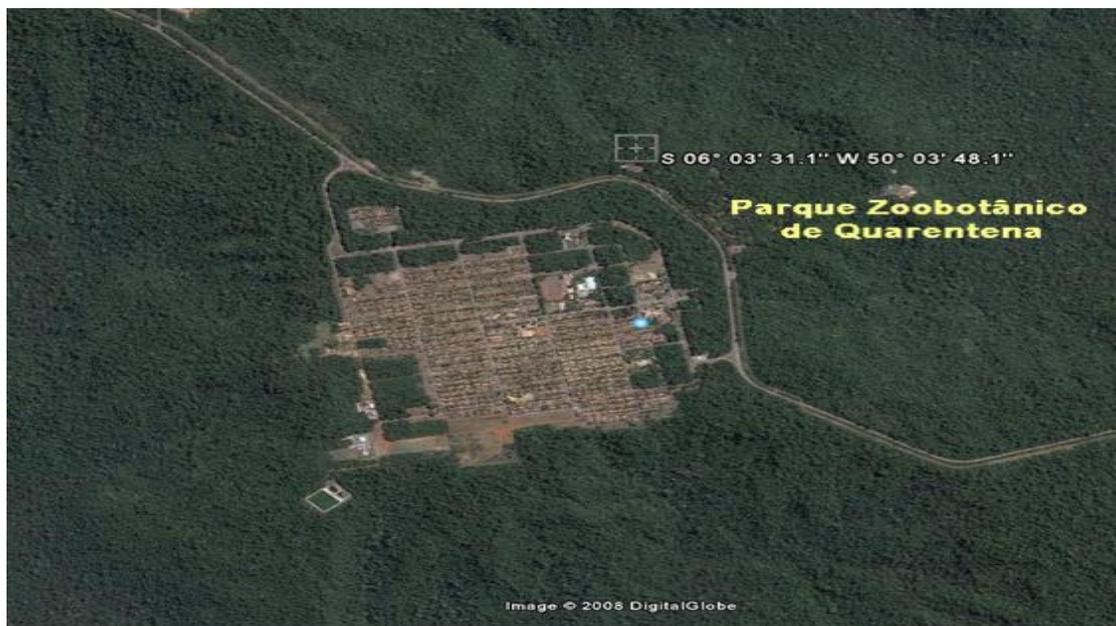
As capturas eram realizadas em três diferentes ecótopos, o primeiro constituindo uma área de quarentena, denominada Parque Zoobotânico de Quarentena de Carajás, rica em árvores, principalmente às das famílias Leguminaceae, Sapotaceae e Lecythidaceae, caracterizando uma área de perigo a população local devido estar localizada no núcleo urbano de Carajás, sendo esta indicada para o estudo pela empresa Vale do Rio Doce (Projeto SALOBO), com sua localização S 06° 03' 31.1''; W 50° 03' 48.1'' (Figura 7a).

A segunda área de coleta de material é uma região de proteção ambiental, a APA do Gelado (Área de Proteção Ambiental do Gelado), S 05° 56' 02.7''; W 50° 12' 25.6'', formada basicamente por mata secundária e propriedades particulares como sítios, fazendas, entre outras (Figura 7b).

A terceira região de trabalho consiste em uma floresta primária, situada na reserva indígena Tapirapé – Aquirí próxima ao acampamento do projeto Salobo, com coordenadas S 05° 46' 42.2''; W 50° 32' 46.9'' (Figura 7c).

Figura 7: Locais de captura de flebotomíneos na Serra dos Carajás, Pará, Brasil. 7a) Parque Zoobotânico de Quarentena. 7b) Área de Proteção Ambiental (APA) do Gelado. 7c) Tapirapé-Aquirí.

7a)



(Fonte: Google Earth)

7b)



(Fonte: Google Earth)

7c)



(Fonte: Google Earth)

### 3.3. COLETA DE AMOSTRAS

#### 3.3.1. MÉTODOS DE COLETA

De acordo com a rotina aplicada pela equipe de entomologia do IEC/SVS, os flebotomíneos foram capturados com coleta diária nos três ecótopos na região das Serras dos Carajás nos meses de dezembro de 2005 (1ª excursão), março (2ª excursão) e junho de 2006 (3ª excursão), fevereiro (4ª excursão), abril (5ª excursão), junho de 2007 (6ª excursão) e abril de 2008 (7ª Excursão), com o auxílio de armadilhas de luz tipo CDC e Shannon, durante o período noturno a partir do crepúsculo vespertino.

a) Capturas com armadilhas luminosas tipo CDC:

Armadilha luminosa tipo CDC é uma das técnicas mais empregadas nas capturas de flebotomíneos, apresentando o corpo constituído de acrílico com uma pequena fonte luminosa, sendo que os insetos são atraídos pela fonte luminosa e posteriormente capturados em uma gaiola acoplada na armadilha.

As coletas foram realizadas diariamente durante 12 horas consecutivas, se estendendo entre as 18:00 e 06:00 horas do dia seguinte. 10 armadilhas CDC foram utilizadas, onde que 8 são colocadas à 1 metro do nível do solo, e outras 2 armadilhas postas em copas de árvores com alturas variando entre 20 a 30 metros. Estas armadilhas eram distanciadas uma das outras por volta de 10 metros, obedecendo a locais estratégicos escolhidos pelas equipes de coleta, dando preferência a locais próximos à árvores de grande porte e tocas de animais.

b) Armadilhas Shannon:

Esta técnica de captura consiste em uma armação central em forma retangular, com duas superfícies externas igualmente de pano, onde que a armadilha fica suspensa fixa em árvores ou estacas, e em seu interior podem ser colocados atrativos animais ou humanos. Os flebotomíneos capturados ficam presos nas paredes internas da armadilha até a sua coleta.

Coletas diárias foram realizadas para essa armadilha durante 1 hora e 30 minutos em média, em geral entre as 18:00 e 19:30 horas. Estas armadilhas foram colocadas no nível do solo, utilizando como atrativo o corpo de um dos constituintes das equipes de coleta (atração humana)

no interior da armadilha, tendo o auxílio de tubo aspirador de Castro quando necessário para a captura do flebótomo.

### 3.3.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os flebotomíneos capturados foram transportados no dia seguinte para o laboratório de campo e separados de acordo com o sexo. As fêmeas eram identificadas de acordo com as espécies baseado nas características apresentadas por suas espermatecas. Os machos eram mantidos conservados em álcool 70% e em seguida identificados de acordo com análises de características morfológicas apresentadas por cada flebótomo de acordo com Young e Duncan (Young & Duncan, 1994).

As espécies *Psychodopygus wellcomei* e *Psychodopygus complexus*, eram as principais espécies a serem congeladas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) para o criobanco da instituição e análise molecular, devido suas altas frequências na região e na dificuldade de distinção destas duas espécies levando consideração apenas suas características morfológicas.

A dissecação das fêmeas foi realizada para a procura de formas flageladas no interior de seu intestino (infecção natural). Já dissecadas foram colocadas em lâmina de vidro com uma gota de solução salina a 0,85% contendo antibiótico recoberto por uma lamínula de vidro para análise ao microscópio. As fêmeas encontradas infectadas naturalmente, fazem-se destas a tentativa de isolamento desses flagelados *in vitro* através de meio de cultura e *in vivo* através de inoculação em hamsters oriundos do biotério do IEC/SVS.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

#### 3.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total a ser amplificado foi extraído de flebotomíneos inteiros e sem dissecação prévia do trato digestivo.

Fêmeas de flebotomíneos foram selecionadas e colocadas individualmente em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para trituração com auxílio de ponteira descartável em 100 µl de solução para trituração (Apêndice I). Após, adicionou-se imediatamente 10 µl de solução SDS (Apêndice II), incubando-se por aproximadamente 30 minutos a 65°C em banho-maria ou banho seco.

Colocou-se as amostras em gelo por aproximadamente 5 minutos, centrifugou-se rapidamente e adicionou-se 30 µl de solução de acetato de potássio (8M KOAc) e levado a agitação. Colocou-se em gelo por mais 45 minutos. Centrifugou-se os tubos por 2 minutos a 14000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se duas vezes o volume de etanol a 96% mantido em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram mantidas a -20 °C por uma noite.

Após prévia centrifugação, o etanol foi descartado por inversão, lavando-se 3 vezes o sedimento com etanol a 75% seguida de centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos. As amostras foram secadas em estufa a 37°C e o DNA redissolvido com 20 µl de solução TE (Apêndice III). Deixou-se os tubos em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e estocados a -20°C.

### 3.4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

Todas as amostras submetidas ao PCR foram inicialmente testadas pelos iniciadores CB3-PDR (5'-CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA-3') e N1N-PDR (5'-GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA-3'), que amplifica aproximadamente um fragmento de 544 pares de base (pb) do DNA mitocondrial (mtDNA) de flebotomíneos, sendo estes utilizados como marcadores interno para o controle de qualidade da extração de DNA.

A PCR foi realizada em um volume total de 25µl, contendo: 1X Tampão de *Taq* DNA polimerase, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 60 µM de cada dNTP (Invitrogen), 100~500ng de cada iniciador (Operon), 1,5U/µl de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1µl de DNA extraído.

A reação foi submetida a uma temperatura inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 5 minutos a 80°C para a adição da *Taq* DNA polimerase. Em seqüência, 5 ciclos nas seguintes temperaturas: 94°C por 30 segundos, 38°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos. Em seguida, de 35 ciclos nas condições: 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos. Ao final, a etapa de extensão foi mantida por 10 minutos a 72°C (Ishikawa *et al.*, 1999).

Com os iniciadores S1629 (5'-GGGAATTCAATAWAGTACAGAAACTG-3') e S1630 (5'-GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA-3') que amplificam o gene do mine-exon de *Leishmania*, é possível a detectar o DNA de *Leishmania* em nível do subgênero, *Viannia* e *Leishmania*.

Para os marcadores S1629 e S1630, a PCR foi realizada em um volume total de 10 $\mu$ l, contendo: 1X Tampão de *Taq* DNA polimerase, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% de dimetilsulfoxido, 250 $\mu$ M de cada dNTP (Invitrogen), 20 $\mu$ M de cada iniciador (Operon), 2,5U/ $\mu$ l de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1,5 $\mu$ l de DNA extraído. Os marcadores utilizados amplificam aproximadamente 400 pb do gene de Mini-exon das espécies de *Leishmania* viscerotrópicas e 250 pb para o subgênero *Viannia* e 350 pb para a *Leishmania (L.) amazonensis* (Fernandes *et al*, 1994).

Foi utilizado como controle positivo o DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, e a água para o controle negativo.

No termociclador programado, a reação foi submetida a uma temperatura inicial de 95° C por 3 minutos para a desnaturação do DNA, seguido de 5 ciclos nas seguintes temperaturas: 95°C por 1 minuto, 45°C por 30 segundos e 65°C por 1 minuto. Em seguida, a reação foi levada a uma temperatura de 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos nas condições: 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.

### 3.4.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Dez microlitros dos produtos da PCR foram migrados em gel de agarose a 1% em solução TAE (Apêndice IV), com 3  $\mu$ l de solução indicadora de azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada a 100 V/50 mA por uma hora. O DNA foi corado com 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídio e visualizado em translumindor de UV para análise das bandas obtidas.

#### 3.4.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos resultados obtidos por PCR foi realizada a partir da visualização das bandas formadas no gel de agarose após a migração eletroforética. Foram consideradas negativas todas as amostras que não apresentaram bandas no gel. Considerou-se positivas as amostras que apresentaram bandas similares aos controles utilizados. As amostras que apresentaram fragmentos similar a *Leishmania (V.) braziliensis* foram consideradas *Leishmania* do subgênero *Viannia*, enquanto que as que apresentaram padrão de migração similar a *Leishmania (L.) amazonensis*, foram consideradas *L. (L.) amazonensis*.

#### 3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística teve a finalidade de determinar a prevalência de *Leishmania* em flebotomíneos e avaliar a associação entre os casos positivos com as variáveis: Tipo de Armadilha, Ecótopo e Expedição. Para atingir este objetivo foram aplicados métodos estatísticos descritivos e inferenciais. A estatística descritiva foi aplicada através do cálculo de proporções e do traçado de diagramas de setor e de barras. A inferência estatística foi implementada através de testes de hipóteses baseados em métodos não paramétricos: os testes de aderência do Qui-Quadrado, o teste G, e o teste Binomial, conforme recomendado por Ayres *et al.* (2008, p. 122). Para o cálculo da significância das prevalências observadas tomou-se por base a prevalência paramétrica de 1%. Foi previamente estabelecido o nível de significância alfa = 0.05 para rejeição da hipótese de nulidade. Todo o processamento estatístico foi realizado sob o suporte computacional do software BioEstat 5.0.

#### 4 – RESULTADOS

No período de dezembro de 2005 a abril de 2008, houve sete excursões para os três ecótopos na Serra dos Carajás, Tapirapé – Aquirí, Área de Proteção Ambiental (APA) do Gelado e Parque Zoobotânico de Quarentena. Foram capturados no total 5.947 flebotomíneos, sendo 2.452 machos e 3.495 fêmeas. Dentre as fêmeas, 550 espécimes (15,7%) foram selecionados aleatoriamente para a análise por PCR, que foram identificadas morfológicamente como *Psychodopygus (Ps.) wellcomei/complexus*, Fraiha *et al* 1971, (n = 467), *Lutzomyia whitmani*, Antunes & Coutinho 1939, (n = 58) e *Lutzomyia shawi*, (n = 25) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Números e espécies de flebotomíneos capturados na Serra dos Carajás entre dezembro de 2005 e abril de 2008 e testados por PCR.

Nº de flebotomíneos capturados	Nº e espécies de flebotomíneos testados	
Machos (2452)	0	0
Fêmeas (3495)	550	<i>Ps.wellcomei/complexus</i> (467) <i>Lutzomyia whitmani</i> (58) <i>Lutzomyia shawi</i> (25)
Total (5947)	550	(550)

#### 4.1 – PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Com os marcadores S1629/S1630 que amplifica o gene de mini-exon, foi detectado DNA de *Leishmania* em 36 flebotomíneos, 34 do subgênero *Viannia* e dois do subgênero *Leishmania* (Anexo 1), com fragmento amplificação de DNA de aproximadamente 250 e 300 pb respectivamente.

Os fragmentos de DNA que apresentaram padrão de migração similar ao de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, utilizado como referência para as espécies do subgênero *Viannia*, foram detectados em 30 *Psychodopygus wellcomei/complexus*, para uma taxa de infecção natural de 6,8%, três *Lutzomyia whitmani* (7,17%) e um *Lutzomyia shawi* (4,0%).

Os fragmentos de DNA que apresentaram padrão de migração similar ao de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram detectados em dois *Psychodopygus wellcomei/complexus* (Tabela 2).

Tabela 2: Espécies de flebotomíneos capturados na Serra dos Carajás, entre dezembro de 2005 e abril de 2008, testados por PCR.

Espécies de flebotomíneos	Nº de fêmeas testadas	PCR (+) para <i>Leishmania</i>		Total
		Subgênero <i>Viannia</i>	Subgênero <i>Leishmania</i>	
<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	467	30	2	<b>32 (88,9 %)</b>
<i>Lutzomyia shawi</i>	25	1	0	<b>1 (2,8 %)</b>
<i>Lutzomyia whitmani</i>	58	3	0	<b>3 (8,3 %)</b>
<b>Total</b>	<b>550</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>36 (100 %)</b>

#### 4.2 – POR ECÓTOPO DE COLETA

Das 1.538 fêmeas capturadas em Tapirapé – Aquirí, 214 foram testadas por PCR. DNA de *Leishmania* foi detectado em 14 espécimes testados, observando uma prevalência de 6,54 %.

Dos 14 exemplares positivos, 12 *Psychodopygus wellcomei/complexus* estavam infectados com *Leishmania* do subgênero *Viannia*, um *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectado por *Leishmania* do subgênero *Leishmania* e um *Lutzomyia shawi* por *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

No ecótopo da APA do Gelado, foram capturados 1.175 fêmeas e 235 foram testados por PCR. Em 14 espécimes foi detectado DNA de *Leishmania*, obtendo-se uma prevalência de 5,96 %.

Das 14 espécimes com DNA de *Leishmania*, 10 *Psychodopygus wellcomei/complexus* continham DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, um *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectado por *Leishmania* do subgênero *Leishmania* e três *Lutzomyia whitmani* infectados com o subgênero *Viannia*.

No Parque Zoobotânico de Quarentena foram 782 fêmeas capturadas, onde 101 foram testadas. Verificou-se DNA de *Leishmania* em oito espécimes de *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectados por *Leishmania* do subgênero *Viannia*, observando uma prevalência de 7,92 % neste ecótopo (Tabela 3 e 5).

Estatisticamente, as prevalências, nos três ecótopos pesquisados, foram significativamente maiores que o parâmetro de 1% estabelecido como base para regiões endêmicas para leishmaniose. O Teste do Qui-Quadrado de Aderência não detectou significativa discordância entre as proporções de casos positivos e o número de análises realizadas nos respectivos ecótopos (Tabela 4).

Tabela 3: Distribuição da Captura e testes realizados conforme o Ecótopo.

<b>ECÓTOPO</b>	<b>Capturas</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Testadas</b>	<b>Positivos</b>
<b>TAPIRAPÉ – AQUIRÍ</b>	2115	1495	214	14
	43.9%	53.0%	42.6%	42.4%
<b>APA DO GELADO</b>	1212	612	197	11
	25.2%	21.7%	39.2%	33.3%
<b>P. Z. QUARENTENA</b>	1489	712	91	8
	30.9%	25.3%	18.1%	24.2%
<b>TOTAL</b>	4816	2819	502	33
	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

p-valor = 0.6144, Qui-Quadrado de Aderência =0.974, GL=2

Tabela 4: Prevalência nas regiões do estudo.

	<b>Tapirapé Aquirí</b>	<b>APA do Gelado</b>	<b>P.Z. Quarentena</b>	<b>Geral</b>
Prevalência	0.06542 ou 6,54%	0.0558 ou 5,58%	0.08791 ou 8,791%	0.06573 ou 6,57%
IC 95%	3,2% a 9,9%	2,4% a 8,8%	3,0% a 14,6%	4,4% a 8,7%
p-valor	< 0.0001*	< 0.0001*	< 0.0001*	< 0.0001*

Tabela 5: Números de flebotomíneos capturados por ecótopo de coleta na Serra dos Carajás de Dezembro/05 a Abril/08 e testadas por PCR.

Ecótopo	Nº de Fêmeas Capturadas	Nº de Fêmeas Testadas	Flebotomíneos Testados e Positivos	PCR (+) para <i>Leishmania</i>		Total (+)	Prevalência	
				Subgênero <i>Viannia</i>	Subgênero <i>Leishmania</i>			
Tapirapé Aquiri	1.538	214	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	181 (13)	12	1	<b>14</b>	<b>6,54 %</b>
			<i>Lutzomyia shawi</i>	25 (1)	1	0		
			<i>Lutzomyia whitmani</i>	8 (0)	0	0		
APA do Gelado	782	235	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	185 (11)	10	1	<b>14</b>	<b>5,96 %</b>
			<i>Lutzomyia whitmani</i>	50 (3)	3	0		
P. Zoobotânico de Quarentena	1.175	101	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	101 (8)	8	0	<b>8</b>	<b>7,92 %</b>
<b>Total</b>	<b>3.495</b>	<b>550</b>			<b>34</b>	<b>2</b>	<b>36</b>	<b>6,5 %</b>

#### 4.3 – DE ACORDO COM AS EXCURSÕES ÀS REGIÕES DE COLETA

Na 1ª Excursão (dez/05) 918 fêmeas foram capturadas sendo testadas 274 espécimes. Dentre o material testado, 17 (47,3 %) exemplares continham DNA de *Leishmania*, com 15 *Psychodopygus wellcomei/complexus* e um *Lutzomyia shawi* infectados com *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Um *Psychodopygus wellcomei/complexus* foi detectado com *Leishmania* do subgênero *Leishmania*.

Sessenta e duas fêmeas foram capturadas na 2ª excursão (mar/06), dentre estas, 10 (27,8 %) espécimes estavam infectados. Todas as infecções foram detectadas em *Psychodopygus wellcomei/complexus* com DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

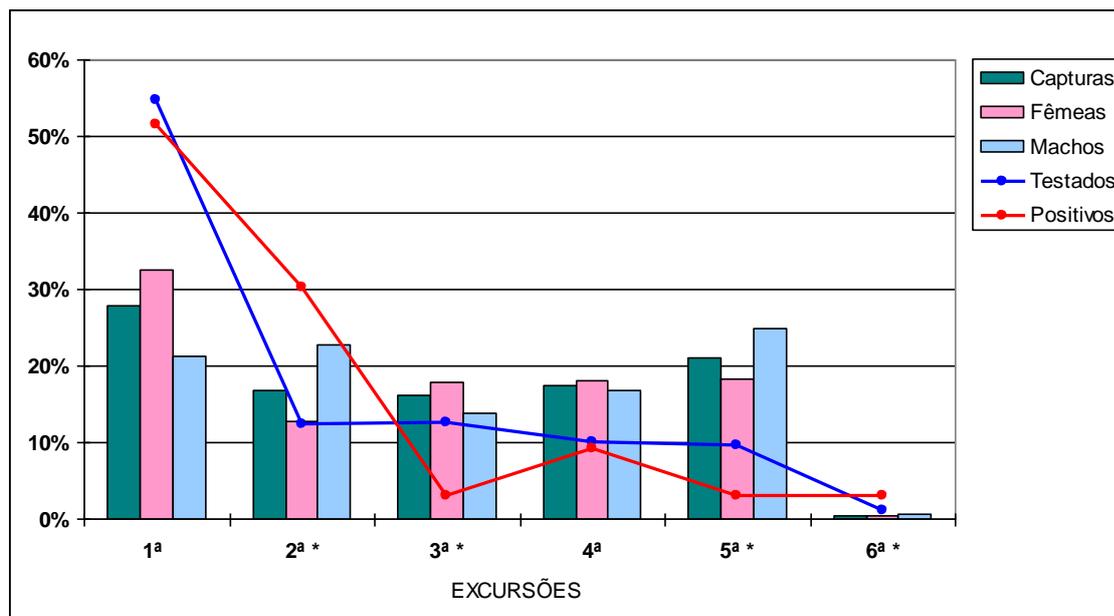
Foram testados por PCR 63 e 47 flebotomíneos capturados na 3ª (jun/06) e 4ª (fev/07) excursões, respectivamente. Dentre aqueles da 3ª excursão, detectou-se um *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectado com *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Na 4ª excursão, dentre os espécimes testados, detectaram-se dois exemplares de *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectados com *Leishmania* do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (Figura 8).

Dos exemplares capturados nas excursões 5ª (abr/07), 6ª (jun/07) e 7ª (abr/08), 48, 05 e 60 espécimes foram testadas, respectivamente. Das amostras testadas obtidas da 5ª e 6ª excursões, detectou-se um exemplar de *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectado com *Leishmania* do subgênero *Viannia* para cada excursão. Das amostras testadas da 7ª excursão, foram detectados três *Lutzomyia whitmani* com DNA de *Leishmania* pertencente ao subgênero *Viannia* dentre os exemplares testados (Tabela 6)

Na excursão realizada em setembro de 2006, nenhum flebotomíneo foi testado devido a pouca quantidade de material capturado nesta viagem.

Tabela 6 Números de flebotomíneos/fêmeas capturados por excursão na Serra dos Carajás de dez/2005 a abr/2008 e testadas por PCR para detecção de DNA de *Leishmania*.

Período da Excursão	Nº de Fêmeas Capturadas	Nº de Fêmeas Testadas por PCR	Flebotomíneos Testados e Positivos	PCR (+) para <i>Leishmania</i>		Total (+)	
				Subgênero <i>Viannia</i>	Subgênero <i>Leishmania</i>		
1º (Dez/ 05)	918	275	<i>Lutzomyia whitmani</i>	8 (0)	0	<b>17(47,3%)</b>	
			<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	142 (16)	15		
			<i>Lutzomyia Shawi</i>	25 (1)	1		
2º (Mar/ 06)	360	62	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	62 (10)	10	<b>10(27,8%)</b>	
3º (Jun/ 06)	506	63	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	63 (1)	1	<b>1(2,7%)</b>	
4º (Fev/ 07)	510	47	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	47 (3)	2	<b>3(8,4%)</b>	
5º (Abr/ 07)	515	48	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	48 (1)	1	<b>1(2,7%)</b>	
6º (Jun/ 07)	54	5	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	5 (1)	1	<b>1(2,7%)</b>	
			<i>Lutzomyia whitmani</i>	50 (3)	3		
7º (Abr/ 08)	632	60	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	10 (0)	0	<b>3(8,4%)</b>	
			<i>Lutzomyia whitmani</i>	50 (3)	3		
<b>Total</b>	<b>3.495</b>	<b>550</b>			<b>34</b>	<b>2</b>	<b>36(100%)</b>



**Figura 8:** Distribuição de espécimes capturados, fêmeas capturadas, machos capturados, fêmeas testadas e resultados positivos conforme a Excursão.

#### 4.4 – POR ARMADILHAS DE COLETA

Dois tipos de armadilhas de capturas de flebotomíneos foram utilizados, CDC's (Solo e Copa) e armadilha Shannon. Utilizando a armadilha CDC (Solo), 1.112 fêmeas foram capturadas, destas 202 foram testadas por PCR, sendo 187 *Psychodopygus wellcomei/complexus* e 15 *Lutzomyia shawi*. DNA de *Leishmania* foi detectado em 19 (52,8 %) espécimes, onde 18 *Psychodopygus wellcomei/complexus* estavam infectados com *Leishmania* do subgênero *Viannia* e um *Psychodopygus wellcomei/complexus* por *Leishmania* do subgênero *Leishmania*.

Das 688 fêmeas capturadas pela armadilha tipo CDC (Copa), 97 foram testadas pela PCR (29 *Psychodopygus wellcomei/complexus*, 10 *Lutzomyia shawi* e 58 *Lutzomyia whitmani*). Em oito (22,2 %) espécimes foi detectado DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, sendo quatro

detectadas de *Psychodopygus wellcomei/complexus*, três *Lutzomyia whitmani* e um *Lutzomyia shawi*.

A armadilha Shannon capturou 1.695 fêmeas, das quais 251 espécimes de *Psychodopygus wellcomei/complexus* foram testados. Nove (25,0 %) exemplares foram detectadas com DNA de *Leishmania*, sendo oito do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (Tabela 7).

A distribuição dos casos positivos em amostras capturadas pela armadilha CDC Copa, CDC Solo e Shannon foi proporcionalmente semelhante entre as seis excursões, de acordo com a análise estatística com teste binomial.

Tabela 7: Números de flebotomíneos/fêmeas capturados por tipos de armadilhas de coletas utilizadas na Serra dos Carajás de Dez/05 a Abr/08 e testadas por PCR para detecção de DNA de *Leishmania*.

Tipo de Armadilha	Nº de Fêmeas Capturadas	Nº de Fêmeas Testadas pelo PCR	Flebotomíneos Testados e Positivos	PCR (+) para <i>Leishmania</i>		Total	
				Subgênero <i>Viannia</i>	Subgênero <i>Leishmania</i>		
CDC (Solo)	1.112	202	<i>Lutzomyia shawi</i>	15 (0)	0	<b>19 (52,8%)</b>	
			<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	187 (19)	18		1
CDC (Copa)	688	97	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	29 (4)	4	<b>8 (22,2%)</b>	
			<i>Lutzomyia shawi</i>	10 (1)	1		0
			<i>Lutzomyia whitmani</i>	58 (3)	3		0
Shannon	1.695	251	<i>Ps. wellcomei/complexus</i>	251 (9)	8	1	<b>9 (25%)</b>
<b>Total</b>	<b>3.495</b>	<b>550</b>			<b>34</b>	<b>2</b>	<b>36 (100%)</b>

## 5 – DISCUSSÃO

No início dos anos 70, casos de LTA foram relatados na região da Serra dos Carajás, Pará, principalmente após a instalação de empresas mineradoras e o adentramento de pessoas em áreas até então de natureza primária. Estudos epidemiológicos relataram a situação da região para os perigos da leishmaniose e caracterizaram a específica relação vetor/parasita entre *Psychodopygus wellcomei* e *L. (V.) braziliensis*, sendo esta espécie considerada como o principal vetor de *L. (V.) braziliensis* na região das Serra dos Carajás (Lainson *et al.*, 1973, 1977; Ward *et al.*, 1973).

No presente estudo, das 550 espécimes testadas, em 36 (6,5%) foi detectado a presença de DNA de *Leishmania*, sendo o subgênero *Viannia* o que apresentou infectando flebotomíneos em maior número, 34 espécimes. O subgênero *Leishmania* foi detectado em apenas dois espécimes testados.

Com a prevalência de 6,5% de flebotomíneos infectados por *Leishmania* detectados no presente estudo, levando-se em consideração que em áreas endêmicas de LTA o índice de infecção natural de flebotomíneos é baixo, em torno de 0,1 à 3,0% (Arias *et al.*, 1985; Miranda *et al.*, 2002) e juntamente com a progressiva adaptação dos vetores aos ambientes peridomésticos e domésticos, evidencia-se os perigos no surgimento de novos casos de LTA advirem na Serra dos Carajás.

A PCR vem sendo utilizada em estudos de infecção natural em flebotomíneos em diversos países do Novo Mundo, como Brasil (Pereira *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2007), Equador (Kato *et al.*, 2005), Colômbia (Santamaría *et al.*, 2005), Venezuela (Rodriguez *et al.*, 1999; Bofante-Garrido *et al.*, 1999), Argentina (Córdoba-Lannus *et al.*, 2006), México (Rebollar-Tèllez *et al.*, 1996). Como também em países no Velho Mundo (Aransay *et al.*,

2000; Sánchez *et al.*, 2006; Pandley *et al.*, 2008), demonstrando a validade da técnica da PCR nesse tipo de estudo e deixando clara a importância da compreensão das condições vetoriais para as leishmanioses nos países tanto do Velho Mundo quanto do Novo Mundo.

Vários estudos sobre infecções naturais em flebotomíneos foram realizados, na região Amazônica, em diferentes espécies e períodos de coletas. Arias & Freitas, 1978, relataram uma prevalência de 7,3% em flebotomíneos infectados por *Leishmania*, no Estado de Manaus. Mais recentemente, Freitas e colaboradores em 2002 no Estado do Amapá, detectaram 11,7% de infecção por tripanosomídeos em flebotomíneos e Pinheiro e colaboradores em 2008, em áreas do Estado do Amazonas, detectaram uma prevalência de 1,04%. Ryan e colaboradores em 1987, envolvendo diversas regiões do Estado do Pará (Serra dos Carajás, Belém, Paragominas, Tucuruí, Trombetas, Jarí e Cachoeira Porteira) encontraram uma prevalência oscilando entre 1 a 2% nestas regiões. Estes estudos nos demonstram as diversidades de prevalências de infecções naturais encontradas em flebotomíneos vetores de *Leishmania* na região Amazônica, e que fatores ambientais de cada região nos períodos de realização de coleta dos espécimes são de fundamental importância podendo influenciar nos resultados obtidos de cada estudo.

Em algumas regiões do Brasil são encontrados índices de prevalência para infecção natural em flebotomíneos mais elevados aos 6,5% encontrados na Serra dos Carajás, como os 8,9% encontrado em áreas endêmicas para LTA na Bahia (Miranda *et al.*, 2002), como também índices mais baixos, como 1,1% em Teresina, Piauí (Silva *et al.*, 2007), Mato Grosso do Sul de 0,16% (Galati *et al.*, 1996), 0,3% detectado em regiões no Rio Grande do Sul (da Silva, 1999) e zero de infecção natural em flebotomíneos testados em áreas consideradas endêmicas para LTA no Estado do Paraná (Neitzke *et al.*, 2008). Deste modo colocando-se a Serra dos Carajás entre uma das principais áreas com maiores taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* detectadas no território brasileiro.

No Velho Mundo, Aransay e colaboradores, 2000, na Grécia, e Pandley e colaboradores, 2008, no Nepal, obtiveram um valor igual de prevalência de infectividade natural em flebotomíneos, 6,7% , valor este próximo ao obtido agora na Serra dos Carajás, 6,5%, evidenciando que altos índices nas taxas de infecção natural em flebotomíneos não se apresenta restrita à determinadas regiões, mas sim distribuído em diverso países do Novo e Velho Mundo.

Das 36 espécimes detectadas com *Leishmania*, observamos que *Psychodopygus wellcomei/complexus* foi a que apresentou o maior número de infecções, 32 (88,9%) espécimes, enquanto que em *Lutzomyia whitmani* (8,3 %) e *Lutzomyia shawi* (2,8%) foram detectados apenas três (8,3%) e um (2,8%) exemplar infectado, respectivamente. Considerando os aspectos de frequência, prevalência de infecção natural por *Leishmania* (6,5 %) e os hábitos antropofílicos, o papel do *Psychodopygus wellcomei/complexus* como principal transmissor da LTA na Serra dos Carajás, continua fortalecido. Esta espécie é, também, determinada como provável vetor de *Leishmania* na Serra do Baturité, Estado do Ceará (Ready *et al.*, 1983). Possivelmente pelo fato desses flebotomíneos estarem se adaptando aos ambientes peridomiciliares e domiciliares (Andrade Filho, 2001), intensificadas pelas destruições do ambiente natural da espécie realizadas pelo homem com conseqüente aumento do contato homem/vetor nessas regiões.

A espécie *Lutzomyia whitmani* no Estado do Pará é descrita como uma espécie de baixa antropofilia (Lainson *et al.*, 1979; Ready *et al.*, 1986), enquanto que em outras regiões do país é considerada elevada, como no Sudeste e Nordeste (Pessôa & Coutinho, 1941; Azevedo & Rangel, 1991), e moderada na região Sul do Brasil (Aguiar *et al.*, 1989; Rangel *et al.*, 1996). Na Amazônia é vetor de *L. (V.) guyanensis* (Ready *et al.*, 1986), e *L. (V.) shawi* (Ishikawa *et al.*, 1999) e no Nordeste brasileiro de *L. (V.) braziliensis* (Rangel *et al.*, 1996). Em alguns Estados do Brasil é considerada como a principal vetora de *Leishmania*

*braziliensis*, como em Minas Gerais, (Galati *et al.*, 1996), Bahia (Miranda *et al.*, 2002) e Maranhão (Figueredo *et al.*, 1997; Rangel & Costa, 2007).

A taxa de infecção natural por *Leishmania* entre flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* na Serra dos Carajás mostrou-se mais elevada do que às encontradas em Corguinho (MG), das 613 espécimes dissecados apenas uma estava infectada, apresentando taxa de 0,16% (Galati *et al.*, 1996), Ceará, 0,8% de 893 exemplares (Azevedo & Rangel, 1991) e São Paulo, 0,24% de 4.139 exemplares (Pessoa & Coutinho, 1941). Porém, foram bem mais reduzidas quando comparadas a populações relatadas por Ready e colaboradores, 1986, no Estado do Pará (33,3% de 21 espécimes estudadas).

Ryan e colaboradores, 1987, em estudo na Serra dos Carajás, observaram quatro espécimes de *Lutzomyia whitmani* infectadas por *Leishmania* em 264 espécimes dissecadas, no presente estudo foi detectado três espécimes infectadas por *L. (Viannia) sp.* em 58 espécimes analisados por PCR, observando-se uma taxa de infecção por *Leishmania* maior do que a encontrada por Ryan, possivelmente devido ao período de coleta dessas espécimes infectadas por *L. (Viannia) sp.* .Esta espécie pode estar juntamente com o *Ps. wellcomei/complexus* envolvidas na transmissão da LTA na Serra dos Carajás.

Em dois exemplares de *Psychodopygus wellcomei/complexus* foi obtido DNA de *Leishmania* do subgênero *Leishmania*, fato este merecedor de maior atenção e estudos complementares, por não haver até então relatos de *Psychodopygus wellcomei/complexus* como vetor de *L. (Leishmania) sp.*, nem mesmo de ser um vetor secundário. Questiona-se a possibilidade das espécimes infectadas terem sido capturadas logo após alimentar-se de algum animal reservatório de *L. (Leishmania) sp.*, albergando este parasito, visto que a detecção de DNA de *Leishmania* em determinadas espécies de flebotomíneos não implica que esta espécie seja vetora do parasita, já que o resultado da PCR não indica a fase evolucionária do parasito no interior do trato digestivo do inseto.

Todos os espécimes de *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia shawi* que apresentaram PCR positivo estavam infectados com *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Viannia*. Rayn e colaboradores, 1987, também detectaram nas mesmas espécies de flebotomíneos investigadas neste estudo, infecção por *L. (Viannia) sp.*, porém em menor escala.

Apesar de *L. (V.) braziliensis* ter sido encontrada com maior frequência na região, ainda não foi isolada de *Lu. whitmani* na Serra dos Carajás. Porém, vale ressaltar que *L. (V.) shawi* tem sido identificada nessa região, o que pode estar associada com *Lu. whitmani*, como observado em outras localidades do Estado do Pará (Ishikawa *et al.*, 1999).

No caso de infecção por *L. (Viannia) sp.* em *Lu. shawi* será necessário estudos complementares devido a ausência de dados sobre essa espécie na atuação como vetor de *Leishmania* na região.

Analisando os ecótopos de coleta dos flebotomíneos na Serra dos Carajás, verificou-se que Tapirapé-Aquirí e APA do Gelado foram os que tiveram os maiores números de flebotomíneos testados (214 e 235, respectivamente) e positivos (14 espécimes cada), com prevalência de 6,54% e 5,96% flebotomíneos infectados por *Leishmania*. Porém, o Parque Zoobotânico de Quarentena foi o que obteve a maior prevalência (7,92%), mesmo sendo o ecótopo com o menor número de flebotomíneos testados, 101 exemplares. Estatisticamente, a ocorrência de casos positivos não depende da variação de ecótopo, ou seja, podemos afirmar que as prevalências não são significativamente diferentes nos ecótopos amostrados neste estudo.

As variações existentes entre as prevalências de flebotomíneos infectados por *Leishmania* nos ecótopos estudados, onde maiores (Parque Zoobotânico de Quarentena) e menores (Tapirapé-Aquirí e APA do Gelado) alterações antrópicas, podem estar relacionadas com a disponibilidade de alimento e fonte de infecção para as fêmeas, assim como fatores

influenciantes na densidade populacional das espécies, demonstrando o papel do ambiente e de seu grau de impacto à fauna flebotomínica.

Estas diferenças entre os ecótopos também torna fundamental o desenvolvimento de programas de controle específicos para cada um deles, através da informação para os perigos e cuidados da doença em ambientes primários como Tapirapé-Aquirí, a diminuição da degradação ambiental na região da APA do Gelado e cuidados como atos de controle vetorial (repelentes, mosquiteiros, fumacê, etc) na área urbana do Parque Zoobotânico de Quarentena como medidas profiláticas para o controle na transmissão da LTA.

A espécie *Lutzomyia whitmani* mesmo sendo caracterizado como pouco antropofílicos na região Amazônica, apresenta hábitos peridomésticos e domésticos na Bahia (Miranda *et al.*, 2002) e em Minas Gerais (Galati *et al.*, 1996), pode-se aludir que a degradação ambiental na APA do Gelado (Souza, comunicação pessoal) estaria possivelmente influenciando no aparecimento desse vetor nessa região.

Segundo Marzochi & Marzochi (1997) dois diferentes padrões epidemiológicos de transmissão de LTA ocorrem na região Amazônica: silvestre-floresta - onde a doença é uma zoonose de animais silvestres, com ocorrência de alguns casos humanos em áreas de colonização recente devido à penetração do homem em ambiente silvestre, como ocorrido no ecótopo do Parque Zoobotânico de Quarentena em nosso estudo; e silvestre-periflorestal – onde a doença é uma antropozoonose, que ocorreu em áreas e ocupação situadas dentro do raio de vôo dos vetores silvestres, se enquadrando à essas características os ecótopos da APA do Gelado e Tapirapé-Aquirí na Serra dos Carajás.

Analisando-se os resultados obtidos por excursão aos ecótopos de coleta, observaram-se variáveis valores nos números de flebotomíneos capturados, apresentando excursões com grandes números de capturas (1ª Excursão – 918 espécimes) e outras com baixos números (6ª Excursão – 54 espécimes). Um dos fatores que influenciaram na variação

da taxa de captura de estar correlacionado com a sazonalidade destes insetos na região da Serra dos Carajás.

Nas excursões 1<sup>a</sup> (dezembro/05), 4<sup>a</sup> (fevereiro/07), 5<sup>a</sup> (abril/07) e 7<sup>a</sup> (abril/08) houve os maiores números de espécimes capturados, sendo estas realizadas em períodos mais chuvosos, que se estende do mês de novembro ao mês de maio (Ward *et al.*, 1973). Sendo as excursões 1<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> destacadas nos números totais de flebotomíneos capturados, com coletas realizadas nos extremos do período chuvoso, dezembro e abril, respectivamente, verificando-se que os meses próximos ao início e ao fim da estação chuvosa, com temperaturas e umidades elevadas, favorecem o desenvolvimento destes insetos e são os melhores períodos para a coleta de flebotomíneos na Serra dos Carajás.

Nas três excursões realizadas no período mais quente e seco (junho-outubro), a 6<sup>a</sup> excursão (junho/07) capturou somente 54 exemplares para a análise molecular. Na excursão realizada em setembro de 2006 não foi possível o congelamento de espécimes, devido ao baixo número de exemplares capturados. Esse decréscimo da população com possível ausência de espécimes nas capturas pode está associada com a diapausa dos flebotomíneos durante as estações mais secas do ano (Rangel & Lainson, 2003).

As excursões realizadas em junho/06 e junho/07 obtiveram números de flebotomíneos capturados com acentuada diferença, 506 e 54 exemplares respectivamente. Essa diferença foi motivada pelas intensas chuvas relatadas pela equipe entomológica no período de junho/07, acarretando em dificuldades nos trabalhos de coleta destes insetos. Fatores externos como temperatura e umidade relativa do ar não devem ter influenciado drasticamente nessa diferença numérica, sendo observados médias de 23,5°C de temperatura e 90% de umidade relativa do ar em junho/06, com 22°C e 92% em junho/07.

Fatores externos como variações de temperatura, umidade relativa do ar e níveis pluviométricos podem ter diversas origens, sendo em um mesmo local a incidência dos

flebotomíneos pode variar consideravelmente com as condições atmosféricas. Todas as causas que prejudicam atividades dos flebotomíneos, tais como, quedas de temperatura, pequeno grau higrométrico do ar, ventos, etc., fazem diminuir a incidência de flebotomíneos em um dado ponto. Mas, ainda que as condições atmosféricas sejam aparentemente idênticas nos diferentes ecótopos, a incidência desses insetos pode variar inexplicavelmente de um dia para outro, em um mesmo local.

Nas três excursões realizadas em 2007, observa-se claramente a sazonalidade dos flebotomíneos neste ano, com números de captura elevadas no período chuvoso, 4<sup>a</sup> (fevereiro/07) e 5<sup>a</sup> (abril/07) excursão, e baixos no período mais seco, 6<sup>a</sup> excursão (junho/07).

As variações em relação à atividade sazonal das espécies capturadas, embora sem analisar os valores locais de umidade relativa, temperatura ou índice pluviométrico, pode-se inferir que essas diferenças estejam relacionadas com variações climáticas e paisagísticas locais. Verificando que em meses mais frios, com temperaturas médias de 22 °C, e secos, com umidade relativa do ar oscilando entre 50 a 70% havia queda na densidade de *Lu. whitmani* e *Ps. wellcomei/complexus* coletados, retornando aos índices mais elevados nos meses mais quentes, 32°C em média, e úmidos, podendo chegar próximo aos 100% de umidade relativa do ar .

Com relação à distribuição dos espécimes detectados com DNA de *Leishmania* nas excursões realizadas, a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> excursões apresentaram 17 e 10 espécimes infectados por *Leishmania*, respectivamente, sendo estes os maiores valores encontrados entre todas as excursões. As excursões 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> apresentaram as menores taxas de infecção natural.

A sazonalidade observada na coleta dos flebotomíneos pode ser detectada também no número de *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectados naturalmente por *Leishmania*, observando os meses de dezembro de 2005 (1<sup>a</sup> excursão), março (2<sup>a</sup> excursão) e junho (3<sup>a</sup> excursão) de 2006, correspondendo as duas primeiras a períodos chuvosos e de maiores taxas

de infecção natural observado nesta espécie, com a redução das espécimes infectadas conforme a diminuição da intensidade das chuvas (3ª excursão).

Conhecer o padrão sazonal das espécies presentes na região é de fundamental importância para que se possa implementar programas efetivos de controle desses insetos nas regiões estudadas.

As armadilhas de captura CDC (Solo) e Shannon foram as que capturaram o maior número de flebotomíneos, em destaque o *Psychodopygus wellcomei/complexus*. Dezenove espécimes com DNA de *Leishmania* foram capturados pela armadilha CDC (Solo) e nove exemplares pela Shannon.

Biologicamente o *Psychodopygus wellcomei* mostra uma grande antropofilia e também atraídos pelos roedores e, provavelmente devido a esse fato, a espécie foi amplamente capturada pelas armadilhas CDC (Solo) e Shannon situadas em baixas alturas em relação ao solo.

Diferenças quanto a presença ou ausência de certas espécies de flebotomíneos em troncos de árvores em diversos estudos é notório. É provável que algumas espécies utilizem este ambiente como abrigo ou locais de repousos alternativos, devido sua maior abundância em outros locais como tocas de animais, buracos de árvores, entre outros, fato observado nas espécies pertencentes aos subgêneros *Psathyromyia* e *Psychodopygus*, (Forattini 1973).

Fatores como a multiplicidade de abrigos, maior quantidade de animais para repasto sanguíneo, oportunidade de acasalamento e microhabitats estáveis poderiam favorecer a presença de diferentes espécies em bases de árvores. Mas, não podemos deixar de considerar a competição, a predação e fatores climáticos como fatores limitantes e provavelmente a razão para a redução no número de espécimes. Estudos visando aspectos acima ressaltados serão de grande auxílio no esclarecimento da importância destes locais na epidemiologia da LTA na Amazônia Brasileira.

A espécie *Lutzomyia whitmani* foi capturada exclusivamente pela armadilha CDC (Copa), devido essa espécie ser raramente encontrada em troncos de árvores, ao nível do chão, sendo encontrados em grande número na copa das mesmas (Lainson & Rangel, 2005), justificando assim a sua captura pelas CDC's (Copa).

No presente estudo sobre as infecções naturais em flebotomíneos capturados na Serra dos Carajás, a técnica da PCR foi utilizada devido a sua sensibilidade, na qual é possível a detecção e caracterização de *Leishmania* em nível de subgênero a partir de flebotomíneos individualmente analisados. Sendo esta técnica potencialmente aplicada não somente ao monitoramento de infecção por *Leishmania* em populações de flebotomíneos, mas em estudos relacionados com rápida identificação das prevalências de espécies de *Leishmania* e flebotomíneos vetores em áreas endêmicas para leishmanioses.

A identificação de ecótopos, em grandes áreas consideradas como endêmicas para leishmanioses e com altas frequências de flebotomíneos infectados por *Leishmania*, é fundamental para a compreensão de fatores ecológicos e geográficos que podem influenciar na transmissão das leishmanioses na região em estudo.

Embora não tenha sido comprovada a relação vetor-parasita para *Ps. wellcomei/complexus* e *L.(V.) braziliensis* no presente trabalho devido à ausência de marcadores moleculares espécies-específicos para *L. (V.) braziliensis*, o comportamento deste flebotomíneo na Serra dos Carajás apresentada neste trabalho parece não deixar dúvidas quanto ao seu destacado papel de vetor de *Leishmania* causadoras de LTA na referida região.

Estudos sobre o poder vetorial das espécies *Lu. whitmani* e *Lu. shawi* infectados naturalmente por *Leishmania* na região da Serra dos Carajás devem ser intensificados, verificando se essas espécies podem estar atuando no ciclo de transmissão da LTA na Serra dos Carajás.

Futuros estudos que melhor esclareçam os diversos fatores que possam estar relacionadas às variações nos números e nas taxas de infecção dos flebotomíneos por *Leishmania* na região da Serra dos Carajás são necessários para uma melhor compreensão da sazonalidade das principais espécies vetoras e conseqüentemente a identificação dos períodos de situações críticas para a transmissão da LTA onde as estratégias de controle deveriam ser intensificadas na região.

## 6 – CONCLUSÕES

- Das 550 espécies de flebotomíneos testados, em 36 (6,5%) foi detectado infecção natural por *Leishmania*.
- O marcador do gene de mini-exon foi capaz de distinguir *Leishmania* do subgênero *Viannia* em 34 espécimes e do subgênero *Leishmania* em 2 espécimes.
- *Psychodopygus wellcomei/complexus* foi a espécie de flebotomíneos que apresentou maior número de infecções (88,9%), comparados à *Lutzomyia whitmania* e *Lutzomyia shawi*, fortalecendo o papel de principal vetor de *Leishmania* na Serra dos Carajás.
- *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia shawi* apresentaram infecções apenas por *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Os estudos sobre o poder vetorial destas espécies como vetores na Serra dos Carajás devem ser intensificados.
- *Psychodopygus wellcomei/complexus* apresentou infecção por *Leishmania* do subgênero *Viannia* e *Leishmania amazonensis*.
- Apesar de encontrar apenas 2 espécimes de *Psychodopygus wellcomei/complexus* infectados por *Leishmania amazonensis*, não implica que esta espécie seja vetora deste parasita, mas merece maior atenção e estudos complementares.
- Os ecótopos de Tapirapé-Aquirí, APA do Gelado e Parque Zoobotânico de Quarentena apresentaram altas taxas de infecções naturais em flebotomíneos, 6,54%, 5,96% e 7,92%, respectivamente. O Parque Zoobotânico de Quarentena foi o que apresentou a maior prevalência de flebotomíneos infectados por *Leishmania*, ratificando o perigo da transmissão das LTA em áreas urbanas na Serra dos Carajás.
- Fatores climáticos influenciam na sazonalidade dos flebotomíneos na Serra dos Carajás, obtendo-se maiores números de espécimes coletados durante estações com temperaturas e umidade (estações chuvosas) mais elevadas.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. Distribuição e Hábitats: Distribuição Regional e Hábitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. *In*: Rangel, E.F.; Lainson, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 207-255, 2003.

AGUIAR, G.M.; VILELA, M.L.; FERREIRA, V.A.; SANTOS, T.G. Ecologia dos flebotomíneos em um recente foco ativo de leishmaniose tegumentar no norte do Estado do Paraná (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 84 (supl. IV): 7-8, 1989.

ALEXANDER, J.; RUSSEL, D.G., The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology** 31: 175 – 254, 1992.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. 112, p. 2993-3002, 1999.

ANDRADE FILHO, J.D.; VALENTE, M.B.; ANDRADE, W.A.; BRAZIL, R.P.; FALCÃO, A.L. Flebotomíneos do estado de Tocantins, Brasil (Diptera:Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34(4):323-329. 2001.

ARANSAY, A.M.; SCOULICA, E. AND TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sandflies by seminested PCR on minicircle kinetoplast DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 1933-1938, 2000.

ARIAS, J.R. FREITAS, R.A - Sobre os vetores de leishmaniose cutanea na Amazônia central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebotomos selváticos. **Acta Amazônica**, 8: 387-396, 1978.

ARIAS, J.R.; MILES, M.A.; NAIFF, R.D.; PÓVOA, M.M.; FREITAS, R.A.; BIANCARDI, C.B.; CASTELLON, E.G. Flagellate infection of Brazilian sandflies (Díptera: Psychodidae): Isolation *in vitro* and biochemical identification of *Endotrypanum* end *Leishmania*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 34: 1098-1108, 1985.

ASHFORD, R.W.; BATES, P.A. Leishmaniasis in the Old World. *In: Topley & Wilson. Microbiology and Microbial Infection*. FEG Cox, p. 215- 240. 1997.

Ayres M, Ayres Jr, Ayres DL, Santos AAS (2008). Bioestat Versão 5.0. Sociedade Civil Mimirauá, MCT – CNPq. Belém, Pará, Brasil..

AWASTHI, A.; KUMAR, R.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal Medical Research**. 119, pág. 238-258, June 2004.

AZEVEDO, A.C.R. & RANGEL, E.F. A study of sandfly species (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturipté, Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86: 405-410, 1991.

BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ,R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E.M.C. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.19, n.3, p.173-191, jul./set. 1986.

BONFANTE-GARRIDO, R.; URBANETA, R.; URDANETA, I.; ALVARADO, J. AND PERDOMO, R. Natural infection of *Lutzomyia rangeliana* (Ortiz, 1952) (Díptera: Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Lara State, Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, RJ, 94(1): 11, 1999.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S.; BACELLAR, O.; LESSA, M.; ALMEIDA, R.P.; MAGALHÃES, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; MACHADO, P.; JESUS, A.R.

Diferencial immune regulation of activated T cell between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunology**. 29 (5), 251-258, 2007.

CASTELLON, E.G.; SILVA, M.N.T.; FÉ, N.F. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) no Estado de Roraima, Brasil. Distribuição geográfica no Estado. **Boletín/Dirección de Malariologia y Saneamiento Ambiental**, 35 (supl. 1): 85-100, 1995.

CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNANDEZ, C.T.; TAPIA, F.J.; CÁRCERES-DILMAR, G.; CÁSTES, M.; RONDÓN, A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 87 (4), 444-448, 1993.

CORDOBA-LANNUS, E.; DE GROSSO M.L.; PINEIRO, J.E.; VALLADARES, B.; SALOMON, O.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. **Acta Tropical**, 98: 1-5, 2006.

DA SILVA, O.S. and GRUNEWALD, J. Contribution to the sandfly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, RJ, 94 (5): 579-582, 1999.

DESJEUX, P. Human Leishmaniasis: Epidemiology and Public health aspects. **World Health Statistics Quarterly – Report Trimestriel de Statistiques sanitaires mondiales** 45: 267 – 275, 1992.

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

FIGUEREDO FV, CUNHA AK, GAMA MEA, COSTA JML. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em área endêmica do estado do Maranhão. *In: Resumos do XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* p.43, 1997.

FORATTINI, O.P. Entomologia médica. Ed. Edgard Blucher, p. 658, São Paulo, Brazil, 1973.

FREITAS, R.A.; NAIFF, R.D. AND BARRETT, T.V. Species diversity and flagellate infections in the sandfly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, RJ, 97 (1): 53-59, 2002.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.C.; OSHIRO, E.T.; CRISTALDO, G.; ESPÍDOLA, M.A.; ROCHA, H.C. AND GARCIA, W.B. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 30 (2): 115-128, 1996.

GONTIJO, G.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana: artigo de atualização. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36 (1), 71-80, 2003.

GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ. Município de Parauapebas, 2006. Disponível em: <http://www.pa.gov.br/conhecaopara/parauapebas1.asp>. Acesso em 15 de Junho. 2006.

GRAY, G.C. An epidemic of Oroya fever in the Peruvian Andes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42: 215-221, 1990.

GRIMALDI, G.JR., DAVID JR., McMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by sorodeme analysis using monoclonais antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 36: 270-287. 1987.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**. 6 (3), 230-250, 1993.

ISHIKAWA, E.A.Y.; READY, P.D.; DE SOUZA, A.A.; DAY, J.C.; RANGEL, E.F., DAVIES, C.R.; SHAW, J.J. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazônia and Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, RJ, 94 (3): 339-345, 1999.

KATO, H.; UEZATO, H.; KATAKURA, K.; CALVOPINA, M.; MARCO, J.D.; BARROSO, P.A.; GOMEZ, E.A.; MIMORI, T.; KORENAGA, M.; IWATA, H.; NONAKA, S. and HASHIGUCHI, Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sandflies in the Andean areas of Ecuador by a Polimerase Chain Reaction. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. 72 (1): 87-93, 2005.

LAINSON, R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**; 11(1): 29-40, 1997.

LAINSON, R., SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. Peters W., Killick-Kendrick R., eds. **The leishmaniasis in biology and medicine**, vol. 1. London: Academic Press. 1-28, 1987.

LAINSON, R., SHAW, J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, 44:94-4061 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; SOUZA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 89 (3), 435-443, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. *In*: Topley & Wilson **Microbiology and Microbial Infections**. London: FEG Cox. 242-266, 1997.

LAINSON, R., SHAW, J., MILES, M.A., POVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVII: Enzymatic characterization of a *Leishmania* from the armadillo. *Dasybus novemcinctus* (Edentata), from Pará State. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**. 76: 810-811. 1982.

LAINSON, R. & RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 100 (8): 811-827, 2005.

LAINSON, R.; WARD, R.D. AND SHAW, J.J. *Leishmania* in phlebotomine sandflies. Importance of hindgut development in distinguishing parasites of *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Proceedings of the Royal Society of London Bulletin**, 199, 309-320, 1977.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; WARD, RD. FRAIHA, H. - Leishmaniasis in Brazil. IX Consideration on the *Leishmania braziliensis* complex: importance of sand flies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *L. braziliensis* in north Brazil. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**. 67: 184-194, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; WARD, R.D.; READY, P.D.; NAIFF, R.D. Leishmaniasis in Brazil XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasybus novemcinctus*) and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, 73: 239-242, 1979.

MARFUT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, H.P.D.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. 41 (7), 3147-3153, 2003.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmaniose em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30 (suppl. 1): 162-165, 1997.

- McMAHON-PRATT, D.; DAVID, J.R. Monoclonal antibodies distinguish that between New World species of *Leishmania*. **Nature**, 291: 581-583, 1981.
- McMAHON-PRATT, D.; JAFFE, C.L.; BENNET, E.; DAVID, J.R.; GRIMALDI, G.JR. Studies employing monoclonal antibodies for the analysis of the genus *Leishmania* Ross, 1903. in: *Leishmania* Taxonomie et Phylogegése. **Applications Éco-épidémiologiques. Colloque International**. J.A. Rioux (ed.), 2-6, Montpellier, IMEEE, 1986, 173-178, 1984.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. 5 ed. Brasília. 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF.; 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância em saúde. Tópicos de saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF. 2006.
- MIRANDA, J.C.; REIS, E.; SCHIRLEFER, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97: 185-188, 2002.
- NASCIMENTO J.C.; PAIVA B.R.; MALAFRONTTE, R.S.;FERNADES, W.D. Brief communication. Natural infection of phlebotomines (Díptera: Psychodidae) in a visceral leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 49 (2): 119-122, 2007.
- NEITZKE, H.C.; SCODRO, R.B.L.; CASTRO, K.R.R.; SVERSUTT, A.C.D.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, V. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41 (1): 17-22, 2008.

PANDLEY, K.; PANT, S.; KANBARA, H.; SHUAIBU, M.N.; MALLIK, A.K.; PANDLEY, B.D.; KANEKO, O.; YANAGI, T. Molecular detection of *Leishmania* parasites from whole bodies of sandflies collected in Nepal. **Parasitology Research**, march 2008.

**PEREIRA, Y.N.V.O.; REBELO, J.M.M.; MORAES, J.L.P.; PEREIRA, S.F.R. Diagnostico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por Leishmania sp. na Amazônia Maranhense.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, **39 (6), 2006.**

**PESSÔA, S.B. & COUTINHO, J.O. Infecção natural e experimental dos flebótomos pela Leishmania braziliensis no Estado de São Paulo.** O Hospital, **20: 25-35, 1941.**

**PETER, C.M. Leishmaniasis. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson Textbook of Pediatrics. 16th edn. Philadelphia: WB Saunders; 2000.**

PIMENTA, P.F.; TURCO, S.J.; McCONVILLE, M.J.; LAWYER, P.G.; PERKINS, P.V.; SACKS, D.L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, 256, 1812-1815, 1992.

PINHEIRO, F.G.; LUZ, S.L.B.; FRANCO, A.M.R. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, 38 (1): 165-172, 2008.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R.; SOUZA, A.A.; READY, P. and AZEVEDO, C.R. Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) *sensu lato* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91: 43-50, 1996.

RANGEL, E.F.; COSTA, S.M. *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**, 102 (2): 149-153, 2007.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. Transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: E.F. Rangel, R. Lainson (eds), **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, pág. 231-309, 2003.

READY, P.D.; RIBEIRO, A.L.; LAINSON, R.; DE ALENCAR, J.E.; SHAW, J.J. Presence of *Psychodopygus wellcomei* (Diptera: Psychodidae), a proven vector of *Leishmania braziliensis braziliensis*, in Ceará State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, RJ, 78(2): 235-236, 1983.

READY, P.D.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; WARD, R.D. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. **Bulletim of Entomology Research**. 76: 21-40, 1986.

REBOLLAR-TÉLLEZ, E.; RAMÍREZ-FRAIRE, A.; ANDRADE-NARVAES, F.J. A two years study on vectors of cutaneous leishmaniosis. evidence for Silvatic Transmission cycle in state of Campeche, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91: 555-560, 1996.

RYAN L, LAINSON R, SHAW JJ. 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 Royal Society Tropical Medicine and Hygiene.**; 81 (3): 353-359, 1987.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**; 1 (4), 383-395. 1987.

REBÊLO JMM (b). Flebótomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de Saúde) São Luis: Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde; 1999.

RODRIGUEZ, N.; GUZMAN B.; RODAS, A. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, 9: 2246-2252, 1999.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1261 – 1401, 1903.

SANCHEZ, J.M.; GALLEGO, M.; BARÓN, S.; CASTILLEJO, S.; MARQUEZ, F.M. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidea). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 100: 527-532, 2006.

SANTAMARÍA, E.; PONCE, N.; PUERTA, C. AND FERRO, C. Validación de la PCR en la detección de parásitos de *Leishmania (Viannia) spp.* en *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) como herramienta en la definición de especies vectores. **Biomédica**, 25:271-279, 2005.

SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.Y.; LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 83: 783-784, 1989.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: Present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 89: 471-478, 1994.

SILVA, J.G.D.; WERNECK, G.L.; CRUZ, M.S.P.; COSTA, C.H.N. AND MENDONÇA, I.L. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania sp.* em Teresina, Piauí, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, RJ, 23 (7): 1715-1720, 2007.

SHERLOCK, I.A. Importância Médico – Veterinária. A importância dos flebotomíneos. In: E.F. Rangel, R. Lainson (eds), **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, pág. 15-22, 2003.

SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., SHAW, J., SOUZA, A.A., ISHIKAWA, E.A.Y., BRAGA, R.R. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in

Amazonian, Brazil and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**. 85: 735-738, 1991.

SILVEIRA, F.T., SHAW, J.J., BICHARA, C.N., COSTA, J.M.L. Leishmaniose Visceral Americana in: LEÃO, RNO (coord.). **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém, CEJUP/ UEPA/ Instituto Evandro Chagas, 631-944. 1997.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A.Y., DE SOUZA, A.A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**. 9: 43-50. 2002.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonia Brazil – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99 (3), 239-251, 2004.

SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – RELATÓRIO DE SITUAÇÃO PARÁ, **Ministério da Saúde**, Brasília – DF, 2005.

WARD RD, SHAW JJ, LAINSON R, FRAIHA H. Leishmaniasis in Brazil VIII. Observations on the phlebotomine fauna of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis, in the Serra dos Carajas, Pará State. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**; 67 (2): 174-183. 1973.

WHO (1990). *Control of Leishmanioses. Report of a WHO Expert Committee*. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, no. 793.

WILLIAMS, P. Psychodidae. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. 10ed. São Paulo: Atheneu, p.311-319. 2003.

YOUNG, D.G. & DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies Central and South America (Diptera, Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, 54: p. 1-881, 1994.

## APÊNDICE

### **I - Solução para Trituração:**

10X solução de trituração (0,1M Tris/ 0,6M NaCl/ 0,1 M EDTA)

20X Espermina/Espermidina (3 mM Espermidina/ 3 mM Espermina)

10% Sucrose

### **II - Solução de SDS**

2X SDS Tampão (0,8 M Tris/ 0,27 M EDTA)

10% SDS

10% Sucrose

Dietilpirocarbonato.(0,34 %)

### **III - Solução TE pH 8,0**

10mM Tris HCl

1mM EDTA

### **IV - Tampão TAE**

40 mM Tris-acetado

1 mM EDTA

## ANEXO 1

<i>Nº</i> <i>Amostra</i>	<i>Nº</i> <i>Excursão</i>	<i>Data de</i> <i>Coleta</i>	<i>Ecótopo</i>	<i>Flebotomíneos</i> <i>(espécies)</i>	<i>Nº testados (+)</i>	<i>Leishmania</i>	
						<i>Viannia</i>	<i>Leishmania</i>
T4	1º	04.12.05	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	2 (1)	1	-
T5	1º	05.12.05	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	8 (1)	1	-
T6	1º	05.12.05	Tapirapé Aquiri	<i>Lu. Shawi</i>	10(1)	1	-
T11	1º	06.12.05	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	3 (2)	1	1
T23	1º	09.12.05	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	2 (1)	1	-
T26	1º	09.12.05	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	6 (1)	1	-
T32	1º	10.12.05	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	8 (1)	1	-
T50	1º	14.12.05	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	13(1)	1	-
T57	1º	14.12.05	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	28(3)	3	-
T62	1º	15.12.05	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	13(1)	1	-
T67	1º	16.12.05	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	9 (1)	1	-
T97	2º	17.03.06	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	3 (2)	2	-
T79	2º	11.03.06	Parq.Zoob.Quarentena	<i>Ps. w/c</i>	7 (3)	3	-
T86	2º	13.03.06	Parq.Zoob.Quarentena	<i>Ps. w/c</i>	6 (2)	2	-
T89	2º	14.03.06	Parq.Zoob.Quarentena	<i>Ps. w/c</i>	10(3)	3	-
T23	3º	15.06.06	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	5 (1)	1	-
T195	4º	09.02.07	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	1 (1)	1	-
T209	4º	20.02.07	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	2 (1)	-	1
T210	4º	21.02.07	APA do Gelado	<i>Ps. w/c</i>	2 (1)	1	-
T154	5º	03.05.07	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	4 (1)	1	-
T275	6º	05.07.07	Tapirapé Aquiri	<i>Ps. w/c</i>	1 (1)	1	-
T289	7º	31.03.08	APA do Gelado	<i>Lu. Whitmani</i>	10 (1)	1	-
T291	7º	31.03.08	APA do Gelado	<i>Lu. Whitmani</i>	10 (1)	1	-
T292	7º	31.03.08	APA do Gelado	<i>Lu. Whitmani</i>	10 (1)	1	-
<b>Total</b>					<b>550 (36)</b>	<b>34</b>	<b>2</b>