

DAVI MARCOS SOUZA DE OLIVEIRA

DISTRIBUIÇÃO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA (Díptera: Psychodidae) AO
LONGO DE UM GRADIENTE RURAL-URBANO EM ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE BARCARENA-PA, BRASIL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de
Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Prof. Dra. Edilene Oliveira da Silva
 Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará

Co-orientadora: Prof. Dra. Ivoneide Maria da Silva
 Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Elvira Saraiva
Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes
Dpto. de Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Inocêncio de Sousa Gorayeb
Dpto. de Zoologia do Museu Paraense Emílio Goeldi

Prof. Dra. Marinete Marins Póvoa
Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas

Prof. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa
Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará
(suplente)

Belém, 30 de setembro de 2009

“Erros são, no final das contas,
fundamentos da verdade. Se um homem
não sabe o que uma coisa é, já é um
avanço do conhecimento saber o que ela não é.”

Carl Jung – Psicólogo Suíço

*A minha esposa Eleomira Oliveira e ao meu filho Victor
que me apoiaram desde o início
Aos meus pais Mário e Dulcelina.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido iniciar e terminar este trabalho;

A minha orientadora, Profa. Dra. Edilene Oliveira, por me orientar e acreditar que eu seria capaz;

A minha co-orientadora Profa. Dra. Ivoneide Silva pela maneira dedicada, incansável e acima de tudo amigável de me orientar;

A Profa.Dra. Edna Ishikawa do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) que não só me acolheu em seu laboratório, mas também me orientou durante as análises moleculares;

Ao Dr. Adelson Almeida de Souza do Instituto Evandro Chagas (IEC) por dar todo apoio necessário para a realização deste trabalho;

Aos Professores Dr. Antônio Carlos Vallinoto e Dr. Luís Fernando por estarem sempre dispostos a me ajudar enquanto coordenadores do programa;

A Profa. Dra. Elvira Saraiva do Inst. De Microbiologia Dr. Paulo Góes (UFRJ) por ter colaborado com a realização deste trabalho;

A todos os meus professores que ajudaram a ampliar meu conhecimento científico;

Ao Andrey Andrade da UFMG por me orientar a distância;

Aos técnicos do Laboratório de Leishmaniose do IEC pelo suporte dado;

Ao técnico Hamilton Antônio Monteiro do IEC que sempre se dispôs a ajudar no que fosse preciso;

A Ana de Nazaré do NMT por me ajudar com tanta dedicação a realizar as análises moleculares;

Ao meu sogro Jovino das Mercês e a minha sogra Maria Celina das Mercês por toda ajuda dada durante o trabalho;

A Universidade Federal do Pará (UFPA) por oferecer o Programa de Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários e por disponibilizar os laboratórios para realização dos trabalhos;

Ao Instituto Evandro Chagas por disponibilizar o laboratório e mão de obra especializada;

Ao Núcleo de Medicina Tropical da UFPA por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular;

A Secretaria de Estado de Educação por ter me liberado de sala de aula e por ofertar a bolsa-mestrado;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) por ter financiado a pesquisa;

A Secretaria de Saúde Pública de Barcarena por ter fornecido alojamento e transporte durante a pesquisa.

SUMÁRIO	Página
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVEATURAS	10
RESUMO	11
<i>ABSTRACT</i>	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 LEISHMANIOSES	13
1.2 VETORES	21
1.3 CONTROLE	27
1.4 DEGRADAÇÃO AMBIENTAL E LEISHMANIOSE	28
1.5 TAXA DE INFECÇÃO NATURAL	32
1.6 JUSTIFICATIVA	34
1.7 OBJETIVO GERAL	35
1.7.1 Objetivos Específicos	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 ÁREA DE ESTUDO	35
2.1.1 Áreas de Coleta	37
2.2 COLETA DOS FLEBOTOMÍNEOS	42
2.3 DEFINIÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO NATURAL DE <i>Lutzomyia</i> <i>(Lutzomyia) longipalpis</i>	46
2.3.1 Análise Microscópica	46
2.3.2 Análise Molecular	47
2.4 VIABILIDADE DOS PROCEDIMENTOS DE DISSECAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS	50

2.5 LEVANTAMENTO DOS DADOS DE LV EM BARCARENA	51
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
3 RESULTADOS	53
3.1 CAPTURA DOS FLEBOTOMÍNEOS	53
3.2 EXPERIMENTO COM <i>L. (L.) longipalpis</i> ARTIFICIALMENTE INFECTADAS	57
3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA	58
3.4 ANÁLISE MOLECULAR	58
3.5 LEVANTAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LV EM BARCARENA-PA	60
4 DISCUSSÃO	65
4.1 CAPTURA DOS FLEBOTOMÍNEOS	65
4.2 TAXA DE INFECÇÃO	77
4.3 DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LV NO MUNICÍPIO DE BARCARENA-PA	79
5 CONCLUSÃO	83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1	Distribuição dos casos de LV nos estados da na região Norte nos anos de 1990 e 2008.	20
Figura 2	Casos de LV em Barcarena-PA entre os anos de 2000 a 2008.	21
Figura 3	Mapa do Estado do Pará destacando a localização do município de Barcarena-PA	36
Figura 4	Fotos caracterizando as áreas de coleta do primeiro transecto	40
Figura 5	Fotos caracterizando as áreas de coleta do segundo transecto	41
Figura 6	Foto por satélite mostrando as áreas de coleta de flebotomíneos no município de Barcarena-PA	42
Figura 7	Armadilha CDC (modelo HP) instalada em galinheiro.	44
Figura 8	Retirada dos flebotomíneos no campo usando aspirador de Castro.	45
Figura 9	Dimorfismo sexual em flebotomíneos.	46
Figura 10	Gel de agarose mostrando produtos da PCR após amplificação de DNA de Flebotomíneos com <i>primers</i> gênero-específicos.	59
Figura 11	Mapa do Município de Barcarena-PA mostrando os locais de ocorrência de LV entre 2000-2008.	61
Figura 12	Casos de LV em Barcarena-PA em ambos os sexos entre os anos de 2000 a 2008.	63

- Figura 13** Casos de LV em Barcarena-Pa, por faixa etária, entre os anos de 2000 a 2008. 64
- Figura 14** Casos de LV em Barcarena-PA, por faixa etária, em ambos os sexos entre os anos de 2000 a 2008. 64

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CDI	Companhia de Desenvolvimento Industrial
DMSO	Dimetil Sufóxido
dNTP	Desoxinucleotídeos Trifosfato
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
PVC	Poli Cloreto de Vinila
SESPA	Secretaria de Estado de Saúde Pública
SVS	Sistema de Vigilância Sanitária
TBE	Trizma-base, Ácido Bórico, EDTA
TE	Trizma-base, EDTA
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Com o objetivo de se avaliar a urbanização de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, no município de Barcarena-Pará, Brasil, foram realizadas capturas de flebotomíneos utilizando-se armadilhas luminosas CDC. As capturas ocorreram em área de mata, borda de mata, área intermediária e área urbana. Foram capturados 5.089 espécimes de flebotomíneos, entre os anos de 2007 a 2009, pertencentes a 11 espécies. *L. (L.) longipalpis* foi a espécie mais abundante (95,15%) seguida de *Lutzomyia (Sciopemyia) sordellii* (2,06%) e de *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (1,76%). Foi observado que 88,25% dos espécimes capturados foram oriundos de área de borda de mata pertencente à invasão antiga. Contudo, o vetor do agente etiológico da Leishmaniose Visceral não foi encontrado na área urbana de Barcarena. Foi verificada a taxa de infecção natural através de análises microscópica e molecular - reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). Os resultados foram negativos para ambas as análises sugerindo baixa taxa de infecção nas áreas pesquisadas. Neste trabalho, também foi realizado um levantamento da distribuição dos casos de leishmaniose visceral no período de 2000 a 2008 no município de Barcarena. A faixa etária mais afetada foi de crianças entre 0 a 12 anos (161). O sexo masculino prevaleceu entre os indivíduos afetados sendo a diferença significativa ($p < 0,05$) nas faixas etárias de 13 a 58 anos sugerindo que a doença está relacionada à ocupação dos indivíduos.

ABSTRACT

*The aim of this study was to verify the urbanization of **Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis** in the municipality of Barcarena-PA, Brazil. Systematic captures of phlebotomines were performed using CDC light traps. The captures were carried out in areas of forest, edge of forest, intermediate area and urban area, from 2007 to 2009. A total of 5,089 specimens belonging to eleven species were collected, with predominance of **L. (L.) longipalpis** (95.15%), **Lutzomyia (Sciopemyia) sordellii** (2.06%) and **Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata** (1,76%). The highest population densities (88.25%) were from edge of forest belonging to a locality occupied about ten years. However, the visceral leishmaniasis vector was not captured in urban area, suggesting it has not been urbanized in Barcarena yet. For the diagnosis of infection rate, the microscope analysis and polymerase chain reaction (PCR) were performed. The microscope and molecular analysis were negative which suggest low rate infection in the researched areas. An investigation of Visceral Leishmaniasis cases was performed in the period from 2000 to 2008 in Barcarena. The most cases of Visceral Leishmaniasis notified (161) were in the age group of 0 to 12 years old. Males were the most affected individuals ($p < 0,05$) in the age group of 13 to 58 years suggesting the disease is linked to type of affected individuals activity.*

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecciosas consideradas primordialmente como zoonoses. No entanto, podem ser classificadas como antropozoonoses quando o homem participa do ciclo biológico do parasito (Bañuls *et al.*, 2007). Essas enfermidades são transmitidas por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), hospedeiros naturais dos agentes etiológicos, protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Bañuls *et al.*, 2007). As leishmanias são parasitos obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear. Apresentam duas formas evolutivas, uma forma flagelar denominada promastigota, encontrada no tubo digestivo do flebotomíneo, e uma forma amastigota, que infecta as células fagocitárias no hospedeiro vertebrado (Chappuis *et al.*, 2007).

As leishmanioses são, depois da malária, as doenças causadas por protozoários que mais afeta as populações, sendo que o número de infecções no mundo inteiro, chega a 12 milhões. Esta enfermidade atinge 88 países sendo a maioria dos casos em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano surgem 2 milhões de novos casos, sendo 1,5 milhão por leishmaniose cutânea e 500.000 pela forma visceral (WHO, 2007). Estima-se que no mundo inteiro ocorram 59.000 mortes por ano causadas pela LV (Dujardin, 2006).

Nas Américas, as leishmanioses podem ser classificadas em dois grupos principais, Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). A LTA é transmitida por várias espécies de flebotomíneos e pode variar na sintomatologia e no desenvolvimento patológico dependendo do agente etiológico (Chappuis *et al.*, 2007). As formas clínicas desse primeiro grupo são a leishmaniose cutânea e a leishmaniose cutâneo-mucosa. Na forma cutânea, o paciente apresenta uma ou várias úlceras na pele que podem ser auto-cicatrizantes dependendo do estado nutricional e imunológico. A leishmaniose cutâneo-mucosa se caracteriza por ulcerações ao nível da mucosa nasal e oral com destruição progressiva de cartilagem, podendo atingir inclusive a laringe e a faringe (Chappuis *et al.*, 2007). No Brasil, as espécies de parasitos envolvidos com a patogenia das LTA são a *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e a *L. (Leishmania) amazonensis*. Além das espécies citadas, há outras de menor importância médico-epidemiológica, como *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) lindenbergi* e *L. (Viannia) shawi* (Killick-Kendrick, 1990).

A LV é uma doença sistêmica, crônica que atinge principalmente crianças até dez anos de idade. Essa doença evolui para óbito na maioria dos casos quando não é diagnosticada e tratada a tempo. Quanto ao modo de transmissão, a doença pode ser dividida em LV zoonótica quando a transmissão ocorre de um animal para um vetor e deste para uma pessoa; e antroponótica quando a via de transmissão ocorre de uma pessoa para um vetor e deste para outra pessoa (Chappuis *et al.*, 2007).

O agente etiológico da LV no Novo Mundo é a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937 (Pimenta *et al.*, 2003). Este parasito apresenta duas formas evolutivas, uma forma flagelar alongada denominada promastigota e uma forma ovóide sem flagelo aparente denominada amastigota. A forma promastigota é encontrada no tubo digestivo do flebotomíneo enquanto que a forma amastigota parasita as células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos.

O ciclo biológico do parasito no flebotomíneo inicia quando a fêmea realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado infectado. Ao sugar o sangue, o inseto ingere macrófagos infectados com a forma amastigota. Cerca de 12 a 20 horas após o repasto sanguíneo, o parasito sofre um alongamento do corpo celular passando para a forma promastigota que após sofrer sucessivas divisões binárias, migram para porção anterior do intestino do flebotomíneo. O ciclo no hospedeiro vertebrado inicia quando o flebotomíneo fêmea infectado realiza o repasto sanguíneo e regurgita as promastigotas no local da hematofagia. O parasito atinge a corrente sanguínea e adere à membrana celular dos macrófagos e em seguida sofre endocitose localizando-se no interior de um vacúolo onde passa para a forma amastigota. Após essa etapa, as amastigotas se dividem várias vezes rompendo os macrófagos e infectando outras células.

Os reservatórios desse parasito e a fonte de infecção para o vetor no ambiente natural, são mamíferos como raposas (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*) e marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*). Embora tenha se observado a presença de marsupiais em áreas metropolitanas, não

se pode afirmar qual o papel epidemiológico desses animais como reservatórios na leishmaniose visceral urbana (Brasil, 2006; Diniz *et. al*, 2008).

Os cães (*Canis familiaris*) são as principais fontes de infecção no ambiente urbano, no domicílio e no peridomicílio (Dantas-Torres, 2007). Além disso, os cães podem estar relacionados à introdução do parasito na região Amazônica, pois é possível que com o advento da construção das rodovias que ligam Belém a Brasília e Fortaleza e conseqüente processo migratório de pessoas da região Nordeste e Sudeste nas décadas de 60 e 70, cães infectados com o parasito tenham sido introduzidos na região Amazônica (Lainson & Rangel, 2003). Essa dinâmica do processo migratório que permite a introdução de cães infectados transportados de áreas endêmicas para áreas indenes continua ocorrendo. Pesquisa realizada no município de São José do Rio Preto (SP), região não endêmica para LV, registrou a presença de um cão infectado com *Leishmania* sp. proveniente de região endêmica de Belo Horizonte (MG) (Savani *et al.*, 2003).

A importância epidemiológica dos cães como reservatórios urbanos da LV foi evidenciada em Belo Horizonte, uma vez que casos de leishmaniose canina precederam os casos humanos (WHO, 2002). Há cidades que registram casos de leishmaniose visceral canina, contudo não foram registrados casos da doença e nem a presença do vetor *L.longipalpis*. Essas características da epidemiologia da doença podem estar relacionadas com o processo migratório em que os cães foram transportados por seus donos de regiões endêmicas para áreas não endêmicas. Por exemplo, o município de São Vicente Férrer (PE), não havia registrado a presença de *L. (L.) longipalpis*

e nem de casos autóctones de LVH até 2005, porém após análise de testes sorológicos para leishmaniose em cães, foram detectados 12% de positividade (Silva & Braga, 2008). Outro aspecto importante a ser considerado são as pequenas migrações dos cães em busca de alimento ou parceiros para acasalamento, fato que permite ao animal se infectar quando entra em área endêmica (Souza *et al.*, 2009).

A sintomatologia da LVC canina é caracteristicamente definida com perda progressiva de peso, queda dos pêlos, crescimento irregular das unhas (grifose), aparecimento de lesões nas pontas das orelhas e no focinho, febre irregular de longo curso e eventuais episódios de diarreia. Entretanto, há situações em que o animal permanece assintomático podendo inclusive progredir para cura espontânea (Marzochi, *et al.*, 1985; Krauspenhar, *et al.*, 2007). A condição assintomática dos cães tem grande importância epidemiológica uma vez que esses cães são fontes de infecção para os seres humanos e para outros cães não infectados que podem se infectar através do coito, da ingestão de carrapatos ou durante uma briga entre esses animais (Marzochi *et al.*, 1985).

O papel do gato doméstico (*Felis catus*) como reservatório não está bem definido apesar de já se ter encontrado esse animal naturalmente infectado com *L. (L.) i. chagasi* em Cotia, SP (Savani *et al.*, 2004).

O principal vetor desse parasito no Brasil é o flebotômio da espécie *L. (Lutzomyia) longipalpis* Lutz e Neiva, 1942. Essa espécie tem habitat preferencialmente silvestre, contudo está se urbanizando em consequência das ações antrópicas sobre o ambiente (Lainson & Rangel, 2003).

Os primeiros casos registrados de LV ocorreram na Índia em 1885. Na América do Sul, mais especificamente no Paraguai, o primeiro caso relatado por Migone, ocorreu em 1913. No Brasil, o primeiro relato foi feito por Penna (1934), ao examinar lâminas preparadas a partir de fígado de indivíduos, *post-mortem*, oriundos do Norte e do Nordeste (Lainson & Rangel, 2005).

No Brasil, os números de casos de LV, no ano 1990 e 2008, aumentaram nas regiões Norte, Sul e Centro-oeste. Em 2008, a região Nordeste apresentou o maior número de casos de LV (670), seguida pelas regiões Norte e Sudeste com 440 e 390 casos, respectivamente (Brasil, 2008).

Embora seja considerada uma doença restrita à zona rural, a LV tem sofrido processo de urbanização em vários municípios brasileiros de médio e grande porte (Dujardin, 2006). São exemplos, Santarém (PA), Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), Cuiabá (MT), (Brasil, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007) e mais recentemente foi diagnosticado o primeiro caso autóctone de LV na cidade de Uberlândia em Minas Gerais (De Paula *et al.*, 2008).

A urbanização da doença está relacionada com uma série de fatores dentre os quais, a migração de pessoas para a periferia das cidades, problemas sócio-econômicos e o desmatamento para fins comerciais (Ximenes *et al.*, 2007).

No estado de Minas Gerais, os casos de LV não se concentram apenas na capital, mas também em 15 outros municípios considerados como centros urbanos (LUZ *et al.*, 2001).

No ano de 2001, no bairro Santa Rita, Campo Grande (MS), que sofreu intenso desmatamento durante o processo de urbanização, foram registrados vários casos de leishmaniose visceral nos anos seguintes. Após o processo de desmatamento, animais silvestres como gambás, raposas e tatus foram vistos por moradores circulando livremente pelas ruas (Oliveira A. L. *et al.*, 2006).

Em Teresina, PI, ocorreu uma epidemia de LV durante os anos de 1981 a 1985 que re-emergiu durante 1992 a 1994 somando mais de 1000 casos da doença em menos de um ano (WHO, 2002).

Atualmente a LV tem ocorrido de forma epidêmica nos seguintes municípios: Araçatuba em SP, Belo Horizonte e Porteirinha em MG, Três Lagoas e Campo Grande no MS e em Palmas no TO (Andrade-Filho, *et al.*, 2001; Barata, *et al.*, 2004; Silva E. *et al.*, 2007).

Os casos de LV em Belo Horizonte, que já ocorrem de forma epidêmica desde 1993, provavelmente foram importados de pequenas cidades no entorno da capital. Entre 1994 a 1999 ocorreram 345 casos dos quais 65% foram autóctones (WHO, 2002).

Na região Norte, os casos de leishmaniose visceral têm aumentado, principalmente nos Estados do Pará, Tocantins, Roraima e Amapá (Brasil, 2008). Houve um aumento de 26,03% dos casos de LV na região Norte, no período de 1990 a 2008 sendo que, no estado do Pará, esse aumento foi muito expressivo (527%) (Figura 1).

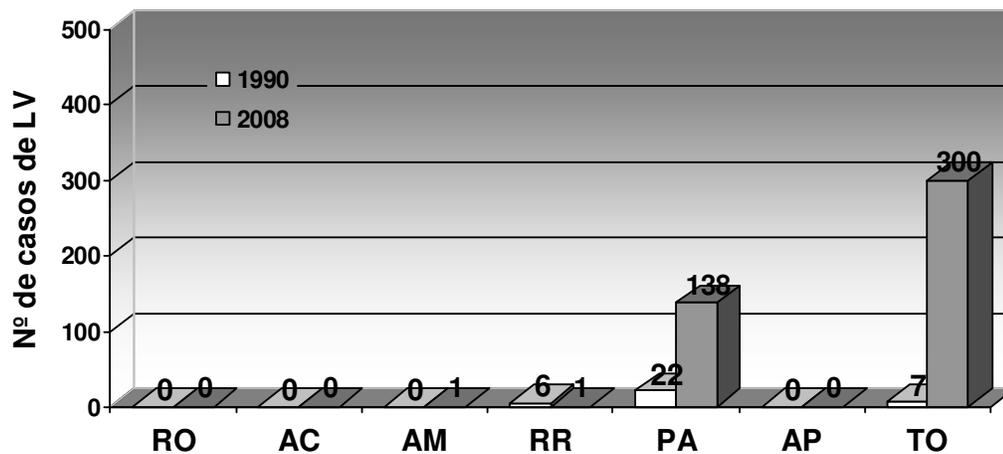


Figura 1 – Distribuição dos casos de LV nos estados da região Norte nos anos de 1990 e 2008. (Fonte: Sinavan/SVS/MS)

Barcarena (PA) é um dos municípios em que houve uma oscilação do número de caso de LV no período entre 2000 a 2008, com aumento expressivo entre 2003 e 2006 (Figura 2).

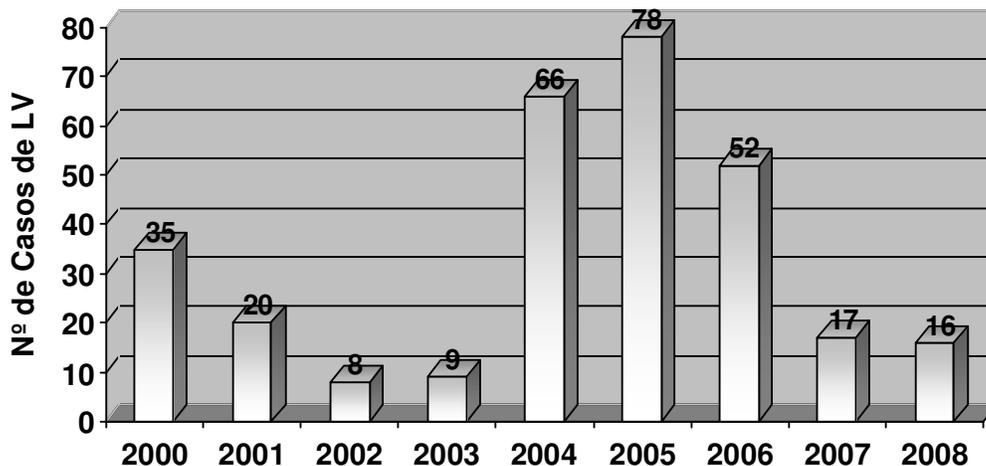


Figura 2 – Casos de LV em Barcarena-PA entre os anos de 2000 a 2008.
Fonte: SESPA

Vários fatores têm contribuído para o aumento no número de casos no Brasil. O desmatamento, a urbanização com ocupação de áreas sem a menor infra-estrutura e as baixas condições nutricionais da população, podem ser apontados como os fatores preponderantes (WHO, 2008).

1.2 VETORES

Os insetos transmissores das leishmanioses são flebotomíneos cujo comprimento do corpo piloso, varia entre 2 a 4 mm. Os flebotomíneos do Novo Mundo pertencem a Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae, Gêneros: *Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França e Parrot, 1921; *Warileya* Hertig, 1948 e *Hertigia* Fairchild, 1949, sendo que apenas o gênero *Lutzomyia* apresenta espécies de interesse médico para a transmissão das leishmanioses (Rangel & Lainson, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007).

Os flebotomíneos apresentam desenvolvimento completo compreendendo as fases de ovo, larvas, pupa e adulto. Os ovos são elípticos, alongados ou um pouco encurvados medindo 300 a 500 μm de comprimento. Têm coloração clara logo após a oviposição, e escura após algumas horas. As larvas, que passam por quatro estádios, são claras e vermiformes, bastante ativas e com peças bucais mastigadoras (Marcondes, 2001). A pupa, ao contrário da larva, não se alimenta nem se locomove. Esta fase evolutiva libera uma substância que permite a ela aderir ao substrato onde termina seu desenvolvimento. O corpo da pupa é dividido em cefalotórax, com duas asas pouco desenvolvidas, e abdome. Os adultos quando se encontram em repouso, mantêm as asas em posição característica semi-eretas em relação ao corpo. Machos e fêmeas apresentam nítido dimorfismo sexual sendo que a distinção entre os sexos é feita com base, principalmente, na genitália masculina constituída por estruturas em forma de ganchos que se exteriorizam no final do abdome. O abdome da fêmea tem aspecto mais robusto e com cerdas pouco desenvolvidas (Marcondes, 2001).

A distribuição geográfica dos vetores se estende por toda região neotropical do México à Argentina. No Brasil, essa distribuição é muito ampla, pois abrange as regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (Marcondes, 2001).

Dependendo da região, podem apresentar diferentes nomes vulgares como “fleboti”, “birigui”, “mosquito-palha”, “cangalhinha” ou “tatuqueira” (Tormen & Nascimento, 2006). O habitat da *L. (L.) longipalpis* era, primordialmente silvestre, podendo ser capturado no interior da floresta, em localidades onde

não havia ação antrópica. Todavia, verifica-se a presença desse vetor nos domicílios e peridomicílios: casas de cães, galinheiros e chiqueiros ao longo das estradas que cortam a floresta (Lainson & Rangel, 2005; Silva, E. *et al.*, 2007; Dias, *et al.*, 2007). O habitat, preferencialmente florestal, de *L. (L.) longipalpis* foi confirmado por Missawa & Maciel (2006), em uma pesquisa realizada no estado de Mato Grosso. Os autores constataram que a maioria dos espécimes capturados pertencia a municípios que apresentam bioma com floresta Amazônica.

Em trabalho realizado em Minas Gerais, entre outubro de 1997 a setembro de 1999, foi verificado que a maior quantidade de *L. (L.) longipalpis* capturada (55%) foi oriunda do intradomicílio (Resende *et al.*, 2006). Contudo, outros autores apontaram o ambiente peridomiciliar como o de maior frequência dessa espécie, possivelmente por ser o de mais fácil adaptação (Barata *et al.*, 2005; Oliveira A.G. *et al.*, 2006). Essa versatilidade, no que diz respeito à adaptação a novos ambientes, pode ser explicada pelo hábito alimentar eclético da espécie. O *L. (L.) longipalpis* pode usar como fonte de alimento o homem, animais domesticados como cães, cabras, eqüinos, suínos, bovinos e galinhas, além de animais silvestres como as raposas, roedores e gambás (Lima *et al.*, 2003). Estudos utilizando precipitina para analisar o conteúdo intestinal do vetor mostraram que dentre esses vertebrados, as aves seguidas do homem e do cão são as mais procuradas pelo *L. (L.) longipalpis* para o repasto sanguíneo (Dias *et al.*, 2003; Barata *et al.*, 2005). Embora as aves sejam refratárias à infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, desempenham um papel atrativo para o vetor. Portanto, têm grande importância

epidemiológica na manutenção da LV considerando que o vetor, ao circular no peridomicílio, atraídos por esses animais, entra em contato com reservatórios como os cães (Dias *et al.*, 2003).

Com relação à sazonalidade, *L. (L.) longipalpis* apresentou alta densidade populacional no período de maior pluviosidade, (de outubro a abril de 2005) em trabalho realizado no Estado de Mato Grosso do Sul (Silva E. *et al.*, 2007). Grande abundância dessa espécie no período de maior pluviosidade também foi verificado por Oliveira A. G. *et al.* (2008). Os autores realizaram capturas de flebotomíneos utilizando armadilha luminosa CDC em sete ambientes incluindo área de mata e de peridomicílio. Barros *et al.* (2000), em estudo realizado em Paço do Lumiar (MA), capturaram 94,6% de *L. (L.) longipalpis* entre os meses de janeiro a junho, período corresponde ao de maior pluviosidade.

Além de *L. (L.) longipalpis*, outras espécies também são apontadas como possíveis vetores da LV. Dentre elas, *Lutzomyia cruzi* Mangabeira, 1983, considerada a segunda espécie mais importante devido ao seu hábito alimentar e antropofilia. As fêmeas de *L. (L.) longipalpis* e *L. cruzi* são morfologicamente indistinguíveis. A distinção entre essas duas espécies é feita com base apenas nas diferenças morfológicas dos machos (Martins *et al.*, 1984).

Durante trabalho realizado nas cidades de Corumbá e Ladário (MS) entre os anos de 1995 a 1996, foram encontradas 14 fêmeas de *L. cruzi* infectadas com a forma promastigota de *L.(L.) i. chagasi*. Contudo, não foram capturados machos de *L. (L.) longipalpis*, apenas de *L. cruzi*. Logo, os autores

concluíram que *L. cruzi* é o vetor desse parasito no MS (Santos *et al.*, 1998). Entretanto, Santos *et al.* (2003), capturaram *L. (L.) longipalpis* em Corumbá. Essa espécie também foi encontrada em vários municípios do Estado de Mato Grosso. Contudo, Missawa & Maciel (2006), capturaram *L. cruzi* em 22 municípios dos 139 pertencentes ao Estado de Mato Grosso onde há registro de LV. Recentemente, Missawa *et al.* (2006) evidenciaram a transmissão de LV por *L. cruzi* no município de Jaciara, MT. Apesar de a espécie ter sido capturada em ambientes florestais, o bioma com maior ocorrência desse vetor foi o pantanal (80%) (Missawa & Maciel, 2006).

Na década de 90, foi observado que 87% dos flebotomíneos capturados em uma área endêmica de LV na Colômbia pertenciam à espécie *L. evansi* e que um dos espécimes capturados estava infectado com *Leishmania (L.) i. chagasi* (Rangel & Lainson, 2003). *L. intermedia* compartilha algumas características epidemiológicas importantes com o *L. (L.) longipalpis*, entre as quais, a antropofilia e o hábito alimentar, sendo o cão uma das fontes de alimento. Essas semelhanças sugerem que essa espécie possa ser transmissora alternativa de *L.(L.) i. chagasi* (Lainson & Rangel, 2003).

As espécies *L. (Nyssomyia) flaviscutellata* Mangabeira, 1924 e *L. (Viannamyia) furcata* Mangabeira, 1941 apresentam características comportamentais que as tornam possíveis vetores de *L. (L.) infantum chagasi*. A espécie *L. (N.) flaviscutellata* por circular nas proximidades de casas localizadas em ambientes florestais degradados e ser atraída por vertebrados como marsupiais (*Didelphis*) que também podem ser fonte alimentar do *L. (L.) longipalpis* (Lainson & Shaw, 1968). Embora a espécie *L. (N.) flaviscutellata* só

tenha sido encontrada em bioma amazônico e de cerrado de Mato Grosso, durante uma pesquisa de distribuição de flebotomíneos no Estado entre 1996 e 2001, há relatos da presença dessa espécie em áreas urbanas de Cuiabá (Ribeiro *et al.*, 2007). A espécie *L. (V.) furcata* embora não seja antropófila, alimenta-se de várias espécies de mamíferos, inclusive de cães. Portanto, pode ter um papel importante na manutenção de infecção por *L.(L.) i. chagasi* entre esses mamíferos (Rangel & Lainson, 2003).

Exemplares da espécie *Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi* Coutinho, 1939 capturados na Ilha do Marajó-Pa em uma área endêmica para LV, encontravam-se intensamente infectados com a forma promastigota de *Leishmania sp.* A posição suprapilórica do parasito no inseto, sugeriu aos pesquisadores tratar-se de *L. (L.) i. chagasi*. A localização do parasito assim como a característica endêmica da área levantou a hipótese de *L. antunesi* estar atuando como vetor alternativo do parasito (Ryan *et al.*, 1984).

Durante trabalho de captura de flebotomíneos no Rio de Janeiro entre 1996 a 1999, a espécie *L. (L.) longipalpis* não foi encontrada em seis bairros do município considerados endêmicos para LV. As suspeitas de transmissão recaíram sobre *L. migonei* e *L. firmatoi* por apresentarem grau de parentesco próximo ao do subgênero *Lutzomyia* (Souza *et al.*, 2003). Recentemente, infecção natural por *L. (L.) i. chagasi*, foi detectada pela primeira vez na espécie *Lutzomyia forattinii* através da técnica de PCR em Mato Grosso do Sul, demonstrando que esta espécie pode ter um papel importante na transmissão do parasito (Pita-Pereira *et al.*, 2008).

1.3 CONTROLE

As ações de controle da leishmaniose visceral enfocam, além do diagnóstico precoce, tratamento dos pacientes, eliminação dos cães infectados e o combate ao vetor. O controle do flebotomíneo pode ser feito utilizando-se inseticidas, por exemplo, Cipermetrina ou Deltametrina. Contudo, esse meio não tem sido eficaz por várias razões, dentre elas, o fato de não se usar o inseticida em abrigos de animais domésticos como cães e galinhas e, também pela resistência dos moradores em permitir a borrifação no domicílio e peridomicílio. Além disso, alguns inseticidas como o DDT e os inseticidas organofosforados e carbamatos oferecem riscos de contaminação para o ambiente e para homem respectivamente (Tauil, 2006).

Em estudo sobre o controle da leishmaniose visceral em meio urbano realizado em Teresina (PI), os autores concluíram que a redução da infecção foi 80% mais eficiente quando a medida de controle utilizada em algumas áreas foi a eliminação canina em comparação a áreas que receberam apenas a aplicação intradomiciliar de inseticidas (Costa C. *et al.*, 2007).

O controle biológico poderia ser uma alternativa, considerando que alguns microrganismos como fungos e protozoários parasitam os insetos vetores (Dougherty & Ward, 1991). Contudo, não se sabe que eficiência esse método teria em ambiente natural (Rangel & Lainson, 2003).

A prevenção contra a LV pode ser feita através do uso de coleiras impregnadas com inseticidas, que embora tenha custo elevado, os resultados são positivos (Killick-Kendrick *et al.*, 1997).

A vacinação canina é outra medida preventiva que têm mostrado resultados promissores. Desde 2004 a vacina Leishmune[®] tem sido usada na prevenção da propagação da LVC e da LVH. Essa vacina, utilizada em cães, atua dificultando a fixação do parasito ao epitélio intestinal do vetor, portanto bloqueia o processo de transmissão do parasito. Palatnik-de-Sousa *et al.* (2009) realizaram trabalho que descreveu o efeito da Leishmune[®] como uso profilático em cães e acompanharam o decréscimo dos casos de LVC e de LVH durante 2004 a 2006 em Araçatuba (SP) e Belo horizonte (MG). Os autores verificaram que em Araçatuba houve uma queda de 25% nos casos de LVC e de 61% nos casos de LVH com uma cobertura vacinal de apenas 5,7%.

Além das já citadas, as medidas de controle dos vetores devem estar voltadas para a limpeza do meio ambiente evitando-se entulhos e lixos orgânicos que constituem algumas das condições ideais para o desenvolvimento do flebotomíneo (Brasil, 2006).

1.4 DEGRADAÇÃO AMBIENTAL E LEISHMANIOSE

A ação antrópica sobre o ambiente se desencadeia de várias maneiras. Por exemplo, por meio das construções de rodovias, das invasões desordenadas de áreas rurais e por meio do desmatamento para fins comerciais. Como conseqüências diretas dessas ações antrópicas, podemos citar fatores que intensificam o surgimento de doenças infecciosas. Dentre esses fatores estão a fragmentação da floresta, a introdução de patógenos, a poluição, a migração e a pobreza. Entretanto, os fatores que têm mais importância para a saúde pública são as alterações no ambiente físico, as

migrações humanas e de patógenos, a agricultura e a urbanização (Patz *et al.*, 2004).

Uma das ações antrópicas que tem estreita relação com o crescimento de doenças tropicais, incluindo as leishmanioses, é o desmatamento de áreas nativas para fins comerciais como a pecuária, a agricultura e a exploração da madeira, ou ainda para construção de moradias de infra-estrutura precária. Em quaisquer dessas situações, o desmatamento provoca uma alteração ao ambiente físico através da fragmentação da floresta. Uma das consequências dessa fragmentação pode ser a alteração no número de animais silvestres, que são fontes alimentares dos flebotomíneos. Então, estes insetos passam a ter outros alvos alimentares como os cães e as pessoas (Patz *et al.*, 2004). A construção de novas estradas, por exemplo, não só promove o desmatamento, mas também intensifica as atividades comerciais como a agropecuária, a mineração e a exploração de madeira. Além disso, interrompe o fluxo e altera o pH da água, causa o assoreamento e modifica o habitat e o nicho ecológico das espécies envolvidas no ciclo do parasito. As atividades de degradação em áreas nativas permitem o acesso de novas espécies alóctones de mamíferos e de vetores, bem como permitem o acesso de trabalhadores rurais e de turistas imunologicamente desprotegidos. Ao migrarem para outras áreas desmatadas ou nativas, as pessoas, os mamíferos ou ambos podem transportar parasitos que irão infectar vetores locais oferecendo condições para que novas infecções possam ocorrer (Patz *et al.*, 2000).

No mundo, o índice de desmatamento gira em torno de 2% a 3% ao ano. No Brasil, os Estados do Pará, Mato Grosso e Rondônia apresentam os

maiores índices de desmatamento com fins madeireiros. No período entre 2001 a 2004, o estado de Mato Grosso registrou em seu território 40% do desmatamento da Amazônia e 87% de novas áreas preparadas para cultivo (Morton *et al.*, 2006). Em Campo Grande, o desmatamento ocorrido nos últimos anos para construção de casas populares e de um gasoduto no Estado, pode ter sido a causa da dispersão do vetor da leishmaniose visceral, contribuindo para o aumento do número de casos (Silva E. *et al.*, 2007).

No Estado do Pará, o desmatamento tem sido intenso. De agosto a dezembro de 2007, foram desmatados 591 Km² de um total de 3.235 Km² em toda região Norte, representando portanto, 18,27%, ficando atrás apenas de Mato Grosso com 1.786 Km² desmatados (INPE, 2008). Em junho de 2009, o Pará registrou o desmatamento de 330,4 Km² da Amazônia seguido por Mato Grosso com 181 Km² (INPE, 2009).

O desmatamento e a queima da floresta alteram o clima local que afeta a população de insetos vetores de doenças infecciosas como a leishmaniose (Kovats *et al.*, 2001). A alteração climática pode influenciar na taxa de sobrevivência e reprodução dos vetores e como conseqüência, sua distribuição e abundância, além de influenciar na atividade alimentar mudando a freqüência do repasto sanguíneo. Essas alterações também podem ocorrer com relação às taxas de desenvolvimento, sobrevivência e reprodução do patógeno dentro dos vetores (Kovats *et al.*, 2001). Uma das conseqüências da alteração nos fatores climáticos são mudanças fisiológicas que o vetor pode sofrer, tal como um desequilíbrio hídrico. Isto pode influenciar na concordância gonotrófica, isto é, cada oviposição ser precedida por um repasto sanguíneo (Brazil, R. & Brazil,

B. 2003). Dessa forma, algumas espécies de vetores com características antropófilas podem realizar mais de uma hematofagia, aumentando as possibilidades de transmissão de patógenos. Trata-se, portanto, de mudança no comportamento do vetor que confere grande importância epidemiológica (Brazil, R. & Brazil, B. 2003).

Pesquisa desenvolvida ao norte do Rio Amazonas, nos municípios de Silves e Itacoatiara, no estado do Amazonas, mostrou que o número de flebótomos fêmeas infectados diminuiu em consequência da exploração de madeira naquela área. Uma hipótese é que o desmatamento teria causado a morte imediata de muitos espécimes, e provocado a migração para locais próximos que ofereciam melhores condições de sobrevivência para os flebótomos. Uma hipótese alternativa é que esta prática ao afetar o habitat de muitos vertebrados, que são fonte alimentar desses vetores, induziu-lhes à migração forçada para outras áreas (Pessoa *et al.*, 2007).

Algumas espécies de vetores podem se adaptar com muita eficiência às novas condições impostas pela degradação ambiental, é o caso da *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* encontrada em maior abundância em áreas devastadas em vários períodos do ano (Costa S. *et al.*, 2007).

As migrações consequentes das grandes secas no Nordeste e também aquelas que ocorreram dentro da própria região, se caracterizaram pela saída dos moradores das áreas rurais para a periferia das grandes capitais como Natal, Fortaleza, Jacobina, João Pessoa, Petrolina, São Luís, Sobral, Teresina e Salvador. Contudo, as ocupações dessas áreas se deram sem as mínimas condições sanitárias e econômicas. Isso proporcionou as condições favoráveis

para o desenvolvimento da LV uma vez que os imigrantes, imunologicamente desprotegidos, além de desmatarem, trouxeram consigo vários animais domésticos que atuam como fonte alimentar para o vetor. Dentre esses animais, o cão que, além de atrair o vetor, é reservatório do agente etiológico (WHO, 2002).

Segundo Dujardin (2006), as três maiores causas para o aparecimento e reaparecimento das leishmanioses são as mudanças ambientais, condição imunológica humana e falha no tratamento.

Migrações desordenadas em direção à floresta não apenas afetam o meio ambiente por causa do desmatamento, mas também permitem a introdução de animais, como os cães (Silva *et al.*, 2001).

1.5 TAXA DE INFECÇÃO NATURAL

Trabalhos visando determinar a fauna flebotomínica e a taxa de infecção natural por análise microscópica e molecular foram realizados em vários estados brasileiros nos últimos 40 anos (Forattini & Santos 1952; Rebêlo *et al.*, 1999; Filho *et al.*, 2001; Pita-Pereira *et al.*, 2008).

A dissecação dos flebotomíneos seguida da análise microscópica são procedimentos bastante laboriosos e requerem o trabalho de técnicos que tenham habilidade e experiência para realizar tais procedimentos. A análise microscópica tem como base a distribuição preferencial da forma promastigota dentro do trato digestivo do inseto vetor. Dessa forma, a análise microscópica pode ser utilizada como uma ferramenta taxonômica considerando que a localização do parasito no trato digestivo depende do subgênero (Pimenta *et*,

al., 2003). Leishmanias do subgênero *Viannia* se desenvolvem na região pilórica, no íleo e na região média enquanto que as Leishmanias do subgênero *Leishmania* se desenvolvem na região pré-pilórica do intestino (Killick-Kendrick, 1990). Em Teresina (PI), foi realizado um estudo sobre infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania sp* onde os autores dissecaram 1.832 fêmeas e verificaram que os parasitos se encontravam na região do piloro, íleo e papila retal sugerindo que os parasitos encontrados não pertenciam à espécie *Leishmania (L.) i. chagasi* (Silva, J. *et al.*, 2007)

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tem sido bastante difundida, pois oferece alta sensibilidade e especificidade não só no diagnóstico das leishmanioses, mas também na identificação dos agentes etiológicos dessas doenças e na detecção de infecção natural dos vetores independente do número, estágio e localização da *Leishmania sp.* no trato digestivo do vetor (Aransay *et al.*, 2000; Pita-Pereira *et al.*, 2008; Silva E. *et al.*, 2008). Alguns trabalhos que avaliaram a técnica de PCR para detectar *Leishmanias sp.* em flebotomíneos experimentalmente infectados têm sido realizados. Michalsky *et al.*, 2002, alimentaram 138 fêmeas de *L. (L.) longipalpis* em sangue de *hamster* infectado por *L. (L.) i. chagasi*. O DNA provenientes dos insetos infectados foi extraído sem a prévia dissecação e em seguida submetido à PCR resultando em 87% de positividade quando havia, pelo menos, dez parasitos por flebotomíneo.

Entretanto, a taxa de infecção natural é normalmente baixa, em média de 1%, tanto quando se realiza a análise microscópica quando se usa a análise molecular. A baixa taxa de infecção pode estar relacionada à distribuição

heterogênicamente de flebotomíneos infectados com *Leishmanias sp.* ou pode estar relacionada à sazonalidade (Miranda *et, al.*, 2002).

1.6 JUSTIFICATIVA

A LV no Brasil cresceu significativamente ao longo dos últimos dez anos, sobretudo na região Norte. Esta doença, tipicamente rural, tem sofrido um processo de urbanização em vários municípios brasileiros de médio e grande porte, onde o vetor encontra condições ambientais que são apropriadas para seu desenvolvimento. No estado do Pará, os casos da doença aumentaram mais de 600% entre 1990 e 2008. Esses dados sugerem que as medidas preventivas no controle da leishmaniose não estão tendo eficácia e que as atividades antrópicas, como o desmatamento, são responsáveis pelo aumento do número de casos.

Não há estudos publicados que avaliem um possível processo de urbanização do vetor da leishmaniose no município de Barcarena sendo este o primeiro trabalho que pesquisa a urbanização de *Lutzomyia longipalpis* na região Norte. A degradação do meio ambiente em consequência do aumento da agricultura, da pecuária e da urbanização cresce a cada ano, alterando o nicho ecológico de milhares de espécies. Assim, um trabalho que enfoque a presença do vetor em áreas degradadas e na área urbana de Barcarena é um pré-requisito que pode fornecer subsídios teóricos tornando as medidas mais eficazes no controle da leishmaniose visceral no Município como o combate ao vetor e a eliminação de cães infectados.

1.7 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de urbanização de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, no município de Barcarena (PA).

1.7.1 Objetivos Específicos

- Pesquisar a presença do vetor num gradiente de urbanização compreendido entre uma área de mata, passando por uma zona intermediária até a área urbana;
- Determinar a taxa de infecção dos vetores capturados através de dois métodos de análise: microscópica e molecular (Reação em Cadeia de Polimerase - PCR);
- Realizar levantamento da distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral no município de Barcarena.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Barcarena o qual pertence à mesorregião metropolitana de Belém (01º 30' 24" S e 48º 37'12" W) (Pacheco *et al.*, 2007) (Figura 3).

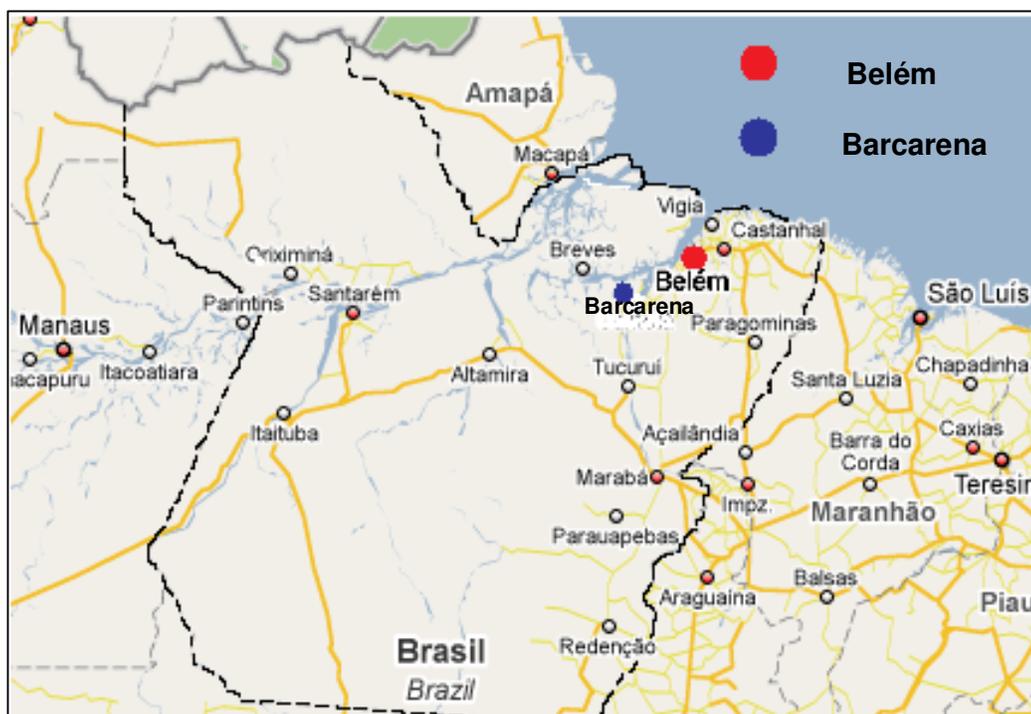


Figura 3 – Mapa do Estado Pará destacando a localização dos municípios de Barcarena e Belém (http://maps.google.com.br/maps_Municip_Belem.svg)

O município possui uma área de 1.310,30 Km² com uma população de 84.560 habitantes, a maioria do sexo masculino, sendo 31.362 (37,09%) residentes na zona urbana e 53.198 (62,91%) na zona rural (Pacheco *et al.*, 2007).

A cobertura vegetal do município até 2002 era composta basicamente por floresta de várzea, floresta de terra firme (primária e secundária), igapó, campina e florestas secundárias de terra firme (capoeiras) (Amaral *et al.*, 2002). Em consequência do desmatamento para fins agropecuários e da agricultura de subsistência, a vegetação primitiva da floresta densa foi quase eliminada dando lugar à floresta secundária em diferentes estágios de

desenvolvimento. As florestas dos tipos ciliares e de várzea estão presentes à margem dos rios e dos igarapés (Pacheco *et al.*, 2007).

2.1.1 Áreas de Coleta

Visando identificar a presença de espécies de flebotomíneos no Município, foram estabelecidas, ao longo de um gradiente de urbanização compreendido entre mata e ambiente urbano, quatro áreas para coleta dos insetos:

- a) Área de Mata - Áreas com vegetação fechada e sem a presença de habitações humanas;
- b) Borda de Mata - Áreas contíguas às matas, contudo, apresentando ocupação humana;
- c) Área Intermediária - Áreas compreendidas entre a borda de mata e a área urbana. Corresponde à periferia da cidade;
- d) Área Urbana - Área também denominada de sede, onde estão instaladas as residências a maioria das instituições públicas e privadas do Município.

Foram estabelecidos dois transectos a serem amostrados durante o estudo, sendo que o primeiro abrangeu uma área de invasão antiga (estabelecida há pouco mais de 12 anos) e o segundo transecto abrangeu uma área de invasão recente (4 anos).

O Primeiro transecto (invasão antiga) iniciou no bairro Araticu, no qual a área de mata apresentava-se mais conservada com árvores de grande porte e pouca luminosidade em consequência da mata ser mais densa. Contudo, clareiras em vários trechos da mata tornavam a ação antrópica evidente (Figura 4a). A borda de mata apresentava-se bastante arborizada, cortada por

igarapés e pouco habitada (Figura 4b). Nesta área, além de animais domésticos, há relatos, por parte dos moradores, da presença de mamíferos silvestres como raposas e marsupiais. As moradias são de madeira e distantes 200 m a 300 m umas das outras. A população tem como principais atividades econômicas a criação de animais (aves e suínos) e a agricultura de subsistência. A área intermediária, representada pelo Bairro Novo, apresentava arborização escassa, entretanto com melhores condições de infra-estrutura e de saneamento básico se comparado a área anterior. Não houve relatos, por parte dos moradores sobre a presença de animais silvestres, contudo, havia muitos animais domésticos, principalmente cães, circulando por toda a área (Figura 4c). A área urbana caracterizou-se por apresentar ruas pavimentadas, com pouca vegetação, casas de alvenaria com água encanada e rede de esgoto. Entretanto, foi possível observar cães circulando nas ruas e a criação de aves e suínos nos quintais de muitas residências (Figura 4d).

O segundo transecto (invasão recente) teve início no bairro Barbolândia. Neste bairro, a área de mata era constituída por árvores de menor porte se comparadas ao bairro Araticu. Estas árvores eram dispostas de maneira mais dispersa permitindo maior luminosidade no ambiente (Figura 5a). A área de borda de mata apresentava pouca vegetação em consequência das invasões. Neste bairro, observaram-se ainda, vários animais domésticos circulando livremente pelo ambiente peridomiciliar. Entretanto, os moradores relataram a presença de animais silvestres como marsupiais nas proximidades das residências. As habitações foram construídas sem nenhuma condição de infra-

estrutura e de saneamento básico. A maioria das residências, distantes aproximadamente 30 m umas das outras, eram de madeira e não tinham água encanada (Figura 5b). A área intermediária, representada pelo bairro Betânia (Figura 5c) e a área urbana (Figura 5d) apresentavam características semelhantes ao primeiro transecto.



Figura 4. Fotos caracterizando as áreas de coleta. Primeiro transecto (invasão antiga): (a) Araticu (área de mata), (b) Araticu (borda de mata), (c) Bairro Novo (área intermediária), (d) área urbana.



Figura 5. Fotos caracterizando as áreas de coleta. Segundo transecto (invasão recente): (a) Barbolândia (área de mata), (b) Barbolândia (borda de mata), (c) Bairro Betânia (área intermediária), (d) detalhe de uma galinheiro em área urbana.

2.2 COLETA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Visando analisar o deslocamento das espécies de flebotomíneos, especialmente *L. (L.) longipalpis*, do ambiente silvestre (área de mata) até o ambiente urbano no município de Barcarena, foram realizadas coletas de flebotomíneos ao longo dos dois transectos (área antiga e área recente). Para cada área de coleta (área de mata, borda de mata, área intermediária e área urbana), foram estabelecidos 3 pontos de amostragem totalizando 12 pontos em cada transecto (Figura 6).

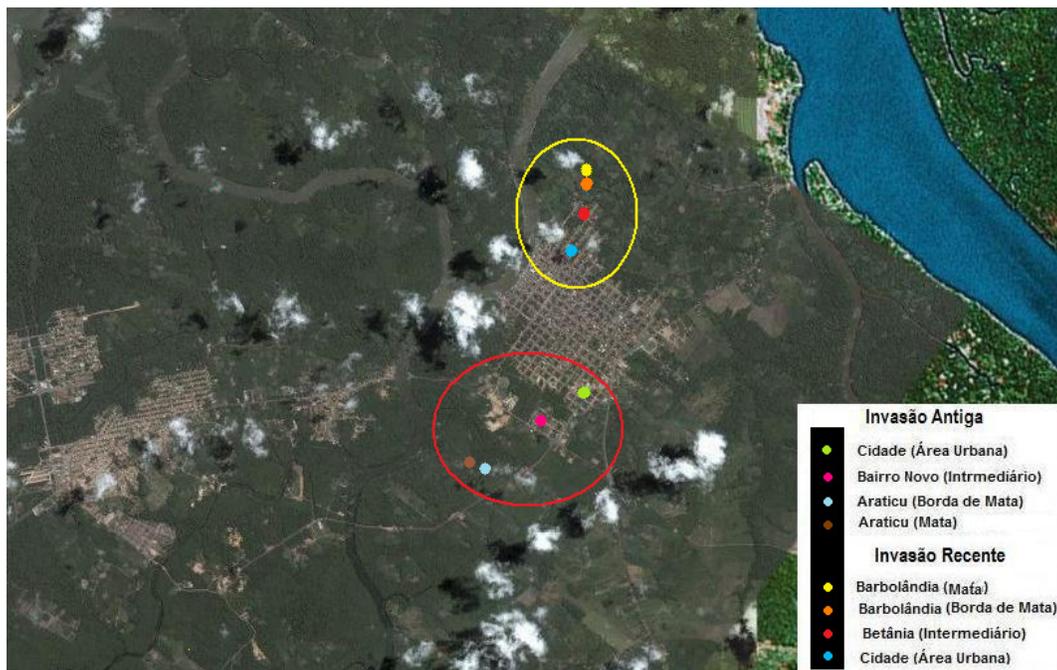


Figura 6 – Foto por satélite mostrando as áreas de coleta de flebotomíneos no município de Barcarena (PA). O transecto de invasão antiga em vermelho e o transecto de invasão recente em amarelo. (Fonte: Google Maps http://www.svajdlenka.com/travel_maps.)

As capturas de flebotomíneos foram realizadas, em 5 excursões de 10 dias, nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2007, fevereiro de 2008 e janeiro de 2009, totalizando 50 dias de coleta por área. Contudo, as coletas em área de mata foram realizadas apenas na última excursão, totalizando apenas 10 dias. Foram utilizadas armadilhas luminosas CDC (Sudia & Chamberlain, 1962) a qual é utilizada como principal método para captura de flebotomíneos adultos. O modelo de armadilha CDC HP utilizado (Pugedo *et al.*, 2005) (Figura 7), tem formato cilíndrico e é constituída de PVC de cor branca. Na parte superior, há uma tela protetora de formato convexo e sobre o “copo” cilíndrico há um prato metálico cujo lado inferior é polido possibilitando o reflexo da luz para o corpo da armadilha. A fonte de luz é constituída por uma lâmpada incandescente do tipo tubular, de baixo consumo, que emite radiação luminosa de alta intensidade. O posicionamento da lâmpada proporciona cobertura extensa e eficiente da área de captura, atraindo os insetos presentes nos arredores. A energia é obtida por bateria de 6 volts ou por quatro pilhas tamanho “A” (Pugedo *et al.*, 2005).

Devido ao hábito noturno dos flebotomíneos, as armadilhas foram instaladas, em galinheiros e no interior da mata a 1,5 m do solo, às 18:00 h e recolhidas às 08:00 h do dia seguinte.



Figura 7 – Armadilha CDC (modelo HP) instalada em galinheiro

Os flebotomíneos capturados nas armadilhas foram removidos com o auxílio de aspiradores manuais de Castro devidamente etiquetados, para posterior identificação e quantificação (Figura 8). No laboratório, instalado nas dependências da residência onde a equipe ficou alojada na cidade de Barcarena, os insetos foram mantidos a uma temperatura de 4°C para diminuição do metabolismo. Em seguida, prepararam-se três “cubetas” de vidro: a primeira contendo água com sabão neutro para remoção das cerdas, a segunda com solução salina para retirar o sabão e a terceira com solução salina e antibiótico para desinfecção. Em cada cubeta, usou-se um pincel para fazer movimentos lentos circulares e transferir os insetos para as cubetas seguintes.



Figura 8 – Retirada dos flebotomíneos das armadilhas CDC usando aspirador de Castro

Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, machos e fêmeas foram separados e identificados segundo a espécie seguindo a classificação proposta por Young & Duncan (1994) (Figura 9).



Figura 9 – Dimorfismo sexual de flebotomíneo macho (A) e de flebotomíneo fêmea (B). Observar na porção posterior do macho a presença de uma estrutura denominada gonapófise.

FONTE: www.fiocruz.br/.../start.htm?infoid=433&sid=32

2.3 DEFINIÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO NATURAL DE *L. (L.) longipalpis*

2.3.1 Análise Microscópica

Visando definir a taxa de infecção dos flebotomíneos capturados nas diferentes áreas, as fêmeas de *L. (L.) longipalpis* foram dissecadas, em lâminas esterilizadas, com auxílio de pinças de aço e estiletos. Em cada lâmina foram colocadas duas gotas de solução salina (NaCl). Na primeira gota, o inseto foi devidamente posicionado para retirada do tubo digestivo fixando-se cuidadosamente o tórax com uma das pinças e puxando o final do abdome

para retirada do tubo digestivo que foi colocado na segunda gota. Após coberto com lamínula, o intestino foi examinado ao microscópio óptico, em aumento de 400X, para visualização de possíveis parasitos. Os machos foram acondicionados inteiros em frascos com álcool a 70%.

2.3.2 Análise Molecular

Após a análise microscópica dos flebotomíneos, os intestinos foram colocados, individualmente, em tubos tipo *ependorf* devidamente identificados contendo 20 µl de solução salina. As amostras foram conservadas em nitrogênio líquido para pesquisa de *L. (L.) i. chagasi* por biologia molecular através do método da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos.

EXTRAÇÃO DE DNA

Foram utilizados intestinos de fêmeas de flebotomíneos para a extração de DNA. Os intestinos foram colocados, individualmente, em tubos *ependorf* contendo uma solução de trituração (tampão 10x; 20x Spermine/spermidine; 10% Sacarose). A solução de SDS (tampão SDS 2x; 10% SDS 0,6 ml; 10% Sacarose; dietilpirocarbonato) foi adicionada, após a trituração nos tubos, incubando-se por aproximadamente 30 minutos a 65°C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas à temperatura de 4°C por aproximadamente 5 minutos, rapidamente e então foi adicionada uma solução de 8 M de acetato de potássio e incubadas à 4°C por mais 45 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 2 minutos a 14 mil rpm. O sobrenadante foi transferido para

um novo tubo *ependorf* com etanol a 96% devidamente rotulado e deixado em *overnight*. Posteriormente, o etanol foi descartado e o sedimento lavado três vezes com etanol a 75%. As amostras foram secadas em estufa a 47°C e o DNA redissolvido em solução contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0. Os tubos foram então mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e posteriormente estocados a - 20°C.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

A técnica da PCR foi realizada envolvendo compostos básicos para a amplificação *in vitro* do DNA de *Leishmania*. Os marcadores utilizados foram:

a) Marcadores do gene mitocondrial

Foram utilizados marcadores do gene mitocondrial de flebotomíneos para verificar o sucesso na extração de DNA. Os pares de oligonucleotídeos utilizados foram CB3-PDR (5´ - CA(T/C) ATT CAA CC(A/T) GAA TGA TA – 3´) e NHN3 – PDR (5´ - GGT A(C/T) (A/T)T TGC CTC GA(T/A) TTC G(T/A) TAT GA - 3´), nas seguintes condições:

I - Condições de reação - A PCR foi realizada para um volume total de 25µl, contendo 60 µM de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1,5 mM MgCl₂ 50mM; 1X solução PCR Buffer; 0,5 µg/µl de cada um dos oligonucleotídeos; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e 2 µl de DNA da amostra, para um volume final de 10µl.

II - Condições de temperatura - A reação foi incubada, a uma temperatura inicial de 94°C por 3 minutos para a desnaturação do DNA. Em seguida, o material foi submetido a 5 ciclos em um termociclador na temperatura de 94°C

por 30 segundos, 38°C por 30 segundos e 72°C por 90 minutos. Posteriormente o material passou por mais 30 ciclos na temperatura de 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 90 minutos. Ao final, a etapa de extensão foi mantida por 10 minutos a 72°C.

b) Marcadores do gene Mini-exon

Foram utilizados marcadores do gene Mini-exon para verificar se os flebótomos estavam infectados por *Leishmania* do subgênero *Viannia* ou *Leishmania*. Os pares de oligonucleotídeos utilizados foram S1629 (5'-GGGAATTCAATAWAGTACAGAACTG-3') e S1630 (5'-GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA-3'), nas seguintes condições descritas abaixo:

I – Condições de reação - A PCR foi realizada para um volume total de 10µl contendo 200µM de dNTP's, 1,5mM de MgCl₂, 1 X solução PCR Buffer, 1/10 de volume de DMSO , 200 ng/µl de cada um dos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e 2 µl de DNA da amostra para o volume final de 10µl. Os marcadores utilizados amplificam aproximadamente 250 pb do gene de Mini-exon das espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e 350 pb para a *L. (L.) amazonensis* (Fernandes *et al.*, 1994).

II – Condições de temperatura: As amostras foram colocadas em um termociclador programado, a uma temperatura inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 5 ciclos na temperatura de 95°C por 1 minuto, 45°C por 30 segundos e 65°C por 1 minuto. Em seguida, a reação foi submetida a uma temperatura de 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos sendo 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.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Ao término dos ciclos, os produtos da PCR foram corados com solução indicadora azul de bromofenol e colocados para corrida de eletroforese em gel de agarose a 1% - TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Em seguida, foram visualizados em transluminador UV para a análise das bandas obtidas. A eletroforese foi realizada a 100 V e 50 mA por 1 hora.

O DNA extraído dos flebotomíneos infectados foi utilizado como controle positivo e na a realização de PCR para detectar gene Mini-exon de *Leishmania*, foi utilizado como controle positivo cepas padrão de *Leishmania* obtidas em cultivo. Como controle negativo, foi utilizada água autoclavada tanto na amplificação de genes do parasito quanto do vetor.

2.4 VIABILIDADE DOS PROCEDIMENTOS DE DISSECAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

Visando avaliar a viabilidade dos procedimentos conduzidos para dissecação e conservação dos flebotomíneos, foram realizados experimentos com 40 fêmeas de *L. (L.) longipalpis* artificialmente infectadas. As fêmeas de flebotomíneos foram infectadas experimentalmente, no Laboratório de Leishmaniose do IEC. Os insetos foram alimentados durante 12 horas em hamster infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*. O critério para utilização desta espécie foi a disponibilidade de *hamsters* com infecção desenvolvida

pelo parasito no biotério do IEC. Após alimentados, os flebotomíneos foram dissecados e examinados ao microscópio a fim de se verificar infecção, seguindo o mesmo procedimento realizado em campo. As dissecações e análises microscópicas foram realizadas em 24, 48 e 72 horas após a alimentação dos insetos. Quando não foi possível identificar flagelados por análise microscópica, os intestinos foram colocados individualmente em tubos *ependorf* com 20 µl de solução salina e conservados em nitrogênio líquido.

No Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA (NMT), foi feita a extração do DNA e as análises por PCR com iniciadores para detectar gene mitocondrial de flebotomíneos e gene Mini-exon de *Leishmania*.

2.5 LEVANTAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LV EM BARCARENA

Visando avaliar a distribuição dos casos de LV dentro do município de Barcarena, foi realizado um levantamento dos casos ocorridos entre 2000 e 2008. Os dados foram obtidos na Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará (SESPA) e complementados por meio de análise das notificações dos casos fornecidas pela Secretaria Municipal de Saúde de Barcarena.

Dados sobre faixa etária, número de casos por ano, locais de ocorrência, sexo e período das notificações foram analisados neste trabalho.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o objetivo de verificar se a incidência dos casos de LV entre os sexos masculino e feminino foi significativa, foi realizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) através do programa Bioestat 4.0 (Ayres *et al.*, 2006)

3. RESULTADOS

3.1 CAPTURAS DOS FLEBOTOMÍNEOS

Durante o trabalho, foram capturados 5.089 espécimes de flebotomíneos (3.440 machos e 1.649 fêmeas) representados por 11 espécies: *Lutzomyia* (N.) *antunesi*, *L.* (N.) *flaviscutellata*, *L.* (L.) *longipalpis*, *L.*(*Sciopemyia*) *sordellii* Shannon e Del Ponte, 1927, *L.* (*Psychodopygus*) *davisi* Root, 1934, *L.* (*Pintomyia*) *damascenoi* Mangabeira, 1942, *L.* (*Helcocyrtomyia*) *trinidadensis* Newstead, 1922, *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *gomezi* Nitzulescu, 1931, *L.* (*P.*) *paraensis* Lima, 1941, *L.* (*V.*) *furcata* e *L.* (*Helcocyrtomyia*) *pusilla*, Dias, Martins, Falcão & Silva, 1986. A **Tabela 1** apresenta as espécies de flebotomíneos capturadas. A espécie *L.* (L.) *longipalpis* foi predominante em relação às demais, representando 95,15% do total coletado. *Lutzomyia sordellii* e *L.* (N.) *flaviscutellata* foram a segunda (2,06%) e a terceira (1,76%) espécies mais capturadas, respectivamente. Todas as demais espécies apresentaram taxa de captura inferior a 1%.

Do total de *L.* (L.) *longipalpis* capturados durante o trabalho, 70,03% foram machos, enquanto que, para as demais espécies, o número de fêmeas capturadas prevaleceu sobre o número de machos.

Tabela 1 – Total de espécies de flebotomíneos capturadas em Barcarena (outubro de 2007 a janeiro de 2009).

Espécie	Machos	Fêmeas	Indivíduos	%
<i>L. (L.) longipalpis</i>	3.391	1.451	4.842	95,15
<i>L. (S.) sordellii</i>	22	83	105	2,06
<i>L. (N.) flaviscutellata</i>	12	78	90	1,76
<i>L. (H.) trinidadensis</i>	12	12	24	0,47
<i>L. (L.) gomezi</i>	0	7	7	0,14
<i>L. (N.) antunesi</i>	3	4	7	0,14
<i>L. (V.) furcata</i>	0	4	4	0,08
<i>L. (P.) davisi</i>	0	4	4	0,08
<i>L. (P.) paraensis</i>	0	4	4	0,08
<i>L. (Pintomyia) damascenoi</i>	0	1	1	0,02
<i>L. (H.) pusilla</i>	0	1	1	0,02
Total	3.440	1.649	5.089	100.00

Avaliando os flebotomíneos coletados por área, observou-se que todos os espécimes foram coletados em áreas de mata ou em áreas de borda da mata (**Tabela 2**), exceto um espécime de *L. (S.) sordellii* coletado na área intermediária do transecto da invasão antiga. Nenhum espécime foi capturado em área urbana. A maioria dos espécimes coletados (90%) foi oriunda do transecto de invasão antiga, e apenas 10% foram coletados no transecto da invasão recente.

O padrão de abundância de espécies diferiu entre área de mata e de borda de mata, no transecto de invasão antiga. A espécie *L. (L.) longipalpis* foi predominante em borda de mata enquanto que na área de mata predominou a espécie *L. (N.) flaviscutellata*.

A maior riqueza de espécies foi observada na borda de mata da invasão antiga (10 espécies) onde de todas as espécies capturadas durante o estudo, apenas a *L. (P.) paraensis* não foi encontrada. Na área de borda de mata da invasão recente, a riqueza de espécies reduziu pela metade (5 espécies) sendo que *L. (L.) longipalpis* foi a mais abundante.

A área de mata da invasão antiga foi a segunda em riqueza de espécies capturadas (7), enquanto que na área de mata da invasão recente não houve exemplares capturados.

Tabela 2 - Distribuição das espécies de flebotomíneos, capturados por área em Barcarena entre outubro de 2007 a janeiro de 2009

Espécie	TRANSECTOS								Total
	Invasão Antiga				Invasão Recente				
	AM	BM	I	AU	AM	BM	I	AU	
<i>L. (L.) longipalpis</i>	6	4.336	0	0	0	500	0	0	4.842
<i>L. (S.) sordellii</i>	2	100	1	0	0	2	0	0	105
<i>L. (N.) flaviscutellata</i>	66	16	0	0	0	8	0	0	90
<i>L. (H.) trinidadensis</i>	0	22	0	0	0	2	0	0	24
<i>L. (L.) gomezi</i>	2	5	0	0	0	0	0	0	7
<i>L. (N.) antunesi</i>	2	4	0	0	0	1	0	0	7
<i>L. (V.) furcata</i>	0	4	0	0	0	0	0	0	4
<i>L. (P.) davisii</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	4
<i>L. (P.) paraensis</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>L. (Pintomyia)</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>damascenoi</i>									
<i>L. (H.) pusilla</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	84	4.491	1	0	0	513	0	0	5.089
Total de espécies	7	10	1	0	0	5	0	0	11

(AM = Área de Mata; BM = Borda de Mata; I = Intermediária; AU = Área Urbana)

Avaliando-se o total de flebotomíneos coletados por excursão observou-se que a maior abundância de espécies coletadas (76,34%) ocorreu durante os meses de novembro e dezembro. (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Número de Flebotomíneos capturados em Barcarena (PA) em cada mês de coleta durante 2007 a 2009.

ESPÉCIES	Nº DE ESPÉCIMES POR PERÍODO					TOTAL
	02 a 11 out/07	01a10 nov/07	13 a 21 dez/07	13 a 22 Fev/08	16 a 25 Jan/09	
<i>L. (L.) longipalpis</i>	729	1915	1919	138	141	4842
<i>L. (S.) sordellii</i>	29	6	20	41	9	105
<i>L. (N.) flaviscutellata</i>	2	1	11	3	73	90
<i>L. (H.) trinidadensis</i>	4	1	9	10	0	24
<i>L. (L.) gomezi</i>	3	2	0	0	2	7
<i>L. (N.) antunesi</i>	0	0	0	4	3	7
<i>L. (V.) furcata</i>	3	1	0	0	0	4
<i>L. (P.) davisii</i>	0	0	0	2	2	4
<i>L. (P.) paraensis</i>	0	0	0	0	4	4
<i>L. (Pintomyia) damascenoi</i>	0	0	0	1	0	1
<i>L. (H.) pusilla</i>	0	0	0	1	0	1
TOTAL	770	1926	1959	200	234	5.089

3.2 EXPERIMENTOS COM *L. (L.) longipalpis* ARTIFICIALMENTE INFECTADAS

Quarenta fêmeas de *L. (L.) longipalpis* foram infectadas, em laboratório, com *L.(L.) amazonensis*. Em seguida os insetos foram dissecados em

intervalos de 24, 42 e 72 horas após a infecção. Não foi possível observar infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* por análise microscópica nos flebotomíneos dissecados nas primeiras 24h. Contudo, o parasito foi observado em 100% dos flebotomíneos dissecados 42 e 72 horas após a alimentação em *hamster*. As amostras dissecadas nas primeiras 24 h foram submetidas à extração de DNA e em seguida foram submetidas à PCR para amplificação de DNA com *primers* para gene mitocondrial de flebotomíneo e gene Mini-exon de *Leishmania*. Os resultados dos testes moleculares foram positivos para todas as amostras, confirmando que os procedimentos realizados para dissecação e conservação das amostras em campo não interferiram no diagnóstico.

3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Um total de 1.451 fêmeas de *L. (L.) longipalpis* foram dissecadas e analisadas ao microscópio ótico. Não foi observada a presença de infecção por *Leishmania* nas amostras examinadas. Uma fêmea de *L. (S.) sordellii*, coletada no Bairro Araticu (área de borda de mata), estava positiva para infecção por flagelados.

3.4 ANÁLISE MOLECULAR

A extração de DNA foi realizada em 493 fêmeas de *L. (L.) longipalpis*. O DNA extraído foi submetido à PCR resultando em 203 amostras positivas para gene mitocondrial de flebotomíneos (Figura 10). Em seguida, 10% destas

amostras foram submetidas à PCR com marcadores para Mini-exon de *Leishmania*. Não houve resultado positivo para *Leishmania (L.) i. chagasi*.

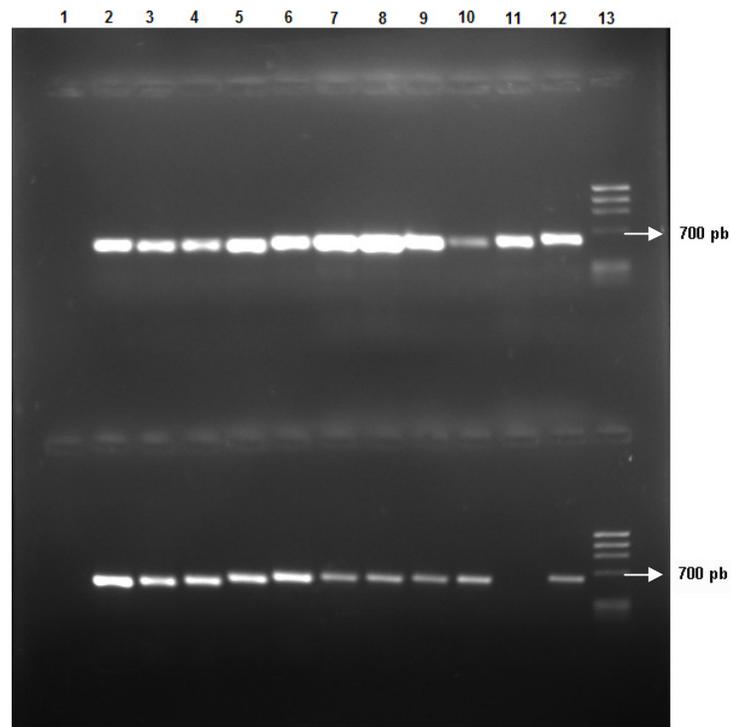


Figura 10. Gel de agarose mostrando produtos da PCR após amplificação de DNA de Flebotomíneos com *primers* gênero-específicos. As linhas 1 e 2 indicam controles negativos e positivos, respectivamente. As linhas 3 a 12 correspondem às amostras de DNA amplificadas de flebotomíneos, e a linha 13 corresponde ao indicador de peso molecular.

De 958 amostras de intestinos dissecados de flebotomíneos, apenas 493 foram utilizadas para extração de DNA neste trabalho. Os problemas ocorreram em consequência da conservação inadequada das amostras em nitrogênio líquido ou de manipulação das mesmas quando foram retiradas do recipiente com nitrogênio líquido.

3.5 LEVANTAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LV EM BARCARENA

Durante o período de 2000 a 2008, ocorreu um total de 301 casos de LV sendo que no período de 2004 a 2006 foi registrado o maior número de casos. Estes casos distribuíram-se em 20 localidades do município de Barcarena segundo a SESPA e a Secretaria Municipal de Saúde de Barcarena (Figura 11). Os locais com maior incidência de casos foram representados por ocupações mais antigas, portanto com maior cobertura vegetal, como Vila do Conde, Cafezal e Trevo do Peteca. No entanto, foram registrados casos em áreas urbanas como a Vila dos Cabanos (13) e a sede do município (28) (Tabela 4). Além da sede, também foram registrados casos em outras áreas trabalhadas durante o estudo tais como, Araticu (11), Bairro Novo (1) e Bairro Betânia (2) (Tabela 4).

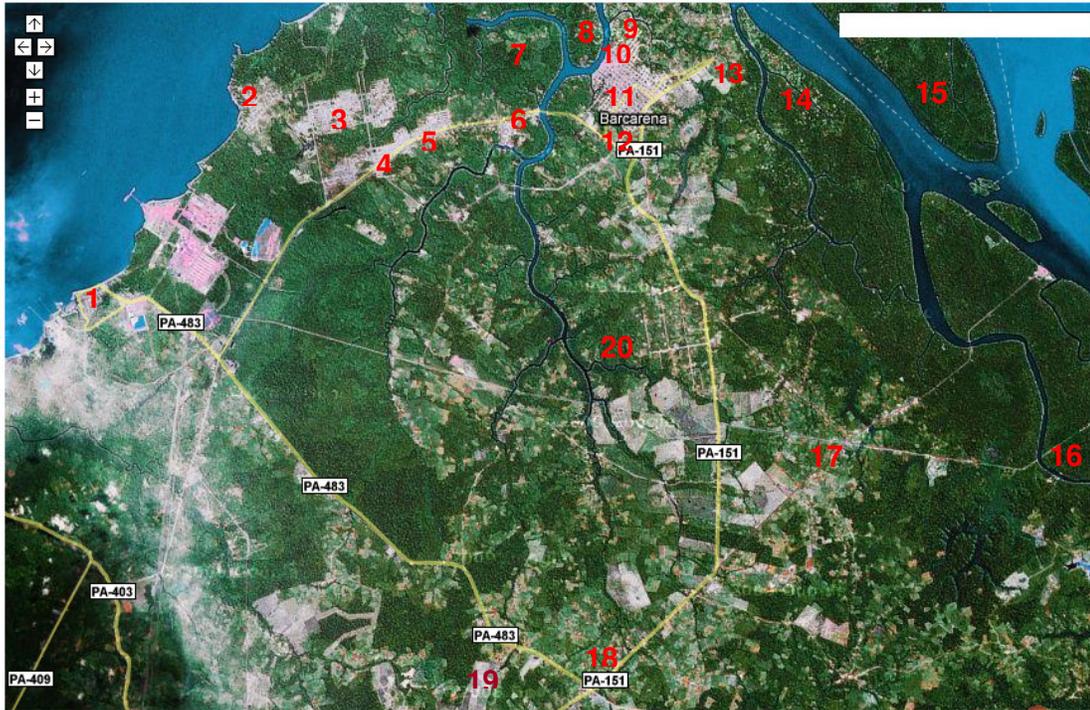


Figura 11: Mapa do Município de Barcarena mostrando os locais de ocorrência de LV entre 2000-2008. 1- Vila do Conde; 2- Itupanema; 3- Vila dos Cabanos (Centro); 4- Bairro Pioneiro (invasões); 5- Laranjal; 6- São Francisco; 7- Furo do Arrozal; 8- Iha Tambioca; 9- Araticu; 10- Bairro Novo; 11- Barcarena (Sede); 12- Betânia; 13- Cafezal ; 14- Porto da Balsa; 15- Comunidade São João; 16 – Limeira; 17- Estrada do Arapari ; 18 - Trevo do Peteca; 19 - Arienga; 20- CDI. (Fonte: Seretaria de Saúde de Barcarena)

Tabela 4 - Distribuição dos casos de LV por localidade entre os anos de 2000 a 2008.

Bairro/Localidade	ANO									Total
	00	01	02	03	04	05	06	07	08	
Vila do Conde	8	5	0	2	11	10	5	2	3	46
Cafezal	3	6	3	0	9	6	6	2	3	39
Estrada do Arapari	3	2	0	0	3	5	6	0	0	29
Sede	5	0	0	1	8	10	3	1	0	28
Trevo do Peteca	5	0	1	1	1	14	4	0	0	26
CDI	5	0	0	1	5	1	8	3	1	23
Arienga	2	0	0	0	8	4	2	0	0	16
Pioneiro	0	1	0	1	5	1	3	3	0	14
Itupanema	0	0	0	0	2	3	2	2	4	13
Vila dos Cabanos	0	0	3	0	5	1	4	0	0	13
Araticu	0	2	0	1	3	0	2	2	1	11
Ilha Trambioca	1	0	0	0	2	5	2	0	0	10
Laranjal	0	2	1	0	0	4	1	1	0	9
Furo do Arrozal	0	0	0	0	0	8	0	0	0	8
Porto da Balsa	0	2	0	2	2	0	0	0	2	8
Limeira	2	0	0	0	1	2	3	0	0	8
São Francisco	0	0	0	0	1	2	1	1	0	5
Betânia	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
Comunidade S. J.	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Bairro Novo	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	35	20	8	9	66	78	52	17	16	301

Os casos de LV tiveram maior incidência no sexo masculino do que no feminino em todos os anos entre 2000 a 2008, sendo essa diferença significativa (χ^2 , $p < 0,05$) nos anos 2001, 2005 e 2006 (Figura 12). Foi verificado que, neste período, a faixa etária com maior incidência está

compreendida entre 0 a 12 anos e que essa incidência sofreu redução com o aumento da idade (Figura 13). A faixa etária compreendida entre 0 a 12 anos representou 64,1% dos casos ocorridos no período avaliado.

A superioridade na incidência de casos no sexo masculino se manteve também quando se avaliaram os dados por faixa etária (Figura 14). Entretanto, observou-se que a diferença na incidência da doença entre sexos não foi significativa ($p > 0,05$) para classe de 0 a 12 anos e para os maiores de 58 anos.

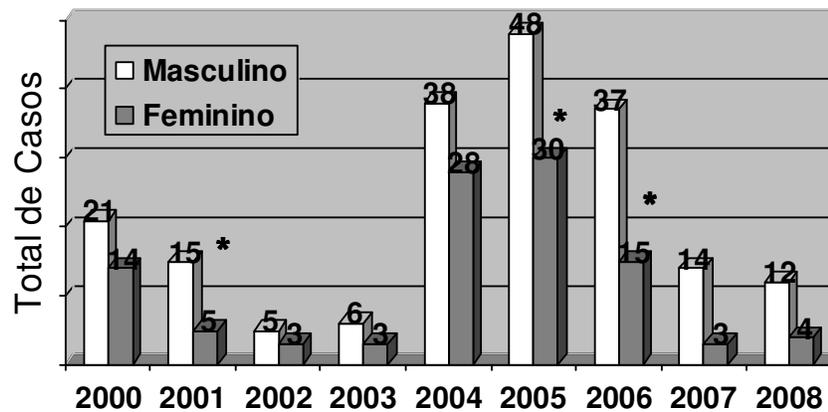


Figura 12 – Casos de LV em Barcarena-PA em ambos os sexos entre os anos de 2000 a 2008 * = Diferença significativa ($p < 0,05$) (Fonte: SESPA)

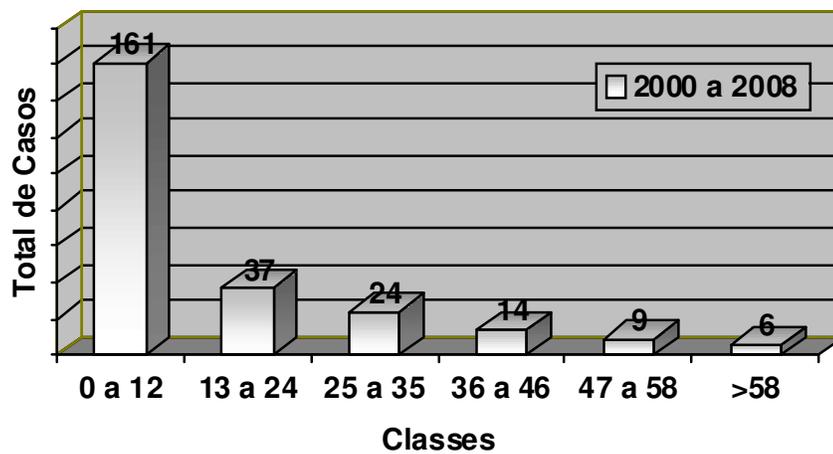


Figura 13 – Casos de LV em Barcarena-PA, por faixa etária, entre os anos de 2000 a 2008. (Fonte: SESPA)

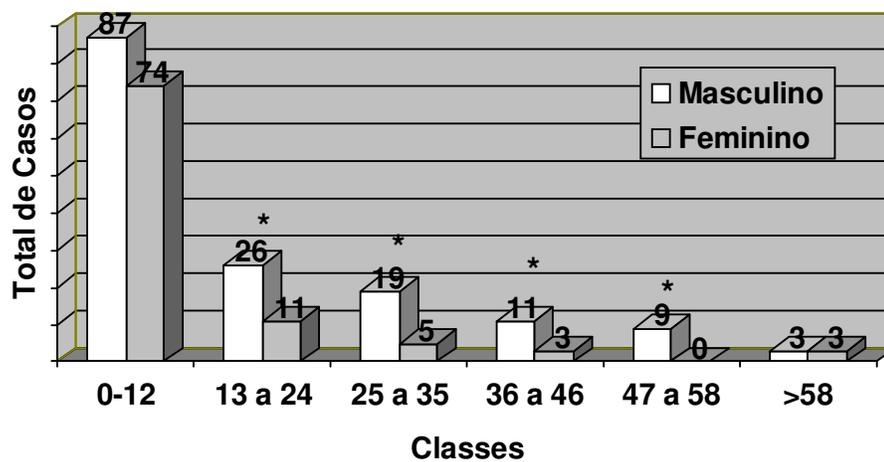


Figura 14 – Casos de LV em Barcarena-PA, por faixa etária e sexo entre os anos de 2000 a 2008. * = Diferença significativa ($p < 0,05$) (Fonte: SESPA)

4. DISCUSSÃO

A Leishmaniose Visceral no Brasil tem aumentado nos últimos anos na maioria das regiões, sendo o Nordeste e o Norte as regiões que apresentaram maior número de casos desde 1990 (Brasil, 2008). Estudos têm registrado a ocorrência de LV em cidades brasileiras evidenciando o processo de urbanização da doença (Costa, 2008; De Paula *et al.*, 2008). Ximenes *et al.* (2007) realizaram um levantamento de casos da doença no Rio Grande do Norte e verificaram que 82% dos municípios notificaram casos de LV com aumento do coeficiente de incidência de 10,4 casos na década de 80 para 67 casos por 100.000 habitantes nos anos 90. No município de Barcarena, a leishmaniose visceral tem sido um desafio para os órgãos de saúde pública. Durante os anos de 2000 a 2008, foram registrados 301 casos da doença segundo a Secretaria de Saúde Pública do Município.

4.1 CAPTURA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os dados de captura de flebotomíneos realizadas neste experimento demonstraram que o município de Barcarena apresenta uma riqueza considerável de espécies em áreas sob ação antrópica. Vários estudos de levantamento da fauna flebotomínica têm registrado resultados semelhantes. Souza *et al.* (2003) capturaram 18 espécies de flebotomíneos em áreas endêmicas para LV no município do Rio de Janeiro durante os anos de 1995 a 2001, enquanto 13 espécies foram coletadas durante trabalho realizado por Silva E. *et al.* (2007) em Campo Grande (MS). Silva A. M. *et al.* (2008) pesquisando 46 localidades distribuídas em 37 municípios no Paraná, entre

2004 e 2005, constataram que, dentre as 23 espécies capturadas, 16 eram oriundas de áreas antrópicas. Resultados semelhantes aos obtidos em Barcarena foram registrados por Andrade-Filho *et al.* (2001) que desenvolveram um estudo sobre fauna flebotomínica no Estado de Tocantins e concluíram que a área pesquisada apresentava uma grande riqueza de espécies. Os autores capturaram 32 espécies e um total de 2.677 flebotomíneos sendo 89,17% capturadas em área de borda de mata. Em trabalho realizado na Ilha de São Luís (MA), Rebelo *et al.* (1999) encontraram a maior riqueza de espécies (32) em áreas de mata, e apenas 16 espécies em área de borda de mata.

Lutzomyia longipalpis foi a espécie predominante ao longo do estudo sendo que esta superioridade deveu-se, quase exclusivamente às coletas em borda de mata, pois em área de mata a espécie predominante foi *Lutzomyia flaviscutellata*. A predominância de *L. (L.) longipalpis* também foi verificada por Oliveira A. G. *et al.* (2006) que verificaram a alta abundância desta espécie em três localidades na cidade de Campo Grande (MS). Os autores capturaram 20 espécies de flebotomíneos, totalizando 5.004 espécimes, sendo que *L. (L.) longipalpis* representou 92,22% do total. Resultados semelhantes quanto à abundância de *L. (L.) longipalpis* foram obtidos por Silva E. *et al.* (2007). Em pesquisa realizada pelos autores durante os anos de 2003 a 2005, na cidade de Campo Grande (MS), quando foram coletados 2.275 flebotomíneos dos quais 2.115 (92,9%) pertenciam à espécie *L. (L.) longipalpis*, sendo a maioria coletada no peridomicílio. A maior abundância desta espécie também foi verificada por Ximenes *et al.* (2007), durante a pesquisa na região

metropolitana de Natal (69%). As freqüentes capturas de *L. (L.) longipalpis* em áreas urbanas demonstram que esta espécie é altamente antropófila. Estudo realizado por Andrade-Filho *et al.* (2001) em área de mata, borda de mata e na cidade, mostrou que *L. (L.) longipalpis* juntamente com *Lutzomyia whitmani* foram as espécies que predominaram no intradomicílio e no peridomicílio. *L. (L.) longipalpis* correspondeu com 34% e 28% nos dois ecótopos, respectivamente.

Lutzomyia longipalpis é considerado como o vetor principal de *Leishmania (L.) infantum chagasi* desde a década de 30, quando Evandro Chagas iniciou as pesquisas envolvendo casos de LV em áreas de Abaetetuba e Moju, no Pará (Chagas *et al.*, 1938). A confirmação da espécie como vetora do parasito se deu na década de 50 quando os pesquisadores Joaquim Alencar e o casal Leônidas e Maria Deane capturaram *L. (L.) longipalpis* naturalmente infectados com formas evolutivas leptomonas do parasito, bem como raposas naturalmente infectadas (Deane & Deane, 1954). Mais recentemente, Nascimento *et al.* (2007) detectaram, em Mato Grosso do Sul, infecção natural em flebotomíneos utilizando a técnica de PCR. Os autores analisaram 81 espécimes dos quais 77 eram *L. (L.) longipalpis* e verificaram infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* nesta espécie.

Vários estudos apontam *Lutzomyia cruzi* como a segunda espécie mais importante na transmissão da LV. A espécie já foi capturada naturalmente infectada por *L.(L.) infantum chagasi* em áreas endêmicas no estado de Mato Grosso e de Mato Grosso do Sul onde *L. (L.) longipalpis* não foi encontrado (Santos *et al.*, 1998, Missawa & Maciel, 2006; Missawa *et al.*, 2007; Pita-

Pereira *et al.*, 2008). Todavia, outras espécies têm sido encontradas naturalmente infectadas com *L. (L.) infantum chagasi*. Carvalho *et al.* (2008) capturaram *Lutzomyia cortelezzii* naturalmente infectada com o agente etiológico da LV em áreas endêmicas no estado de Minas Gerais, enquanto que Pita-Pereira *et al.* (2008), detectaram infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* em pool de *Lutzomyia forattinii*. Os autores sugeriram que *L. forattinii* pode atuar como vetor de LV. Além disso, uma pesquisa desenvolvida por Santos *et al.* (2003), revelou que *L. (L.) longipalpis* não foi encontrada em seis localidades com notificações de casos autóctones de LV na cidade do Rio de Janeiro. Os autores sugeriram que *Lutzomyia firmatoi* e *Lutzomyia migonei*, capturadas nas áreas de pesquisa, poderiam atuar como vetores do parasito.

Além de pesquisas demonstrando a infecção natural observada de *L. (L.) longipalpis*, vários estudos avaliaram o comportamento alimentar e ecológico desse vetor relacionados à antropofilia. Entre 1999 a 2001, Camargo-Neves *et al.* (2007) avaliaram o hábito alimentar de *L. (L.) longipalpis* em Araçatuba (SP) utilizando reação de precipitina para identificar o conteúdo intestinal dos flebotomíneos. Os autores constataram que as amostras reagiram para sangue humano e para sangue de cães. Barata *et al.* (2005) também avaliaram o hábito alimentar de *L. (L.) longipalpis* e concluíram que a espécie tem hábitos alimentares ecléticos alimentando-se do sangue de seres humanos mas também de vários outros vertebrados, incluindo aves domésticas.

Vários indícios têm demonstrado que *Lutzomyia longipalpis* apresenta facilidade de adaptação em ambientes alterados pelo homem. Essa espécie

tem sido encontrada em abrigos de animais domésticos como aves, cães e porcos, mas também no intradomicílio caracterizando sua antropofilia (Oliveira *et al.*, 2003; Missawa & Dias, 2007; Ribeiro, *et al.*, 2007; Rangel & Vilela, 2008; Michalsky *et al.*, 2009). Essas informações são confirmadas por pesquisa realizada em Porteirinha (MG), por Barata *et al.* (2005) em que *L. (L.) longipalpis* foi a espécie mais abundante em bairros sob intensa ação antrópica e baixos níveis sócio-econômicos. Rebelo *et al.* (1999) em trabalho realizado em São Luís (MA) verificaram que *L. (L.) longipalpis* foi a espécie mais abundante em todos os ambientes pesquisados (área de mata, peridomicílio e intradomicílio), representando 66,37% do total de espécimes capturadas confirmando o poder adaptativo da espécie.

O número de machos da espécie *L. (L.) longipalpis* coletadas durante este estudo em Barcarena foi consideravelmente superior ao de fêmeas. O mesmo padrão foi observado por Michalsky *et al.* (2009), em Janaúba (MG) onde foi verificada uma superioridade dos machos em relação às fêmeas da espécie, sendo que, em algumas localidades os autores capturaram 78,72% de machos. Silva E. *et al.* (2007), em pesquisa realizada em Campo Grande (MS), capturaram 1.679 machos de *L. (L.) longipalpis* para 436 fêmeas, sendo a maioria dos espécimes capturados no peridomicílio. Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar este padrão. Uma dessas hipóteses sugere que os machos de *L. (L.) longipalpis* se agrupam nos locais de repasto sanguíneo com o propósito de se acasalarem (Oliveira *et al.*, 2003). Segundo alguns estudos, invertebrados e vertebrados utilizam mediadores químicos com o objetivo de encontrarem o parceiro sexual para acasalamento. Essas

substâncias produzidas por hospedeiros e vetores podem estar relacionadas com o maior número de machos do que de fêmeas de algumas espécies de flebotomíneos (Kelly & Day 1997; Oliveira *et al.*, 2003). Segundo Kelly & Day (1997), que estudaram a dinâmica de agregação de *L. (L.) longipalpis*, os machos da espécie chegavam primeiro que as fêmeas ao local de repasto sanguíneo e se agregavam atraídos pelos cairomônios produzidos pelos hospedeiros (galináceos). Segundo os autores, os machos produziram feromônios atraindo outros machos e fêmeas para acasalamento. Outra explicação é que as armadilhas teriam sido colocadas próximas aos criadouros atraindo, na maioria, os machos que nascem primeiro que as fêmeas (Oliveira *et al.*, 2003).

Foi observado neste trabalho que em outras espécies capturadas, o número de fêmeas foi sempre maior que o número de machos da mesma espécie. Os resultados obtidos por Resende *et al.* (2006) estudando a variação sazonal de *L. (L.) longipalpis* em Belo Horizonte (MG) corroboraram com esses dados. Os autores constataram que os machos representaram 83% do total de *L. (L.) longipalpis* capturados enquanto, nas outras espécies, as fêmeas foram mais abundantes representando 63% do total. O agrupamento de machos no local de repasto sanguíneo com a finalidade de acasalamento parece não ocorrer nas outras espécies como ocorre com a espécie *L. (L.) longipalpis* (Balbino *et al.*, 2005). Além disso, as fêmeas de algumas espécies são mais fototrópicas que os machos como ocorre com o subgênero *Psychodopygus* (Alexander, 2000).

Durante o estudo não foi encontrada evidência de urbanização de *L. (L.) longipalpis* no município de Barcarena. Contudo, o processo de urbanização dessa espécie tem sido observado em vários municípios brasileiros. Oliveira A. G. *et al.* (2006), fazendo coletas em Campo Grande (MS) capturaram 95,02% de *L. (L.) longipalpis* em área urbana e apenas 2,43% e 2,56% em área de mata e de borda de mata, respectivamente. Recentemente, De Paula *et al.* (2008), registraram o primeiro encontro de *L. (L.) longipalpis*, concomitante com o primeiro caso autóctone de LV, na área urbana do município de Uberlândia (MG). Outros autores têm mostrado que a urbanização do vetor da LV tem sido um fato cada vez mais freqüente. Oliveira *et al.* (2003) constataram que a urbanização de *L. (L.) longipalpis* tem se intensificado em Campo Grande (MS). Os autores realizaram estudo sobre a abundância da espécie na cidade durante 2004 e 2005 e compararam com a abundância capturada durante os anos de 1999 a 2000 verificando que o número de *L. (L.) longipalpis* aumentou de 71 para 4.615. Em Belo Horizonte (MG), o processo de urbanização de LV tem se intensificado segundo Da Luz *et al.* (2001). De acordo com os autores, 29 das 30 notificações de LV em 1994, na região metropolitana de Minas Gerais, foram provenientes de Belo Horizonte onde não há área rural. Entretanto, casos de LV já têm sido notificados em Belo Horizonte, na área metropolitana, desde 1989 no município de Sabará, onde ocorreu o primeiro caso humano relatado no estado (Souza *et al.*, 2008). A urbanização de *L. (L.) longipalpis* também foi evidenciada por Ximenes *et al.* (2007) em Natal (RN). Neste estudo, os autores constataram a presença da espécie, em grande freqüência, nas áreas peri urbanas, incluindo a região

metropolitana, o que torna evidente o poder de adaptação dessa espécie em ambientes antrópicos. A urbanização de *L. (L.) longipalpis* na cidade de Teresina (PI) foi observada recentemente por Silva J. *et al.* (2007), quando os autores realizaram capturas de flebotomíneos para verificação da taxa de infecção natural por *Leishmania sp.* Contudo, a urbanização da espécie na capital do Piauí foi relatada ainda na década de 90 quando 109 casos de LV foram registrados entre moradores do bairro Itararé (Costa C. *et al.*, 2007).

A ausência de *L. (L.) longipalpis* na cidade de Barcarena, no entanto, não exclui a possibilidade de que esta espécie esteja presente na área. Vale ressaltar que o esforço amostral empregado na área urbana durante este estudo no município de Barcarena com 1.310 km² (6 armadilhas durante 50 dias de excursão) foi proporcionalmente semelhante a outros estudos considerando a dimensão da área estudada. Silva E. *et al.* (2008), por exemplo, utilizaram 128 armadilhas durante 45 dias para capturar 1.174 flebotomíneos em área urbana do município de Campo Grande (MS) com 8.096 km². Na mesma cidade, Silva E. *et al.* (2007), utilizaram 96 armadilhas luminosas modelo HP durante 24 dias para capturarem um total de 2.275 flebotomíneos.

A armadilha luminosa CDC, utilizada neste trabalho, é a mais utilizada para captura de flebotomíneos em áreas silvestres e rurais (Davis *et al.*, 1995). Esta armadilha apresenta algumas vantagens como o uso de baterias que permitem deixá-las no local de coleta durante toda a noite e são menos laboriosas quando comparadas a outros métodos (Davies *et al.*, 1995). Outros trabalhos sugerem a superioridade das armadilhas luminosas CDC quando

comparadas a outros métodos. Andrade-Filho *et al.* (2001), em estudo sobre a fauna flebotomínica do Estado de Tocantins, compararam capturas de flebotomíneos utilizando armadilhas luminosas CDC com captura por atração humana. Os autores verificaram um baixo índice de flebotomíneos capturados usando atração humana (16) quando comparado com armadilhas luminosas CDC (2.661). Um estudo comparativo de metodologias para captura de flebotomíneos também foi realizado por Galati *et al.* (2006) na Serra da Bodoquena, Estado do Mato Grosso do Sul. Os autores realizaram capturas de flebotomíneos utilizando quatro métodos: armadilha luminosa CDC, armadilha Shannon, aspirador e atração humana. Como resultado, os autores verificaram que 35% dos espécimes e 99% das espécies foram capturados com armadilha luminosa e que a espécie *L. (L.) longipalpis* não foi capturada por método de atração humana, tão pouco pela utilização de armadilhas tipo Shannon.

No entanto, a eficiência das armadilhas tipo CDC em área urbana é eventualmente questionada pois, como utiliza luz como atrativo, pode ter seu desempenho prejudicado devido a iluminação artificial presente nestas áreas. Visando minimizar este efeito e aumentar a possibilidade de captura de flebotomíneos, foram utilizadas aves (galináceos) como fonte complementar de atração para os flebotomíneos. Sendo assim, as armadilhas foram colocadas em galinheiros, pois as aves exercem forte atração sobre os vetores no peridomicílio (Alexander *et al.*, 2002). Os flebotomíneos não só se alimentam do sangue das aves como também podem utilizar os abrigos desses animais como ambientes de repouso (Alexander *et al.*, 2002). A forte atração de flebotomíneos por aves (galináceos) também foi observada por Oliveira *et al.*

(2008) em Campo Grande (MS). Dos 327 espécimes de *L. (L.) longipalpis* capturados, 142 fêmeas estavam engurgitadas com sangue de aves e de humanos. Esses dados são concordantes com o trabalho de Missawa *et al.* (2008) em que as aves representaram 30,8% da preferência alimentar de *L. (L.) longipalpis*.

Embora o vetor não tenha sido capturado na área urbana, faz-se necessário o monitoramento da fauna flebotomínica no município, sobretudo em áreas urbanas visando diagnosticar o processo de urbanização de *L. (L.) longipalpis*, uma vez que a espécie foi capturada em grande abundância em áreas de borda de mata localizadas próximas às áreas intermediárias com intensa ocupação humana.

A segunda e a terceira espécies mais abundantes na área foram *L. (N.) flaviscutellata* e *L. (S.) sordellii*. *L. (N.) flaviscutellata* também apresenta importância epidemiológica sendo incriminada como vetor de *Leishmania (L.) amazonensis*, agente etiológico de leishmaniose tegumentar (Marcondes, 2001). A espécie foi a mais abundante em área de mata (73,33%) e a segunda mais abundante em área de borda de mata (26,67%). Estes dados sugerem que *L. (N.) flaviscutellata* apresenta baixa antropofilia e pouca adaptação a ambientes alterados. Resultados semelhantes foram obtidos por Rebêlo *et al.* (1999) onde 69,8% foram capturados em área de mata. Oliveira *et al.* (2003), ao realizarem pesquisa da fauna de flebotomíneos em Campo Grande também verificaram maior abundância da espécie *L. (N.) flaviscutellata* em área de mata (5), em relação ao peridomicílio (1). Apesar de *L. (N.) flaviscutellata*, bem como todas as outras, não ter sido capturada na área urbana de Barcarena

durante este estudo, há relatos desse vetor em áreas urbanas de Cuiabá (MT) (Ribeiro *et al.*, 2007). Este fato tem grande importância epidemiológica visto que *L. (N.) flaviscutellata* até então era descrita como uma espécie de hábitos estritamente silvestres (Barros *et al.*, 2000; Aguiar & Medeiros, 2003).

Outras espécies com possível importância epidemiológica capturadas em Barcarena são *L. antunesi* e *L. (P.) paraensis*, representando menos de 1% do total de flebotomíneos capturados. Essas espécies estão relacionadas com a transmissão de *Leishmania* sp. no estado do Pará (Rangel & Lainson, 2003; Silva-Nunes *et al.*, 2008). Estudos mais detalhados sobre a biologia de *L. (P.) paraensis* já vêm ocorrendo desde 1979 no Pará quando foi realizado o levantamento da fauna flebotomínica em Monte Dourado (PA) (Rangel & Lainson, 2003). Posteriormente, *L. (P.) paraensis* naturalmente infectado com *Leishmania (Viannia) naiffi*, foi capturada em Benevides-PA (Rangel & Lainson, 2003).

O município de Barcarena não apresenta registro de casos autóctones de leishmaniose tegumentar. No entanto, a presença de espécies vetoras na área, tanto em área de mata quanto em borda de mata, sugere a possibilidade de estabelecimento do ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar na cidade de Barcarena. Além disso, cabe ressaltar que embora *Lutzomyia sordellii* não esteja relacionada com veiculação de *Leishmania* sp, a espécie foi a única capturada em área intermediária sugerindo a possibilidade de urbanização dessa espécie. Estes dados enfatizam a necessidade de monitoramento entomológico no município de Barcarena.

As áreas de mata e borda de mata dos dois transectos avaliados neste estudo apresentam características ambientais distintas. O primeiro transecto, representado por invasão antiga, apresenta área de borda de mata bastante arborizada. A localidade é pouco habitada e, segundo os moradores, apresenta grande circulação de animais domésticos e silvestres. É possível que essas características tenham estado relacionadas com a maior abundância e riqueza dos flebotomíneos (4.576 espécimes e 10 espécies) capturados durante o experimento. O segundo transecto, no qual as invasões são mais recentes, a área de borda de mata apresenta maior impacto antrópico sendo menos arborizada. Além disso, a densidade humana é maior, características que justificariam a menor riqueza e a menor abundância de flebotomíneos na área (513 espécimes e 5 espécies).

Além disso, considerando que após a remoção da vegetação, os flebotomíneos possam levar um determinado tempo para se adaptar e colonizar a área degradada, a maior riqueza e abundância do primeiro transecto são justificadas por ser uma área de invasão antiga, portanto, com mais tempo para o processo de adaptação dos insetos.

Vale também ressaltar a abundância de *L. (L.) longipalpis* em relação às outras espécies em área de borda de mata do segundo transecto, onde foram capturados 500 espécimes de *L. (L.) longipalpis* e apenas 13 flebotomíneos de outras espécies. Este fato sugere que o principal vetor da LV tem maior adaptação a ambientes alterados do que as outras espécies de flebotomíneos capturadas na área. Esses resultados são semelhantes aqueles encontrados por Oliveira *et al.*, (2003) em MS quando avaliaram a ocorrência de

flebotomíneos em Campo Grande, onde apenas 5 espécies, de um total de 29, foram encontradas em área urbana, sendo que *L. (L.) longipalpis* representou a espécie com maior abundância (49%). Ribeiro *et al.* (2007) observaram que *L. (L.) longipalpis* apresentou os maiores índices de captura em áreas de ocupação de terra do que as outras espécies capturadas.

4.2 TAXA DE INFECÇÃO

Embora Barcarena seja considerada uma área endêmica de LV e as condições epidemiológicas (baixo nível econômico, degradação ambiental e circulação de animais domésticos) tenham sido preenchidas para a ocorrência de infecção nas áreas de coleta, os resultados da análise microscópica foram negativos, sendo posteriormente, confirmados pela PCR. Vários trabalhos sobre infecção natural de flebotomíneos utilizando as técnicas de análise microscópica e molecular por PCR têm sido realizados evidenciando uma baixa taxa de infecção natural em torno de 1%. Dentre esses trabalhos, destaca-se o de Nascimento *et al.* (2007), que realizaram procedimentos semelhantes aos deste estudo, com análise microscópica seguida de análise molecular nas mesmas amostras coletadas pelo grupo. Os autores dissecaram 81 fêmeas e constataram apenas uma infecção por análise microscópica. As amostras foram separadas em 13 grupos e submetidas a análise por PCR resultando em oito amostras positivas. Neitzke *et al.* (2008) analisaram 2.487 fêmeas e verificaram uma infecção de 0,04% por flagelados através de análise microscópica e 0% de infecção através da análise molecular com *primers* para amplificar os genes do subgênero *Viannia*. Estes resultados estão de acordo

com os dados obtidos no presente trabalho onde não foi possível observar infecção por análise molecular.

O baixo índice de infecção natural também foi confirmado por Savani *et al.* (2009) em pesquisa sobre infecção natural em *Lutzomyia almerioi* e *L. (L.) longipalpis*. Os autores dissecaram 1.395 fêmeas pertencentes a 14 espécies e verificaram três infecções por flagelados representando 0,22%. Dentre as fêmeas dissecadas, os autores submeteram 1.220 pertencentes às espécies *L. almerioi*, *L. (L.) longipalpis* e *L. whitmani* a análise por PCR com resultado de 1,23% positivo para *Leishmania* sp. comprovando maior sensibilidade da análise molecular sobre a análise microscópica.

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva E. *et al.* (2008) em trabalho realizado na área urbana de Campo Grande (MS). Dos 1.174 flebotomíneos capturados, 105 foram submetidos à extração de DNA e análise molecular (PCR) para amplificação de DNA de *Leishmania* sp. onde os autores verificaram que a PCR foi positiva para apenas três (1,9%) das amostras submetidas à análise. Outro estudo que verificou baixa taxa de infecção natural foi realizado por Silva J. *et al.* (2007). Em trabalho realizado em Teresina (PI), os autores dissecaram 1.832 fêmeas de *L. (L.) longipalpis* capturadas no Bairro Bela Vista considerado região endêmica para LV, apenas 20 (1,1%) das fêmeas dissecadas apresentaram-se positivas para formas evolutivas de *Leishmanias* sp. analisadas ao microscópio óptico.

Galati, *et al.* (2006), em trabalho sobre a fauna flebotomínica na Serra da Bodoquena (MS), realizaram análise microscópica nas fêmeas coletadas para verificar infecção natural. De um total de 2.173 fêmeas de *L. almerioi*

dissecadas, três (0,13%) apresentaram infecção natural por flagelados confirmando a baixa taxa de infecção natural.

Os resultados deste trabalho realizado em Barcarena também são concordantes com um trabalho realizado no município de Janaúba MG. Os autores capturaram durante 2005 a 2007, 13.480 (92,39%) espécimes de *L. (L.) longipalpis* dentre outras espécies. Em um dos bairros pesquisados (Algodões), onde há registro de 28.3% dos casos de LV canina, foram capturados 42% do total de *L. (L.) longipalpis* durante o estudo. Apesar de ser uma área com características sócio-ambientais muito semelhantes as do bairro Araticu nenhum caso de LV foi registrado em Algodões até 2006 (Michalsky *et al.*, 2009).

Portanto, os resultados negativos para a análise microscópica e molecular realizadas neste estudo são atribuídos, provavelmente, a baixa taxa de infecção natural e não a falta de infecção nas áreas pesquisadas considerando que o município de Barcarena notificou 301 casos de LV humana entre 2000 e 2008.

4.3 DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LV NO MUNICÍPIO DE BARCARENA-PA

A avaliação da distribuição dos casos de LV no município de Barcarena, no período de 2000 a 2008, demonstrou uma incidência maior da doença em comunidades periféricas com colonização mais antiga e maior cobertura vegetal. Estes dados estão de acordo com o levantamento entomológico realizado neste estudo onde se encontrou maior abundância e riqueza de flebotomíneos em áreas de borda de mata com colonização mais antiga.

Nestas áreas verificou-se que os moradores habitam bem próximo à mata onde também desenvolvem atividades como o plantio de subsistência e atividades recreativas em igarapés. Além desses comportamentos que aproximam esses moradores dos vetores, animais domésticos circulavam livremente no peridomicílio servindo de fonte de alimento para os flebotomíneos e, no caso dos cães, como reservatórios dos parasitos. Essas condições foram relatadas também por Freitas *et al.* (2006) em estudo sobre levantamento de casos de LT no Paraná. Ressalta-se que, diferentemente da maioria dos municípios brasileiros, o município de Barcarena apresenta a maior parte da população (62,91%) vivendo em área rural, portanto oferecendo condições eco-epidemiológicas para manutenção da doença. Entretanto, Barcarena se assemelha a vários municípios brasileiros quanto ao crescimento desordenado onde famílias migram das áreas rurais para periferia da cidade desmatando e constituindo aglomerados humanos sem condições básicas de infra-estrutura. Processo semelhante foi observado por Dantas-Torres & Brandão-Filho (2006) em estudo que avaliou a expansão geográfica de LV no Estado de Pernambuco onde os autores registraram um aumento de casos na região metropolitana de Recife atribuído ao intenso fluxo migratório do interior do Estado para a região metropolitana. Essa dinâmica de movimentos migratórios que influenciam na distribuição e urbanização de LV também foi verificada por Ximenes *et al.* (2007) onde os autores relacionaram a migração da população de áreas rurais para a periferia da cidade ao aumento de LV no Rio Grande do Norte. No município de Barcarena, os bairros Pioneiro e Laranjal, que registraram 14 e 9 casos respectivamente de LV entre 2000 a 2008, são

exemplos do crescimento desordenado estabelecidos no município. Mais recentemente, há aproximadamente quatro anos, surgiu o bairro Barbolândia, uma área sob intensa ação antrópica que permitem a colonização do vetor e conseqüente estabelecimento da doença, onde foram capturados 500 flebotomíneos da espécie *L. (L.) longipalpis* durante este estudo.

A Secretaria Municipal de Saúde de Barcarena tem considerado os casos de LV relatados no perímetro urbano como alóctones. Este estudo não evidenciou a existência de *Lutzomyia longipalpis* na área urbana o que corrobora com este dado da prefeitura.

A avaliação dos casos no período de 2000 a 2008 também demonstrou uma superioridade de casos masculinos em relação aos femininos o que pode sugerir que a infecção tem influência comportamental e que os indivíduos do sexo masculino estariam mais expostos em decorrência de atividades ocupacionais e de lazer como sugerem Freitas *et al.* (2006) e Castro *et al.* (2002), em levantamentos de casos de leishmaniose no Paraná. Oliveira A. L. *et al.* (2006) descrevendo características clínico-epidemiológicas de LV em Três Lagoas (MS), verificaram que 71,1% dos casos de LV ocorreram em indivíduos do sexo masculino predominando no grupo economicamente ativo.

Avaliando-se os dados, por faixa etária, observou-se grande número de casos na infância (0 a 12 anos) onde o efeito ocupacional não atua. Esses dados corroboram com os resultados de Oliveira A. L. *et al.* (2006) que encontraram o maior percentual na faixa etária compreendida entre 0 a 9 anos. Dados semelhantes também foram encontrados por Silva *et al.* (2008) que estudaram a situação epidemiológica da leishmaniose visceral em São Luís

(MA). Os autores constataram que 83% dos casos em São Luís entre 2004 e 2006 ocorreram em crianças na faixa etária de 0 a 9 anos. Esta classe etária, muito provavelmente, se infecta na área domiciliar. Não houve diferença significativa dos casos de LV entre os sexos na faixa etária entre 0 a 12 anos, sugerindo que não há influência ocupacional neste grupo. A ausência de diferença significativa entre os sexos também foi verificada na população idosa (> 58 anos) ratificando que a predominância de infecção no sexo masculino se dá, principalmente, quando os indivíduos se encontram em idade em que desenvolvem alguma atividade econômica. Portanto, esses dados indicam que crianças de 0 a 12 anos, independente do sexo, e homens em idade economicamente ativa foram os grupos mais afetados pela LV no período de 2000 a 2008 em Barcarena.

5. CONCLUSÃO

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

- O município de Barcarena apresenta uma rica fauna flebotomínea sendo a espécie *L. (L.) longipalpis* a mais abundante;

- *L. (L.) longipalpis* ocorreu em maior abundância em área de mata e em área de borda de mata, portanto sendo a espécie melhor adaptada nas áreas mais alteradas por ação antrópica em Barcarena;

- Em Barcarena, há espécies envolvidas com a transmissão de Leishmaniose Tegumentar. Portanto, há a possibilidade de instalação da doença no município;

- Não foi detectada infecção por *Leishmania* sp. pela análise microscópica, o que sugere uma baixa infecção das amostras analisadas;

- A análise molecular não revelou amostras positivas para *Leishmania* sp. confirmando a análise microscópica;

- Das vinte localidades onde ocorreram casos de Leishmaniose visceral entre 2000 e 2008, as que apresentaram maiores números são as representadas por ocupações mais antigas;

- Áreas urbanas como Vila dos Cabanos e Sede notificaram casos. Este fato sugere a possibilidade da presença do vetor nestas áreas;

- Crianças até 12 anos representam o grupo mais atingido pela leishmaniose visceral em Barcarena;

- Entre os adultos, indivíduos do sexo masculino em idade economicamente ativa apresentam maior incidência da doença. Portanto, a leishmaniose visceral em Barcarena apresenta uma característica ocupacional;

- São necessários estudos que dêem continuidade a pesquisa de flebotomíneos em Barcarena e que verifiquem o processo de urbanização do vetor da leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M. MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL E. F., LAINSON, R., **Flebotomíneos do Brasil**. Fiocruz. RJ. P. 207-245. 2003.
- ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 14. p. 109-122, 2000.
- ALEXANDER, B., CARVALHO, R., L., MCCALLUM, H., PEREIRA, M., H., Role of the Domestic Chicken (*Gallus gallus*) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Centro de Pesquisas René Rachou**. v. 8 (12) p. 1480-1485, 2002.
- AMARAL, D., D., BASTOS, M., N., C., SILVA, A., S., L., OLIVEIRA, J., LOBATO, R., C., LOBATO, L., C., B., ROSÁRIO, C., S., GOMES, A., SILVA, C., A., AGUIAR, J. Inventário da flora da região de Barcarena, PA. Relatório final. Ministério da Ciência e Tecnologia. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém-PA. p. 1-64, 2002.
- ANDRADE-FILHO, J., D., VALENTE, M., B., ANDRADE, W., A., BRAZIL, R., P. FALCÃO, A., L. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Díptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34(4), p. 323-329, 2001.
- ARANSAY, A. M., SCOULLICA, F., TSELENTS, Y. Detection and identification of *leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplasmic DNA. **Applied and Environmental**

Microbiology, p. 1933–1938, 2000.

AYRES, M. AYRES, J. R. M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. Bioestat 4.0 Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Sociedade Civil Mamirauá, MCT, 4ª Edição, 2006.

BALBINO, V. Q., COUTINHO-ABREU, I. V., SONODA, I. V., MARQUES DA SILVA, W. MARCONDES, C. B Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic forest in Recife, Pernambuco state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology. v. 99(7)** p. 683-693, 2005.

BAÑULS, A., HIDE, M., PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology v. 64** p. 1-113, 2007.

BARATA, R. A., SILVA, J. C. F., COSTA, R. T. FORTES-DIAS C. L., SILVA, J., C., DE PAULA, E., V., PRATA, A., MONTEIRO, E., M., DIAS, E., S. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, an Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99 (5)**, p. 481-487, 2004.

BARATA, R. A., SILVA, J. C. F., MAYRINK, W., SILVA, J. C., PRATA, A., LOROSA, E. S., FIÚZA, J. A., GONÇALVES, C. M., PAULA, K. M., DIAS, E.D. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista**

- da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38(5), p. 421-425, 2005.
- BARROS, V. L. L., REBÊLO, J. M. M., SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do Município do Paço do Luminar, Estado do Maranhão, Brasil. Área de transmissão de leishmaniose. **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 16(1), p. 265-270, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: MS, 2006. p. 9-101.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Distribuição da Leishmaniose no Brasil. Brasília: MS, 2008. Disponível em: < <http://www.Ministerio da Saude.gov.br>> Acesso em 07/10/2008.
- BRAZIL R., P. & BRAZIL B. G. **Biologia de Flebotomíneos Neotropicais** In: CAMARGO-NEVES, V. L. C., RODAS, L. A. C., GOMES, A. C., Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**. v. 4 (39), 2007.
- CARVALHO, G. M. L., ANDRADE FILHO, J. D., FALCÃO, A. L., LIMA, A. A. C. V., M. R., GONTIJO, C. M. F. Naturally Infected *Lutzomyia* San Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** v. 8 (3) p. 407-414, 2008.
- CASTRO, E. A., SOCCOL, V. T., MEMBRIVE, N., LUZ, E. Estudos das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35(5), p. 445-452, 2002.

- CHAGAS E., CUNHA, A. M., FERREIRA, L. C., DEANE, L., DEANE, G., GUIMARÃES, F. N., PAUMGARTTEN, M. J., SÁ, B. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 33** (1), p. 89-229, 1938.
- CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R.W., ALVAR, J., BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Tropical Diseases, v. 5**, s7-s16, 2007.
- COSTA, C. H. N., Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 24**(12), p. 2959-2963, 2008.
- COSTA, C. H. N., TAPETY, C. M. M., WERNECK G. L., Controle de leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 40**(4), p. 415-419, 2007.
- COSTA, S. M., CECHINEL, M., BANDEIRA, V., ZANNUNCIO, J. C., LAINSON R., RANGEL, E.F. *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, Rio de Janeiro, v. 102**(2), p. 149-153, 2007.
- DA LUZ, Z. M., PIMENTA, D. N., CABRAL, A. L. L. V., FIÚZA, V. O. P.,

- REBELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 34(3)**, p. 3249-254, 2001.
- DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P., Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 39(4)**, p. 352-356, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology. v. 149**, p. 139-146, 2007.
- DAVIS, C. R., LANE, R. R., VILLASECA, P., PYKE, S., CAMPOS, P., LLANOS-CUENTAS, A. The relationship between CDC light-trap and human-bait catches of endophagic sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. **Medical and Veterinary Entomology. v. 9** p. 241-248, 1995.
- DEANE, M. P., & DEANE, L., M. Infecção natural por *Phlebotomos longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em foco de calazar, no Ceará. **Hospital, Rio de Janeiro, v. 45**, p. 697-702, 1954.
- DE PAULA, M. B. C., RODRIGUES, E. A. S., SOUZA, A. A., DOS REIS, A. A., DE PAULA, F. P., NETO, A. A. P., LIMONGI, J. E., Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Uberlândia, MG, concomitante com relato de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 41(3)**, p. 304-305, 2008.

- DIAS E. S., FRANÇA-SILVA, J. C., SILVA, J. C., MONTEIRO, E. M., PAULA, K.M., GONÇALVES, C.M., BARATA, R.A. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. **40**(1), p. 49-52, 2007.
- DIAS, F. O. P., LOROSA, E. S., REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. **16**(1), p. 217-218, 2003.
- DINIZ, S. A., SILVA, F. L., NETA, A. V. C., BUENO, R., GUERRA, R. M.S.N.C., ABREU-SILVA, A.L., SANTOS, R.L. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban áreas. **Infect Developing Countries**, v. **2** (1), p. 24-33, 2008.
- DOUGHERTY, M., J., WARD, R., D., Methods of reducing *Ascogregarina chagasi* parasitaemia in laboratory colonies of *Lutzomyia longipalpis*. In: **Proceedings of the First International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Parasitologia** p. 33: 185-191, 1991.
- DUJARDIM J. C. Risk Factors in the Spread of Leishmaniasis: Towards Integrated Monitoring? **Trends in Parasitology** v. **22**, 2006.
- FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of leishmania – a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. **89**(3), p. 463-469, 1994.
- FILHO, J. D. A., SILVA, A. C. L., FALCÃO, A. L. Phlebotomine sand flies in the

State of Piauí, Brazil (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96(8)**, p. 1085-1087, 2001.

FREITAS, J. S., SANTANA, R. G., MELO, R. S., Levantamento dos casos de leishmaniose registrados no município de Jussara, Paraná, Brasil. **Arq.Ciência Saúde Unipar, Umuarama, v. 10 (1)**, 2006.

FORATTINI, O. P., SANTOS M. R. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* (Lutz & Neiva, 1912) por formas em leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública. v. 17**, p. 171-174, 1952.

GALATI, E. A. B., NUNES, V., BOGGIANI, P. C., DORVAL, M. E. C., CRISTALDO, C., ROCHA, H. C., OSHIRO, E. T., DAMASCENO-JÚNIOR, G. A., Phlebotomines (Díptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101(2)**, p. 175-193, 2006.

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Desmatamento no Município de Barcarena-Pa. Disponível em: <
<http://www.inpe.br/noticias/galeria.php>> Acesso em: 15/03/08

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Coordenação Geral de Observação da Terra (OBT). Disponível em: <
<http://www.inpe.br/noticias/arquivos/pdf/relatório.php>> Acesso em:
16/08/09

KRAUSPENHAR, C., BECK, C., SPEROTTO, V., SILVA, A. A., BASTOS, R.,

- RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 37(3) p. 907-910, 2007.
- KELLY, D. W., DYE, C. Pheromones, kairomones and aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Animal Behaviour**, v. 53, p.721-731, 1997.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 4 p. 1-24, 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R., KILLICK-KENDRICK, M., FOCHEUX C., DEREURE, J., PUECH, M. P., CADIERQUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by destametrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 105-111, 1997.
- KOVATS, R.S., LENDRUM, D.H.C., McMICHAEL, A.J., WOODWARD, A. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? **The Royal Society London**, v. 356, p. 1057-1068, 2001.
- LAINSON, R., SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil: Observations on enzootic Rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flavisutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazon basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62 p. 385-395, 1968.
- LAINSON R., RANGEL E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 100(8), p. 811-827, 2005.

- LAINSON, R., RANGEL, E. F. **Ecologia das Leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil** In: RANGEL E.F., LAINSON, R., **Flebotomíneos do Brasil**. Fiocruz. RJ. p. 291-305, 2003.
- LIMA, A. G. D., GUEDES, M. L.S., SHERLOCK, I.A., Horizontal Stratification of the Sand Fly Fauna (Díptera: Psychodidae) in a Transitorial Vegetation between Caatinga and Tropical Rain Forest, State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98(6)**, p. 733-737, 2003.
- LUZ, Z. M. P., PIMENTA D. N., CABRAL, A.L.L.V., FIÚZA, V. O. P., RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 34(3)**, p. 249-254, 2001.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. Editora Atheneu. São Paulo. 2001.
- MARTINS, A. V., FALCÃO A. L., SILVA J. E., DIAS E. E. Nota sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938), com descrição da Fêmea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 79(4)**, p. 439-442, 1984.
- MARZOCHI, M. C. A., COITINHO, S. G., SABROZA, P. C., SOUZA, M. A., SOUZA, P. P., TOLEDO, L. M., FILHO, F. B. R. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1(4)** p.432-446, 1985.
- MICHALSKY, E. M., FORTES-DIAS, C. L., PIMENTA, P. F. P., SECUNDINO,

- N. F. C., DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* sp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **44**(5) p. 255-259, 2002.
- MICHALSKY, E. M., FRANÇA-SILVA, J. C., BARATA, R. A., SILVA, F. O., L., LOUREIRO, A. M. F., FORTES-DIAS, C. L. DIAS, E. S., Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **v. 104** (1), p. 56-61, 2009.
- MIRANDA, J. C., REIS, R., SCHRIEFER, A., GONÇALVES, M., REIS, G. R., CARVALHO, L. FERNANDES, O., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in Brazilian endemic area as assessed by Pimpoint capture and Polimerase Chain Reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **v. 97** (2), p. 185-188, 2002.
- MISSAWA, A. N & MACIEL, G. B. M. L. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. **v. 39**(4), p. 337-340, 2006.
- MISSAWA, A. N & MACIEL, G. B. M. L. List of species in the genus *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) from the state of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. **v. 40**(1), p. 11-14, 2007.

- MISSAWA, A. N., VELOSO M. A. E., MARCIEL, G. B. M., SOUZA, C. O., RANGEL, E. F., MICHALSKY, E. M. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso. In: XXII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses. p. 74, 2006.
- MISSAWA, A. N., DIAS, E. S. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 102(8), p. 913-918, 2007.
- MISSAWA, A. N., LOROSA, E. S., DIAS, E. S., Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41(4), p. 365-368, 2008.
- MORTON, D. C., DEFRIES, R. S., SHIMABUKURO, Y. E., ANDERSON, L. O., ARAIS, E., SANTO, F. B. E., FREITAS, R., MORISETTE, J. Cropland expansion changes deforestation dynamics in the southern Brazilian Amazon. **PNAS**, v. 103(39), 14641, 2006.
- NASCIMENTO, J. C., PAIVA, B. R., MALAFRONTA, R. S., FERNANDES, W. D., GALTÍ, E. A. B. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 49(2), p. 119-122, 2007.
- NEITZKE, H. C., SCODRO, R. B. L., DE CASTRO, K. R. R., SVERSUTTI,

- A. C. D., SILVEIRA, T. G. V., TEODORO, U. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41(1), p. 17-22, 2008.
- OLIVEIRA, A. G., FILHO, J. D. A., FALCÃO, A. L., BRASIL, R. P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 19(4) p.933-944, 2003.
- OLIVEIRA, A. G., GALATI, E. A. B., OLIVEIRA, O., OLIVEIRA, G. R., ESPINDOLA, I., A., C., DORVAL, M., E., C., BRAZIL, R., P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 101(8), p. 869-874, 2006.
- OLIVEIRA, A. G., GALATI, E. A. B., FERNANDES, C. E., DORVAL, M. E. C., BRAZIL, R., P. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica** v. 105, p. 55–61, 2008.
- OLIVEIRA, A. L. L., PANIAGO, A. M. M., DORVAL, M. E. C., OSHIRO, E. T., LEAL, C.J., SANCHES, M., CUNHA, R.V., BÓIA, M.N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39(5), p. 446-450, 2006.
- OLIVEIRA, A. G., MARASSÁ, A. M., CONSALES, C. A., DORVAL, M. E. C.,

FERNANDES, C., E., OLIVEIRA, G., R., BRAZIL, R., P., GALATI, E., A., B. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, p. 238-241, 2008.

PACHECO, A S., SILVA, A. S. L., MEDEIROS, C. G., OLIVEIRA, C. D. C., SOUZA, E. F., AMARANTE, E.S., LOPES, J.A.S., PACHECO, J.J., SILVA, M.A.M., MOREIRA, M.G.P., ROCHA, N.A., COUTO, S.J.M., FREITAS, Z. Estatística Municipal de Barcarena-Pa. Governo do Estado do Pará. Secretaria Especial de Gestão, Secretaria Executiva de Estado e Planejamento, Orçamento e Finanças (SEPOF). Belém-Pa, 2007.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., SILVA-ANTUNES, I., MORGADO, A. A., MENZ I., PALATNIK, M., LAVOR, C., Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v. 27, p. 3505-3512, 2009.

PATZ, J. A., GRACKY, T. K., GELLER, N., VITTOR, A. Y. Effects of Environmental Change on Emerging Parasitic Disease. **International Journal For Parasitology**, v. 30 p. 1395-1405, 2000.

PATZ, J. A., DASZAK, P., TABOR, G. M., AGUIRRE, A. A., PEARL, M., EPSTEIN, J., WOLFE, N.D., KILPATRICK, A.M., FOUFOPOULOS, J., MOLYNEUX, D., BRADLEY, D.J., Unhealthy Landscape: Policy Recommendations on Land Use Change and Infectious Disease Emergence. **Environmental Health Perspectives**, v. 112(10) p. 1092-1098, 2004.

- PESSOA, F. A. C., MEDEIROS, J.F., BARRETT, T.V. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102(5), p. 593-599, 2007.**
- PIMENTA, P. F. P., SECUNDINO, N. F. C., BLANCO, E. E. N. **Interação Leishmania-hospedeiro Invertebrado** In: RANGEL E.F., LAINSON, R., **Flebotomíneos do Brasil.** Fiocruz. RJ. p. 275-289, 2003.
- PITA-PEREIRA, D., CARDOSO, M. A. B., ALVES, C. R., BRAZIL, R. P., BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic área of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica, v. 107, p. 66-69, 2008.**
- PUGEDO, H., BARATA, R. A., FRANÇA-SILVA, J. C., SILVA, J. C., DIAS, E. S. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 38(1), p. 70-72, 2005.**
- RANGEL, E. F., LAINSON, R. **Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana.** In: RANGEL E.F., LAINSON, R., **Flebotomíneos do Brasil.** Fiocruz. RJ. p. 291-305, 2003.
- RANGEL, E. F. & VILELA M. L., *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 24(12) p.2948-2952, 2008.**
- REBÊLO, J. M. M., ARAÚJO, J. A. C., CARVALHO, V. L. L. B., SILVA, F. S.,

- OLIVEIRA, S.T. Flebótomos (Díptera: Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 32(3)**, p. 247-253, 1999.
- RESENDE, M. C., CAMARGO, M. C. V., VIEIRA, J. R. M., NOBI, R. C. A., PORTO, N. M. N., OLIVEIRA, C. D. L., PESSANHA, J. E., CUNHA, M. C. M., BRANDÃO, S.T. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 39(1)**, p. 51-55, 2006.
- RIBEIRO, A. L. M., MISSAWA, N. A., ZEILHOFER, P. Distribution of Phlebotomine Sandflies (Díptera: Psychodidae) of Medical Importance in Mato Grosso State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v. 45(5)**, p. 317-321, 2007.
- RYAN, L., LAINSON, R., SHAW, J.J., WALLBANKS, K.R. The transmission of suprapylarian *Leishmania* by the bite of experimentally infected sand flies (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 82(3)**, p. 425-430, 1987.
- RYAN, L., SILVEIRA, F. T., LAINSON, R., SHAW, J. J., Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 78**, p. 547-548, 1984.
- SANTOS, S. O., ARIAS, J., RIBEIRO A. A., HOFFMANN M. P., FREITAS R. A., MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of american visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology v. 12** p. 315-317, 1998.

- SANTOS, S. O., ARIAS, HOFFMANN M. P., FURLAN, M. B. G., FERREIRA, W.F.F., PEREIRA, C., FERREIRA, L. The Presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of american visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. V. 36(5)**, p. 633-634, 2003.
- SAVANI, E. S. M. M., SCHIMONSKY, B. V., CAMARGO, M. C. G. O., D'AURIA, S. R. N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de area não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública. V. 37(2)**, p. 260-262, 2003.
- SAVANI, E. S.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M. C.; DE CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; DOS SANTOS, M. G.; D'AURIA, S.R.; SHAW, J.J.; FLOETERWINTER, L.M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology, v. 120, n. 3, p. 229-233**, 2004.
- SAVANI, E. S. M. M., NUNES, V. L. B., GALATI, E. A. B., CASTILHO, T. M., ZAMPIERI, R., A., FLOETER-WINTER, L., M., The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Barzil. **Veterinary Parasitology, v. 160, p. 18-24**, 2009.
- SILVA, A. M., CAMARGO, N. J., SANTOS, D. R., MASSAFERA, R.,

- FERREIRA, A., C., POSTAI, C., CRISTÓVÃO, E., C., KONOLSAISEN, J., F., JÚNIOR, A., B., PERINAZO, R., TEODORO, U., GALATI, E., A., B. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, v. 37 (2) p. 209-225, 2008.
- SILVA, A. S. & BRAGA, G. M. S. Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 15(2) p. 101-102, 2008.
- SILVA, E. A., ANDREOTTI, R., HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40(4) Uberaba July/Aug. 2007.
- SILVA, E. A., ANDREOTTI, R., DIAS, E. S., BARROS, J. C., BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology** v.119 p. 343–348, 2008.
- SILVA, A. R., TAUIL, P. L., CAVALCANTE, M. N. S., MEDEIROS, M. N., PIRES, B. N., GOLÇALVES, E. G. R. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41(4) p. 358-364, 2008.
- SILVA, E., GONTIJO, C. M. F., PACHECO, R., FIUZA, V.O p., BRAZIL R. P.

- Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. **96**(3), p. 285-291, 2001.
- SILVA, J. G. D., WERNECK, G. L., CRUZ, M. S. P., COSTA, C. H. N., MENDONÇA, I., L., Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania sp.* em Teresina, Piauí, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v. **23**(7), 2007.
- SILVA-NUNES, M., CAVASINI, C. E., SILVA, N. S., GALATI, E. A. B. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11(2), p. 241-251, 2008.
- SOUZA, M. B., CARVALHO, R. W., MACHADO, R. N. M., WERMELINGER, E. D. Flebotomíneos de áreas com notificações de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 53(1), p. 147-150, 2009.
- SOUSA, R. G., SANTOS, J. F., RODRIGUES, H. G., AVERSI-FERREIRA, T., A. Casos de leishmaniose visceral registrados no município de Montes Claros, Estado de Minas Gerais. **Acta Sci. Health**, v. **30** (2) p. 155-159, 2008.
- SOUZA, M. B., MARZOCHI, M. C. A., CARVALHO, R. W., RIBEIRO, P. S., PONTES, C.S., CAETANO, J.M., MEIRA, A.M. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Caderno Saúde Pública**, v. **19**(6). 2003.

SUDIA, W. A. & CHAMBERLAIN, R.W. Battery-operated light trap: an improved model. **Mosq. News, Aliso Viejo**, v. 22(2), p. 126-129, 1962.

TAUIL, P. L., Perspectiva de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39(3). 2006.

TORMEN S. H., NASCIMENTO, J. C. Levantamento da Fauna Flebotomínica Relacionado ao Surto de Leishmaniose Tegumentar Americana em Blumenau – SC, **Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE)**, 2006.

World Health Organization. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly epidemiological record**. 44, p. 365-372, 2002.

World Health Organization. Leishmaniasis – Magnitude of the Problem.

2007 Disponível em: < <http://www.WHO.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.html>> Acesso em: 28/01/2008.

XIMENES, M. F. F., SILVA, V. P. M., QUEIROZ, P. S. V., REGO, M. M., CORTEZ, A. M., BATISTA, L. M. M., MEDEIROS, A. S., JERONIMO, S. B. M. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil – Reflexos do Ambiente Antrópico. **Neotropical Entomology** 36(1): p. 128-137, 2007.

YOUNG, D.C. & DUNCAN, N.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: 1-881, 1994.