



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA REDE BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL – REDE BIONORTE



**ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) E SUA
INTERAÇÃO COM *LEISHMANIA* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) E
HOSPEDEIROS VERTEBRADOS EM ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE
LEISHMANIOSES**

ANTONIA SUELY GUIMARÃES E SILVA

São Luís – MA

2016

ANTONIA SUELY GUIMARÃES E SILVA

**ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) E SUA
INTERAÇÃO COM *LEISHMANIA* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) E
HOSPEDEIROS VERTEBRADOS EM ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE
LEISHMANIOSES**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo

Co-orientador (a): Prof^ª. Dra. Maria Norma Melo

São Luís – MA

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Guimarães e Silva, Antonia Suely.

Ecologia de Flebotomíneos Diptera, Psychodidae e sua interação com Leishmania Kinetoplastida, Trypanosomatidae e hospedeiros vertebrados em áreas de transmissão de Leishmanioses / Antonia Suely Guimarães e Silva. - 2016. 119 f.

Coorientador(a): Maria Norma Melo.

Orientador(a): José Manuel Macário Rebêlo.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Ecologia de vetor. 2. Epidemiologia da leishmaniose. 3. Fonte alimentar sanguínea. 4. Infecção natural. I. Macário Rebêlo, José Manuel. II. Melo, Maria Norma. III. Título.

ANTONIA SUELY GUIMARÃES E SILVA

ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) E SUA INTERAÇÃO COM *LEISHMANIA* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) E HOSPEDEIROS VERTEBRADOS EM ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSES

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Norma Melo

Banca examinadora

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Antônio Rafael da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. Vicente Silva Gonçalves Neto
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Prof^a. Dra. Eloísa das Graças do Rosário Gonçalves
Universidade Federal do Maranhão

**São Luís-MA
2016**

À minha família, em especial as duas pessoas mais importantes da minha vida, Ludimar Lourenço de Jesus e Silva e Arinda Guimarães e Silva, meus pais, que sempre foram a base de tudo, meu sustentáculo, e que me apoiaram em cada momento e decisão. Sou o que sou dedico a vocês, amo-os eternamente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus do infinito. Aquele que comigo sempre esteve. A Ti, rendo graças e louvores.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo, pela orientação, pelo exemplo de dedicação, amizade e principalmente pelo conhecimento compartilhado comigo, importantes para minha formação acadêmica.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Maria Norma Melo do Departamento de Parasitologia – UFMG, pela colaboração, sugestões, correções e co-orientação para construção e finalização desta Tese.

Ao meu pai Ludimar e à minha mãe Arinda, pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos (Antônio Carlos, Carlos e José Wilson) pelo incentivo, idas e vindas. Obrigada.

Às minhas irmãs: Marly que mesmo distante me apoia sempre; e de forma especial à Valdenia sempre ao meu lado me dando força, para seguir firme na caminhada, pessoa fundamental nessa difícil jornada.

Aos meus cunhados (Afonso pelo incentivo; Moacir pelo cuidado, apoio e solidariedade) e cunhadas (Kézia, Vanderléia e Erislene) pela apoio e colaboração sempre.

Ao meu sobrinho (Diêgo) e sobrinhas (Diandra, Davana, Maysa, Mayra, Marina, Júlia e Sofia) que me incentivam sempre e suportaram juntos comigo os momentos mais difíceis desta jornada científica.

Aos técnicos do Laboratório de Entomologia do Centro de Controle de Zoonoses de Caxias, Maranhão Erlen Rejane, Sérgio Henrique, Antônio Ronaldo, Doriedson dos Santos e Carlos Pinheiro pelo auxílio durante as coletas e identificação dos flebotomíneos.

À amiga Raimunda Balata que me hospedou durante os dois primeiros anos dessa jornada, pelos conselhos e torcida sempre positiva e ao seu esposo Laércio e seu filho amado Laércio Filho por me receber sempre muito bem, meu muito obrigada.

À Soraia Silva, do Laboratório de Parasitologia da UFMG, pela colaboração nas análises moleculares.

À professora Dra, Valéria Cristina Soares Pinheiro pelo incentivo e colaboração antes e durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À professora Patrícia Maia Albuquerque Coordenada Estadual do BIONORTE-MA, pela paciência e orientações.

Às amigas: Joelma Soares pelas correções e ajuda na escrita dos resultados e discussão desta pesquisa e Rosa Cristina pelas contribuições na identificação e força em todos os momentos que precisei duas pessoas incansáveis, sempre prontas para me ajudar.

À Raquel Silva Fonteles pelo apoio, colaboração, companheirismo, em todos os momentos, nos sufocos e nas horas mais tranquilas.

Aos amigos da turma de doutorado ano 2012: Ana Carolina, Andréia Amorim, Angela Mouzinho, Bruno Vinícius, Daniele Celetano, Danilo Cutrim, Fabiana Oliveira, Glene Henrique, João de Jesus, Mariana Arruda, Michelle Russo, Marisa Aranha, Raquel Fonteles, Rosiane Penha, Suelen Ferreira, Tatiane Aranha, que compartilharam comigo todos os momentos bons e difíceis desses quatro anos estudando juntos.

Às instituições: Prefeitura Municipal de Caxias, através da Secretaria Municipal de Saúde/Centro de Controle de Zoonoses e à Universidade Estadual do Maranhão por todo apoio necessário à realização desta pesquisa.

À Universidade Federal do Maranhão–UFMA, que por meio do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, me proporcionou o curso de Doutorado.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela parceria firmada entre o Laboratório de Parasitologia e o Laboratório de Entomologia e Vetores da Universidade Federal do Maranhão, para realização das análises moleculares.

Aos professores do Curso pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

Aos moradores do Bairro Salobro e da localidade Bom Jardim, que também colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho, autorizando nossa permanência em suas residências para que pudéssemos capturar os insetos e sempre nos auxiliando.

Aos colaboradores e amigos do LEV/UFMA em especial ao Jorge, Ciro, Gildário, obrigada por tudo.

Aos colaboradores e amigos do LABEM/UEMA/CAXIAS em especial Francimar Bezerra, Mary Holanda e Maria Cleoneide.

À Raydelane Pinto, pelas correções dos textos em inglês. À Lázaro pelo apoio da análise estatística dos resultados. Ao Werton Nobre pela colaboração na elaboração do mapa publicado nesse estudo. À amiga Fausta pelas correções ortográficas.

À Cleydiane e Dayane, mais que secretárias, são pessoas amigas e preocupadas com cada discente.

Às agências de fomento à pesquisa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos financeiros proporcionados nos projetos envolvidos nesse estudo.

Agradeço à Enfermeira Nélia pelo compreensão, apoio e incentivo no ano de 2012 quando precisei cursar as disciplinas, meu muito obrigada.

Aos amigos de trabalho Antônio Neto, Luís Medeiros, José Renan, Bethânia Amorim e Daniel Augusto pela colaboração e parceria durante esses quatro anos de doutorado.

À professora Sílvia Maria Carvalho Silva, pelo incentivo na minha trajetória como estudante do curso de doutorado.

À Vó Laura e família por ter me recebido em sua casa com uma satisfação que não tem descrição, serei eternamente grata.

À Aldeniza Calixto Alves pela preciosa ajuda nas coletas dos insetos, obrigada.

E a todos aqueles que colaboram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

“(...) Se choras por ter perdido o sol, as lágrimas não te permitirão ver as estrelas (...)”

Tagore

RESUMO

Os flebotomíneos são dípteros nematóceros, pertencentes à família Psychodidae, muito importantes para a saúde pública, pois algumas espécies são vetores dos agentes etiológicos das leishmanioses, doenças parasitárias endêmicas em todo o território brasileiro. Esses vetores são encontrados com frequência em ecótopos naturais, abrigos de animais domésticos e habitações humanas. A presente pesquisa teve como objetivo estudar a ocorrência de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar urbano e rural do município de Caxias, Maranhão, em área de notificação de casos de leishmaniose tegumentar e visceral, bem como, a taxa de infecção natural por *Leishmania* e análise da fonte alimentar sanguínea. Trata-se de um estudo transversal, exploratório, descritivo e de campo, tendo uma abordagem quantitativa, realizado no período de março de 2013 a fevereiro de 2015. Os espécimes foram coletados com armadilhas luminosas do tipo CDC (Center for Disease Control) em 20 residências, 10 na zona urbana e 10 na zona rural. Foram coletados 15.892 espécimes pertencente a 17 espécies, sendo uma do gênero *Brumptomyia* e 16 do gênero *Lutzomyia*. As espécies mais abundantes foram *Lu. longipalpis* (90,26%) e *Lu. whitmani* (7,65%). Na zona urbana a abundância de flebotomíneos foi maior no período chuvoso, e na zona rural na estação seca. *Lu. longipalpis* e *Lu. Whitmani* ocorreram nas duas estações, com mais frequência na estação chuvosa e seca, respectivamente. Do total de 3.520 fêmeas, 982 exemplares foram utilizados para a extração de DNA e PCR-RFLP para detecção de presença de *Leishmania*. O vetor *Lu. longipalpis* foi encontrado infectado por *Le. infantum* (3,0%), *Le. shawi* (0,3%), *Le. mexicana* (0,2%), *Le. braziliensis* (0,6%) e *Le. guyanensis* (0,6%) e com infecção mista *Le. infantum/Le. braziliensis* (0,6%). A espécie *Lu. whitmani* estava infectada com *Le. infantum/Le. braziliensis* (4,0%) e *Le. braziliensis* (4,3%). Outras espécies encontradas infectadas incluem-se: *Lu. trinidadensis* com *Le. infantum/Le. braziliensis*; *Lu. evandroi* e *Lu. termitophila* com *Le. braziliensis* e, *Le. guyanensis*, respectivamente. Para detecção da fonte alimentar foram utilizadas 778 fêmeas ingurgitadas, 573 positivaram para oito tipos diferentes de animais domésticos e silvestres, sendo detectadas reações simples representadas por sangue de: cão, homem, galinha, boi, porco, cavalo, roedor e gambá e as reações mistas foram representadas por sangue de: cão/roedor, roedor/homem, galinha/homem, galinha/roedor, cão/galinha, cavalo/roedor, roedor/porco e homem/gambá. A presença de espécies de flebotomíneos infectadas com diferentes espécies de leishmânias e alimentados com sangue de animais domésticos e humanos justifica a ocorrência de forma endêmicas das leishmanioses visceral e tegumentar no município de Caxias. Diante dos resultados obtidos sugere-se adoção de medidas de controle por parte das autoridades de saúde pública, de forma a conter uma futura epidemia dessas doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Ecologia de vetor, Infecção natural, Fonte alimentar sanguínea, Epidemiologia da leishmaniose.

ABSTRACT

The Sandflies are insects diptera nematocera belonging to the Psychodidae family, very important for public health, because some species are vectors of etiological agents of leishmaniasis, endemic parasitic disease in the state of Maranhão and in Brazil. These vectors are frequently found in natural ecotopes, domestic animal shelters and human habitations. This research aimed to study the occurrence of sandflies in the urban and rural peridomiciliary environment of municipality of Caxias, Maranhão, in notification area of cases of cutaneous and visceral leishmaniasis, as well as the rate of natural infection by *Leishmania* and analysis of blood food source. This is a cross-sectional, exploratory, descriptive and field study, with a quantitative approach, performed from March 2013 to February 2015. The specimens were collected with CDC (Center for Disease Control) light traps type in 20 homes, 10 in urban area and 10 in rural area. Were collected 15,895 specimens belonging to 17 species, one of genus *Brumptomyia* and 16 of *Lutzomyia*. The most abundant species were *Lu. longipalpis* (90.26%) and *Lu. whitmani* (7.65%). In the urban area the abundance of sandflies was higher in rainy season, and in the rural area in the dry season. *Lu. longipalpis* and *Lu. whitmani* occurred in two seasons, most frequently in rainy and dry season, respectively. From a total of 3, 520 female, 982 samples were used for DNA and PCR-RFLP extraction for detecting the presence of *Leishmania*. The vector *Lu. longipalpis* was found infected by *Le. infantum* (3.0%); *Le. shawi* (0.3%); *Le. mexicana* (0.2%); *Le. braziliensis* (0.6%) and *Le. guyanensis* (0.6%) and with mixed infection *Le. infantum/Le. braziliensis* (0.6%). The specie *Lu. whitmani* was infected by *Le. infantum/Le. braziliensis* (4.0%) and *Le. braziliensis* (4.3%). Other species found infected include: *Lu. trinidadensis* with *Le. infantum/Le. braziliensis* and *Lu. evandroi* and *Lu. termitophila* with *Le. braziliensis* and *Le. guyanensis* respectively. Based on these results it is suggested adopting control measures by the public health authorities to contain a future epidemic of AVL in this area, which is also endemic to ACL. For detection of food source were captured 778 engorged females, 573 were positive for eight different types of domestic and wild animals: dog, man, chicken, ox, pig, horse, rodent and opossum; obtaining mixed reactions in eight different associations: dog/rodent, man/chicken, chicken/rodent, dog/chicken, horse/rodent, rodent/pig and man/opossum. The presence of sandflies species infected with different species of leishmanias and fed with blood of domestic animals and human justifies the occurrence of endemic form of visceral and cutaneous leishmaniasis in the municipality of Caxias. Based on these results it is suggested adoption of control measures by the public health authorities to contain a future epidemic of these diseases.

KEYWORDS: Vector ecology, Natural infection, Blood food source, Leishmaniasis epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1- Fêmea ingurgitada de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	21
Figura 2- Ciclo Biológico das Leishmanioses.....	27
Figura 3- Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. no inseto vetor.....	27
Figura 4- Endemicidade da Leishmaniose Tegumentar, 2013	29
Figura 5- Endemicidade da Leishmaniose visceral America, 2013	31

ARTIGO 1

Figura 1- Quintal com manejo (ponto1), A Presença de galinhas, esgoto a céu aberto. B: Presença de cão e plantas. C e D: Local acidentado com presença de galinha e plantas, local sombreado.....	52
Figura 2 - Quintal sem manejo (ponto 2), A e B: Presença de entulho, plantas e cão. C: acúmulo de madeira e presença de cão, local sombreado. D: Criação de suíno em chiqueiro.....	52
Figura 3- Quintal com manejo (ponto 4), A: Presença de plantas em jarros, canterios, B: presença de chiqueiro, D: local sombreado, com árvores e anexo desativado.....	53
Figura 4- Quintal sem manejo (ponto 6), A: A nexo desativado e abandonado. B: Canteiro com presença de mato ao redor. D: Casa de forno, mato ao redor da casa e presença de galinha.....	53
Figura 5- Curva de acumulação de espécies de flebotomíneos estudadas na zona urbana e rural do município de Caxias-MA, Brasil, no período de março/2013 a fevereiro/2015.....	58
Figura 6- Frequência sazonal das espécies de flebotomíneos capturadas na zona urbana do município de Caxias, Estado do Maranhão, nas estações seca e chuvosa, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015.....	59
Figura 7- Frequência sazonal das espécies de flebotomíneos capturadas na zona rural, do município de Caxias, Estado do Maranhão, nas estações seca e chuvosa, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015.	60

ARTIGO 2

Figura 1- Mapa mostrando a localização do município de Caxias, no estado do Maranhão, Brasil, e os locais de coleta de flebotomíneos de 2013-2015	74
---	----

Figura 2- Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata mostrando os produtos amplificados pela PCR para o fragmento do gene ITS1 de *Leishmania*. M: PROMEGA marcador de peso molecular padrão de 100 pb; Linhas: 1- controle positivo (DNA de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*; 2-15: amostras extraídas das fêmeas de flebotomíneos; 16- controle negativo sem DNA.....80

Figura 3- Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *HaeIII*. M: PROMEGA marcador de peso molecular padrão de 25bp; Linhas I-IX controles positivos: I - *L. amazonensis*; II - *L. mexicana*; III - *L. guyanensis*; IV - *L. braziliensis*; V - *L. lansoni*; VI - *L. naiffi*; VII - *L. shawi*; VIII - *L. infantum*; IX - *L. infantum / L. braziliensis*; Linhas 03-55 amostras de *Leishmania* spp. Positivos.....81

Figura 4- Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *HaeIII*. M: PROMEGA marcador de peso molecular padrão de 25bp; Linhas 56-209 fêmeas de flebotomíneos *Leishmania* spp.....82

ARTIGO 3

Figura 1- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, mostrando os perfis de restrição do fragmento amplificado do gene *Cyt b* de diferentes grupos de animais, digeridos com endonucleases. A. Endonuclease *MboI*. Canaletas: M – marcador de peso molecular 25pb (*PROMEGA*). Controles positivos das fontes alimentares: P - porco, B - boi, G - gambá, Ga - galinha, Ca - cavalo, C - cão, H - homem, R – roedor; amostras de flebotomíneos provenientes das zonas urbana e rural estão identificadas pelos números 11, 33, 80, 96, 127 e 128. B. Endonuclease *HaeIII*. Canaletas: M – marcador de peso molecular 25pb (*PROMEGA*). Amostras de flebotomíneos provenientes das zonas urbana e rural estão identificadas pelos números 211-216. 106

LISTA DE TABELAS**ARTIGO 1**

Tabela 1- Riqueza e abundância relativa das espécies de flebotomíneos capturados na zona rural e zona urbana, no município de Caxias, Estado do Maranhão, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015. 57

ARTIGO 2

Tabela 1- Fêmeas de flebotomíneos positivas pelo PCR-RFLP para *Leishmania* spp. 78

Tabela 2- Identificação das fêmeas de flebotomíneos positivas pelo PCR-RFLP para *Leishmania* spp. 79

ARTIGO 3

Tabela 1- Espécies de flebotomíneos e suas respectivas fontes alimentares, como mostrados pelos perfis de restrição do fragmento amplificado do gene *cyt b*, de sangue de diferentes animais, digeridos com as endonucleases *HaeIII* e/ou *MboI*. 104

Tabela 2- Espécies de flebotomíneos e suas respectivas fontes alimentares mistas, como mostrados pelos perfis de restrição do fragmento amplificado do gene *cyt b*, de sangue de diferentes animais, digeridos com as endonucleases *HaeIII* e/ou *MboI*. 105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Espécies de flebotomíneos incriminados no Brasil como vetores suspeitos na transmissão do patógeno causador de Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral Americana.	23
Quadro 2- Espécies de <i>Leishmania</i> que acometem o homem no mundo spp.....	25

LISTA DE SÍMBOLOS

AgNO₃ - Nitrato de prata

CDC - Armadilha Center Disease Control

°C - Graus Celcius

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

GEPLAN - Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico

GPS – Sistema de Posicionamento Global

Hae III - *Haemophilus aegyptius* III

H' – Índice de Diversidade

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Le. - *Leishmania*

Lu. - *Lutzomyia*

Rpm - Rotações por minuto

ITS - Espaçador interno transcrito

KDAN -DNA do cinetoplasto

KOH – Hidróxido de Potássio

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

LCD - Leishmaniose Cutâneo Difusa

LCM - Leishmaniose Cutâneo mucosa

MA - Maranhão

Pb - Pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-RFLP - Amplificação Aleatória dos fragmentos polimórficos

SVE – Secretaria de Vigilância Epidemiológica

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SES – Secretaria Estadual de Saúde

TMI – Taxa Mínima de Infecção

µL - Microlitro

OMS - Organização Mundial de Saúde

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvi
1. APRESENTAÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Flebotomíneos	21
2.2 Leishmanioses	24
2.3 Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> spp.	26
2.4 Leishmaniose Tegumentar Americana	28
2.5 Leishmaniose Visceral Americana	29
2.6 Taxa de Infecção Natural em flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	31
2.7 Fonte Alimentar de Flebotomíneos	32
3. OBJETIVOS	35
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
4. JUSTIFICATIVA	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
6. ARTIGOS	46
Artigo 1 - Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em peridomicílios rurais e urbanos em área de transmissão de leishmaniose	46
Resumo	47
Abstract	48
Introdução	49
Material e Métodos	51
Resultados	56
Discussão	61
Referências	65
Artigo 2 - Identificação e caracterização molecular de coinfeção de <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos de Área Endêmica de Leishmaniose Visceral e Cutânea no Brasil	69
Resumo	70
Abstract	71
Introdução	72

Materiais e Métodos	74
Resultados	77
Discussão	83
Referências	88
Artigo 3 - Estudo de fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de transmissão de leishmanioses, na região do Cerrado do Maranhão	93
Resumo	94
Abstract	95
Introdução	96
Materiais e Métodos	98
Resultados	102
Discussão	107
Referências	110
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
ANEXOS	

1. APRESENTAÇÃO

O presente trabalho intitulado “Ecologia de Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) e sua interação com *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) e hospedeiros vertebrados em áreas de transmissão de Leishmanioses”. A pesquisa resultou de um amplo inquérito entomológico sistematizado e planejado para conhecer notadamente a estrutura das comunidades de flebotomíneos vetores, identificar os agentes etiológicos das leishmanioses e os vertebrados utilizados como fonte alimentar de sangue dos flebotomíneos. A tese foi apresentada de acordo com as normas e proposições sobre escrita de tese do Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal da Universidade Federal do Maranhão. De acordo com as normas, os tópicos, Referencial Teórico, Objetivos e Justificativa estão descritos detalhadamente em formato de tese tradicional. Posteriormente a tese foi escrita em formato de artigo, sendo produzido três manuscritos completos:

Artigo 1 - **Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em peridomicílios rurais e urbanos em área de transmissão de leishmaniose.**

Artigo 2 - **Identificação e caracterização molecular de coinfeção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos de área endêmica de Leishmaniose Visceral e Cutânea no Brasil.**

Artigo 3 - **Estudo de fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de transmissão de leishmanioses, na região do Cerrado do Maranhão.**

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos taxonomicamente pertencem à família Psychodidae constituídas por dípteros nematóceros de pequeno porte que variam de 1,5 a 3 mm, olhos grandes, muito pilosos e de cor palha e castanho-claros, facilmente reconhecidos pela atitude que adotam quando pousados, pois, as asas permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso. Apresentam várias subfamílias, dessas, apenas Phlebotominae inclui espécies hematófagas e com grande interesse médico por serem vetores das leishmanioses (SOUZA, 2000; DESJEUX, 2004) (Figura 1).

Figura 1. Fêmea ingurgitada de *Lutzomyia longipalpis*



Fonte: <https://www.big.com/images/search?q=lutzomyia+longipalpis>

São insetos de atividade crepuscular ou noturna encontrados com frequência em ecótopos naturais e costumam abrigarem-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, arbustos, frestas em rochas e em cavernas (GALATI et al., 2003). Também são encontrados invadindo abrigos de animais domésticos (currais, chiqueiros, galinheiros) e nos domicílios, abrigando-se em locais escuros, fendas de paredes dentre

outros locais, demonstrando que se encontra em processo de adaptação (TOLEZANO et al., 2001).

Embora não haja consenso entre os taxonomistas, são admitidos seis gêneros: *Phebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chimius* Leng, 1987 para as espécies do Velho Mundo e ainda *Lutzomyia* França, 1964, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921, *Warileyia* Hertig, 1940 encontradas apenas no novo mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994; SHIMABUKURO et al., 2011). Dessa forma, entre os gêneros americanos, *Lutzomyia* se caracteriza como o de maior importância com algumas espécies implicadas na transmissão dos agentes causais das leishmanioses, constituindo-se em graves problemas de saúde no Brasil (YOUNG; DUNCAN, 1994; DESJEUX, 2004; SHIMABUKURO et al., 2011).

No Brasil, o gênero *Lutzomyia* é o mais estudado, devido a seu papel como vetor de agentes etiológicos das leishmanioses (YOUNG; DUNCAN, 1994). Assim, várias espécies são consideradas efetivas transmissoras de espécies de *Leishmania* aos seres humanos, destacando-se: *Lutzomyia (Nyssomia) intermedia* (LUTZ; NEIVA, 1912); *Lu. (N.) neivai* (PINTO, 1926); *Lu. (N.) whitmani* (ANTUNES; COUTINHO, 1939); *Lu. (N.) umbratilis* (WARD; FRAIHA, 1977); *Lu. (N.) flaviscutellata* (MANGABEIRA, 1942); *Lu. (N.) antunesi* (COUTINHO, 1939); *Lu. migonei* (FRANÇA, 1920); *Lu. (Pintomyia) fischeri* (PINTO, 1926); *Lu. (P.) pessoai* (COUTINHO; BARRETTO, 1940); *Lu. (P.) wellcomei*; *Lu. (P.) complexa* (MANGABEIRA, 1941); *Lu. (P.) ayrozai* (BARRETTO; COUTINHO, 1940); *Lu. (P.) paraensis* (COSTA LIMA, 1941); *Lu. (P.) amazonensis* (ROOT, 1934); *Lu. (P.) hirsuta hirsuta* (MANGABEIRA, 1942); *Lu. (Trichophoromyia) ubiquitalis* (MANGABEIRA, 1942); *Lu. (L.) gomezi*; *Lu. (Viannomyia) tuberculata* (MANGABEIRA, 1941) (RANGEL; LAINSON, 2009) (Quadro 1).

Os flebotomíneos ocorrem em todos os estados brasileiros (AGUIAR E MEDEIROS, 2003) e no estado do Maranhão já foram publicados vários estudos, registrando 91 espécies de flebotomíneos distribuídas nas diversas regiões, sendo quatro pertencentes ao gênero *Brumptomyia* e 87 ao gênero *Lutzomyia* (REBÊLO et al., 2010b). O primeiro registro refere-se a uma lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia* conhecidas no Estado (REBÊLO et al., 1996); estudos sobre a fauna de flebotomíneos foram realizadas nos municípios de Codó (REBÊLO et al., 1999b; SILVA et al., 2015), Buriticupu (REBÊLO, 2000a,b), Paço do Lumiar (BARROS, et al., 2000), Raposa (ARAÚJO et al., 2000), São José de Ribamar (CARVALHO et al., 2000), Santa Quitéria

(BERNAL E REBÊLO, 2003), Caxias (REBÊLO et al., 1996; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2012) e São Luís (PENHA et al., 2013).

Quadro 1. Espécies de flebotomíneos incriminadas no Brasil como vetores ou suspeitos na transmissão do patógeno causador de Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral Americana.

Espécies vetoras	Espécies de <i>Leishmania</i>	Referências
<i>Lu. flaviscutellata</i>	<i>Le. (L.) amazonenses</i>	Lainson e Shaw (1968)
<i>Lu. olmeca nociva</i>	<i>Le. (L.) amazonenses</i>	Arias e Naiff (1987)
<i>Lu. cruzi</i>	<i>Le. (L.) infantum</i>	Santos <i>et al.</i> (1998)
<i>Lu. longipalpis</i>	<i>Le. (L.) infantum</i>	Deane e Deane (1954)
<i>Lu. migonei</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Araujo Filho (1979)
<i>Lu. anduzei</i>	<i>Le. (V.) guyanensis</i>	Lainson <i>et al.</i> (1976)
<i>Lu. antunesi</i>	<i>Le. (V.) lindenbergi</i>	Silveira <i>et al.</i> (2002)
<i>Lu. intermedia</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Aragão (1922)
<i>Lu. neivai</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Pita-Pereira <i>et al.</i> (2009)
<i>Lu. umbratilis</i>	<i>Le. (V.) guyanensis</i>	Arias e Freitas (1978)
<i>Lu. whitmani</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Pessôa e Coutinho (1941)
<i>Lu. yuilliyuilli</i>	<i>Le. (V.) panamensis</i>	Santamaría <i>et al.</i> (2006)
<i>Lu. ayrozai</i>	<i>Le. (V.) naiffi</i>	Rangel & Lainson (2003)
<i>Lu. complexus</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Souza <i>et al.</i> (1996)
<i>Lu. davisii</i>	<i>Le. (V.) naiffi</i>	Gil <i>et al.</i> (2003)
<i>Lu. hirsutushirsutus</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Rangel <i>et al.</i> (1985)
<i>Lu. paraenses</i>	<i>Le. (V.) naiffi</i>	Silveira <i>et al.</i> (1991)
<i>Lu. squamiventris</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Souza <i>et al.</i> (1996)
<i>Lu. wellcomei</i>	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	Lainson <i>et al.</i> (1973)
<i>Lu. ubiquitalis</i>	<i>Le. (V.) lainsoni</i>	Silveira <i>et al.</i> (1991)

Conhecer as espécies vetoras de *Leishmania* que circulam entre os diferentes hospedeiros, e humanos e a identificação da fonte alimentar das espécies de flebotomíneos é de extrema importância para aplicação de medidas adequadas de prevenção e controle desses vetores, fazendo-se necessário a realização de estudos mais aprofundados acerca do ciclo epidemiológico das leishmanioses.

Os flebotomíneos têm sido bastante estudados e registrados na literatura em todo o mundo, devido ao seu papel na transmissão das Leishmanioses: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e da Leishmaniose Visceral Americana (LVA).

2.2 Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença que acomete pessoas no mundo inteiro, com casos notificados em cerca de 100 países, atingindo todos os continentes com exceção da Antártida. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 2014). Estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas a contrair a doença, e que dois milhões de novos casos são registrados a cada ano (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014).

As leishmanioses apresentam aspectos clínicos que variam desde úlceras localizadas de pele, conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), até um quadro sistêmico letal Leishmaniose Visceral Americana (LVA), as diferentes formas clínicas, dependem da espécie etiológica envolvida, e da relação com seu hospedeiro (WHO, 2014).

As leishmanioses caracterizam-se por serem infecções crônicas, não contagiosas, que podem assumir um caráter zoonótico, envolvendo em seu ciclo de transmissão animais domésticos ou silvestres, são causadas por diversas espécies de leishmânias e transmitidas dos animais para o homem por fêmeas de flebotomíneos infectadas (LAINSON, 1987; GRIMALDI, 1989; WHO, 2014).

Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* Ross (1903), ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Compreendem cerca de 30 espécies, incluindo 21 patogênicas aos humanos (DESJEUX, 2004; READY, 2013). A doença se manifesta de forma diferente, dependendo do estado imunológico do hospedeiro vertebrado e da espécie de *Leishmania*. Dessa forma encontram-se divididas em dois grupos: leishmaniose visceral (popularmente conhecida como calazar), causada pelas espécies *Le. (L.) donovani* e *Le. (L.) infantum* (sinônimo de *Le. chagasi* no Novo Mundo) e leishmaniose tegumentar (conhecida como ferida brava), que ocorre sob diferentes formas (cutânea, mucosa, cutânea difusa e cutânea disseminada). A forma cutânea causada por *Le. (L.) major*, *Le. (L.) tropica* e *Le. (L.) aethiopica* que também causa Leishmaniose Cutâneo-Difusa no Velho Mundo, e nas Américas, principalmente por *Le. (L.) amazonensis* e *Le. (L.) mexicana* e por espécies do subgênero *Viannia*: *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis*, *Le. (V.) shawi*, *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) naiffi*, *Le. (V.) lindenbergi*, *Le. (V.) peruviana*, *Le. (V.) utingensis*, *Le. (V.) colombiensis* e *Le. (V.) panamensis*. A forma cutaneomucosa (LCM) causada principalmente por *Le. (V.) braziliensis* e raramente por *Le. (V.) guyanensis* e a cutâneo-difusa (LCD), causada por

Le. (L.) amazonensis (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004; KAYE E SCOTT, 2011)
(Quadro 2).

Quadro 2. Espécies de *Leishmania* que acometem o homem no mundo.

	Espécies de <i>Leishmania</i>	Forma Clínica
Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf Janova, 1982)	Novo e Velho Mundo – Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf Janova, 1982)	
	<i>Le. (Leishmania) donovani</i> (Laveran & Mesnil, 1903)	Leishmaniose Visceral
	<i>Le. (L.) infantum</i> (Nicole, 1908)	Leishmaniose Visceral
	<i>Le. (L.) tropica</i> (Wright, 1903)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (L.) major</i> (Yakimoff & Schokhor, 1914)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (L.) aethiopica</i> (Bray, Ashford & Bray, 1973)	Leishmaniose Cutânea e Cutâneo-Difusa
	<i>Le. (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (L.) amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Leishmaniose Cutânea e Cutâneo-Difusa
Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson & Shaw, 1987)	Novo Mundo - Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson & Shaw, 1987)	
	<i>Le. (Viannia) braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Leishmaniose Cutânea e Cutaneomucosa
	<i>Le. (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)	Leishmaniose Cutânea e Cutaneomucosa
	<i>Le. (V.) panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1954)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (V.) peruviana</i> (Velez, 1913)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (V.) lainsoni</i> (Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (V.) shawi</i> (Lainson, Braga & de Souza, 1989)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Leishmania (V.) lindenbergi</i> (Silveira, Ishikawa & de Souza, 2002)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (V.) naiffi</i> (Lainson & Shaw, 1989)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (V.) utinguensis</i> (Braga, Lainson, Ishikawa et al. 2003)	Leishmaniose Cutânea
	<i>Le. (V.) colombiensis</i> (Kreutzer, Corredor et al., 1991)	Leishmaniose Cutânea

Fonte: Adaptado de Young e Ducan (1994)

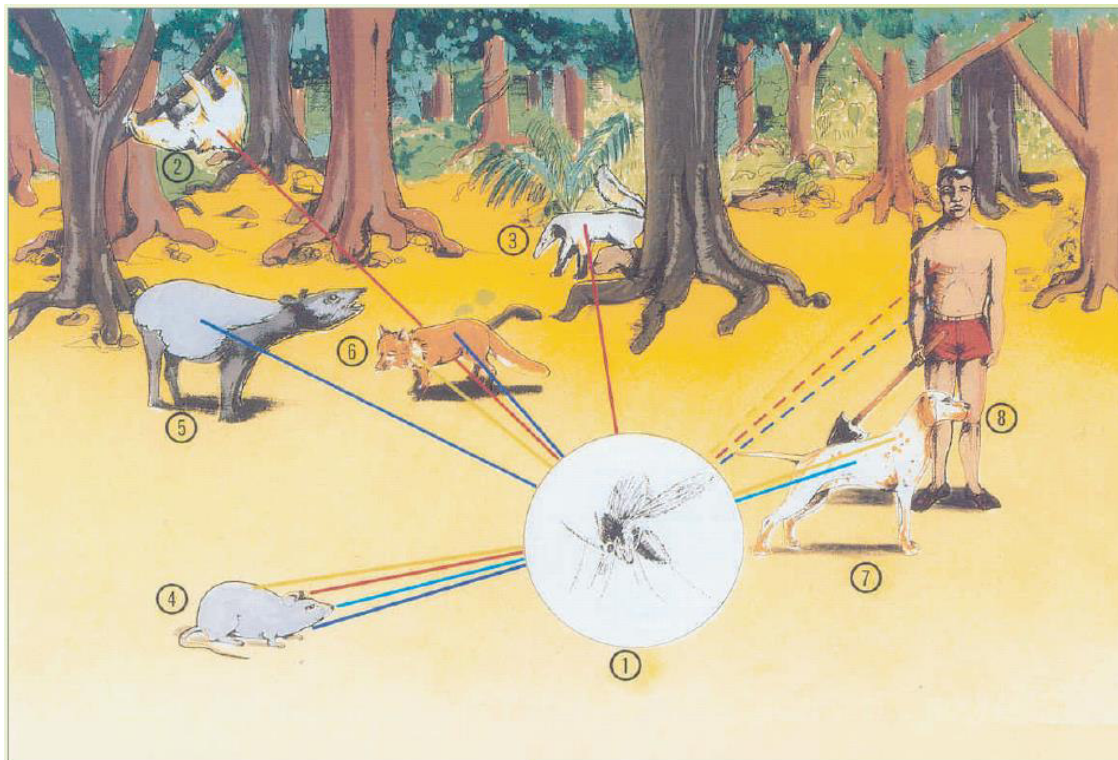
2.3 Ciclo Biológico de *Leishmania* spp.

A transmissão das leishmanioses para os hospedeiros vertebrados, é realizada por meio da picada da fêmea infectada de flebotomíneo, representado nas Américas pelo gênero *Lutzomyia* e no Velho Mundo pelo gênero *Phlebotomus*. Os agentes etiológicos das leishmanioses apresentam duas formas básicas: promastigotas (flagelada) encontrada no intestino dos flebotomíneos vetores e amastigota intracelular que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário de mamíferos (SHERLOCK, 2003; BATES, 2007).

A infecção dos flebotomíneos ocorre durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea pica um hospedeiro infectado e ingere células sanguíneas e outras células, especialmente macrófagos, contendo formas amastigotas. No trato digestório do vetor, ocorre o rompimento da membrana dos macrófagos e os parasitos são liberados. Na região anterior do trato digestório, ocorre a transformação das amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica. Com o rompimento da matriz peritrófica, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestório, onde se multiplicam e aderem pelo flagelo. Após a divisão, migram para a região anterior do intestino até a válvula estomodeal, onde se concentram e sofrem um processo de diferenciação, denominado de metaciclogênese. Durante a metaciclogênese, os promastigotas apresentam redução no tamanho de corpo celular, tornam-se extremamente móveis e altamente infectantes e passam a ser denominados promastigotas metacíclicas. Ao danificar a válvula estomodeal, as formas metacíclicas migram para a probóscide e a são regurgitados e transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada, onde recomeça o ciclo (SACKS E PERKINS, 1984).

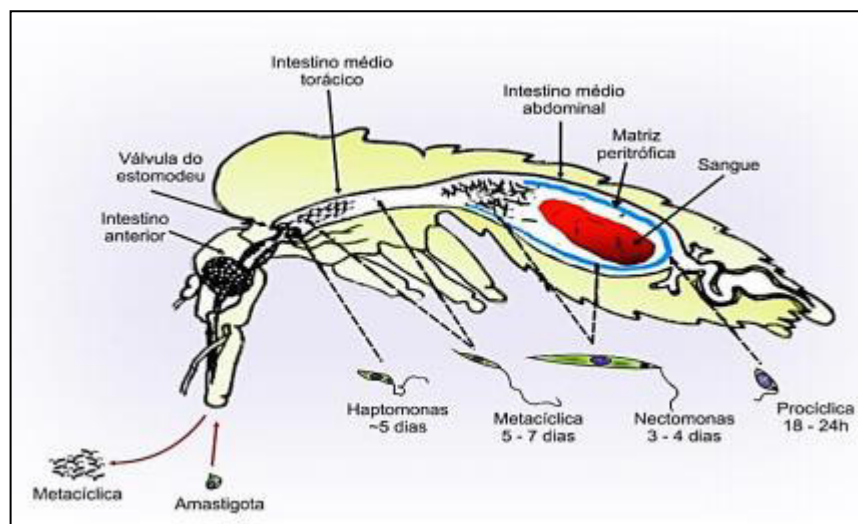
A infecção no homem e outros vertebrados ocorrem quando a fêmea infectada do flebotomíneo pica o mamífero, inoculando a forma promastigota metacíclica durante o repasto sanguíneo. As promastigotas metacíclicas são regurgitadas e penetram na pele do hospedeiro, aderindo e invadindo macrófagos. A forma metacíclica no interior do vacúolo parasitóforo começa a se diferenciar em amastigota aderindo ao vacúolo parasitóforo e multiplicando-se por divisão binária até ocupar grande parte do citoplasma. Em seguida, a membrana do macrófago se rompe liberando os amastigotas no tecido que poderão invadir novos macrófagos ou serem ingeridos por uma nova fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (STUART et al., 2008) (Figura 2 e 3).

Figura 2. Ciclo de transmissão das leishmanioses.



Fonte: Atlas de leishmaniose tegumentar (Ministério da Saúde, 2006)

Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. no inseto vetor



Fonte: Sacks e Perkins (1984), modificado por Pimenta Freitas e Secundino (2012).

2.4 Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas) e dessa forma, o homem se infecta ao entrar em contato com as áreas silvestres. No Brasil, tem se observado uma considerável expansão geográfica das leishmanioses em todas as regiões do Brasil, de maneira que ocorre em todos os Estados, sendo registrado uma média anual de 35 mil novos casos de LTA, revelando modificações em seus perfis epidemiológicos. Esse processo vem sendo relacionado a questões ambientais e sociais, incluindo o desmatamento e a urbanização sem planejamento (ASFORD, 2000; DESJEUX, 2004).

No Maranhão, as leishmanioses são consideradas um grave problema de saúde pública e os primeiros casos de LTA foram descritos no estado por Silva et al. (1979) no município de Buriticupu, localizada na Amazônia maranhense, cujo estudo relata um surto de 300 casos da doença, ocorrido em área de colonização recente para implantação de projetos agropecuários e núcleos populacionais. Posteriormente, foram realizados outros estudos epidemiológicos mostrando a condição endêmica da doença (COSTA et al., 1992, 1998, 2005; SILVA et al., 1981; MARTINS et al., 2004; JÚNIOR et al., 2009).

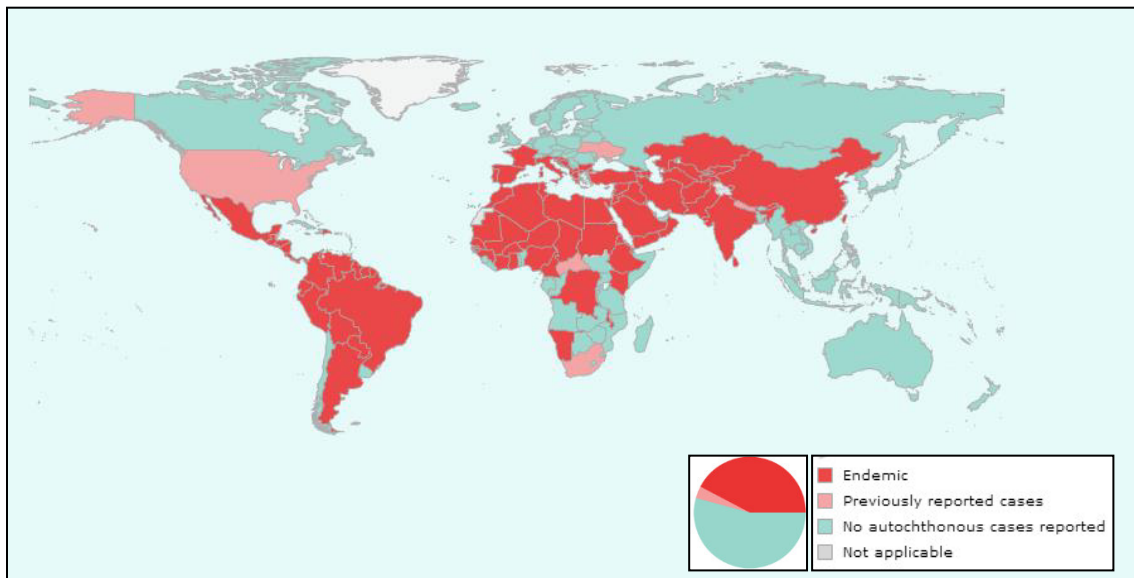
Os estudos demonstrando a presença dos flebotomíneos vetores da LTA na região de Buriticupu e confirmando esta área como endêmica para essa doença foram feitos por Rebêlo et al. (2000, a,b). Na década de 2000 o município foi considerado o de maior prevalência da doença no Estado do Maranhão (MARTINS, et al., 2004).

Considerando a cidade de Caxias, a quinta maior do Estado em número de habitantes, na década de 90 as leishmanioses já eram consideradas como endêmicas, por registrar sempre casos da doença (SVE/CAXIAS-MA, 2015). Nos últimos dez anos registraram-se 181 casos, assim distribuídos: 2006 (24); 2007 (28); 2008 (15); 2009 (13); 2010 (12); 2011 (11); 2012 (14); 2013 (12); 2014 (23) e 2015 (29) conforme arquivos do SINAN/SES-MA (2016).

Há relatos de que a LTA pode se apresentar, basicamente, com três padrões epidemiológicos bem característicos: o silvestre, o ocupacional/lazer, rural/periurbano em áreas de ocupação antrópica (BRASIL, 2010; SILVEIRA, 2001). A cidade de Caxias tem apresentado um padrão epidemiológico rural e periurbano em áreas de acentuada atividade de desmatamento das áreas periféricas, implantação de assentamentos sem o

devido planejamento e benefícios urbanos necessários (GUIMARÃES-e-SILVA, et al., 2012).

Figura 4. Endemicidade da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2013.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2013

2.5 Leishmaniose Visceral Americana

É uma zoonose considerada dentre as doenças negligenciáveis, a que se encontra em maior expansão, com grande impacto e prejuízo à saúde pública. Na América Latina, estende-se desde o México até a Argentina, sendo o Brasil com concentração de 90% dos casos humanos registrados no Novo Mundo (LAINSON E RANGEL, 2005) (Figura 5). No Brasil, a LVA, era classificada como uma doença de caráter eminentemente rural, porém nos últimos anos houve significativa mudança deste perfil epidemiológico a partir de sua expansão e urbanização, comprovada pela ocorrência de inúmeros casos registrados nos grandes centros urbanos (SILVA et al., 2008; WERNECK, 2008).

As pesquisas destacam que a primeira grande epidemia urbana de LVA do Brasil concentrou-se em Teresina, capital do Piauí, posteriormente, a doença foi registrada na Capital do Rio Grande do Norte, a cidade de Natal e em São Luís, capital do estado do Maranhão, e, posteriormente, se espalhou para as outras regiões do país (WERNECK 2010; BRASIL, 2011).

Os primeiros casos da doença no estado do Maranhão tiveram origem no ano de 1982, devido ao fluxo migratório e às dificuldades encontradas para a implantação de

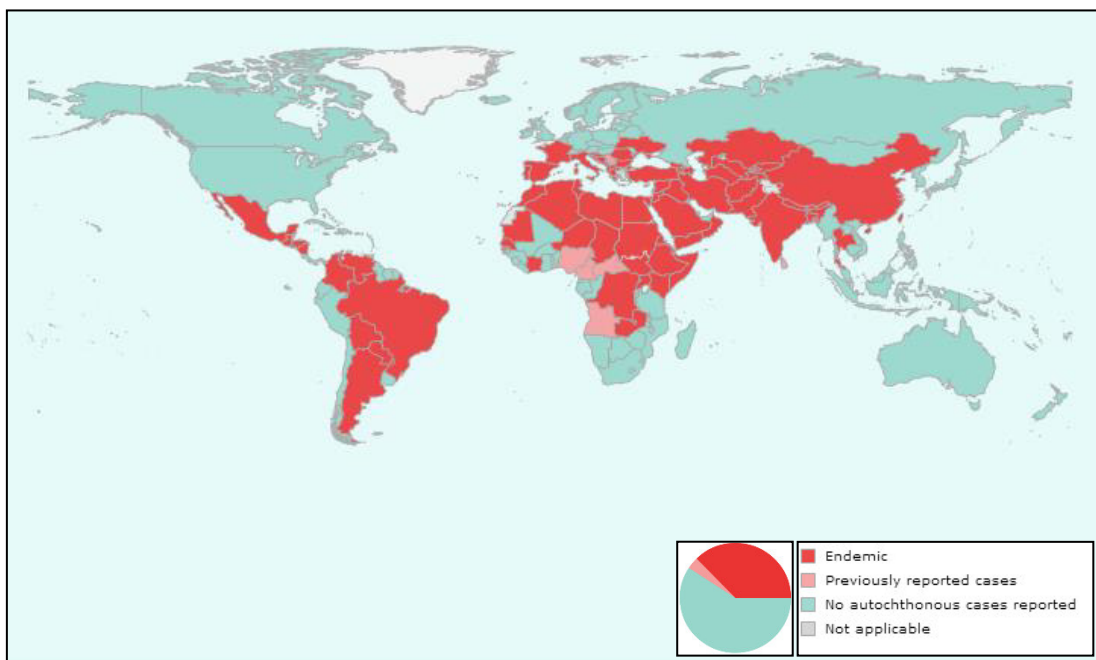
medidas de prevenção e controle (COSTA et al., 1995; SILVA et al., 1982, 1997, 2008; MENDES et al., 2002). Em Caxias, o registro dos primeiros casos de LVA coincidiu com a mesma época dos casos de LTA que foi na década de 90, a partir dessa data a doença tornou-se endêmica por registrar sucessivos casos da doença (SVE/CAXIAS-MA, 2015). Dessa forma, nos últimos dez anos registraram-se 352 casos, assim distribuídos em 2006 (56); 2007 (52); 2008 (32); 2009 (32); 2010 (34); 2011 (26); 2012 (13); 2013 (33); 2014 (36) e em 2015 foram notificados (19) casos da doença no município (SINAN/SES-MA, 2014).

A LVA se caracteriza por ser o tipo mais grave das leishmanioses, doença não contagiosa cuja transmissão ocorre especificamente por meio da picada de flebotomíneos fêmea pertencente à espécie *Lu. longipalpis* infectado com o parasito *Le. infantum*. É uma doença crônica, grave, que pode levar a óbito o indivíduo quando não se institui o tratamento adequado (BRASIL, 2014). É importante frisar que a LVA não é transmitida de pessoa para pessoa, esta acontece quando o parasito permanece na pele ou no sangue periférico do hospedeiro vertebrado, sendo ele humano ou canino (BRASIL, 2003).

A sintomatologia desta zoonose é similar em cães e seres humanos. Nos homens, a forma clássica caracteriza-se por apresentar sintomas como febre ondulante, fadiga, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e sinais de doença crônica (CHAPPUIS et al., 2007; MANNA et al., 2006). No cão, os sintomas mais comuns são lesões cutâneas em diversas partes do corpo, com tempo de incubação variável, com média de 3 a 7 meses, e a infecção pode ocorrer ainda de maneira oligossintomática e assintomática (PAIVA-CAVALCANTI, 2008). Dessa forma, tanto o surgimento da doença quanto sua evolução são consequência das interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (MANNA et al., 2006).

Nesse sentido, é importante conhecer os aspectos epidemiológicos da LVA, sobretudo nas regiões endêmicas o que é de fundamental importância para a entomologia médica, uma vez que é necessário a identificação de espécies incriminadas como vetoras, os hospedeiros preferenciais dos agentes etiológicos, bem como determinação da taxa de infecção natural, que servem de subsídios para os programas de controle da doença (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008).

Figura 5. Endemicidade da Leishmaniose visceral Americana, 2013.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2013.

2.6 Taxa de Infecção Natural em flebotomíneos por *Leishmania* spp.

O método clássico utilizado para detecção do parasito no intestino do flebotomíneo tem sido a dissecação do trato digestório de fêmeas recém-capturadas, seguido da visualização por meio do exame microscópico direto das formas flageladas. No Brasil, esse método permitiu a incriminação de muitas espécies de flebotomíneos como vetores (PESSÔA E COUTINHO, 1939; PESSÔA E PESTANA, 1940; COUTINHO, 1940; FORATINI, 1952).

As leishmânias apesar de apresentarem distribuição diferencial ao longo do tubo digestivo nos vetores, assumem forma flagelada indistinguível entre as espécies, pois os flebotomíneos também podem albergar outros parasitos como *Trypanosoma* e *Endotrypanum* que passam por um estágio de promastigota indistinguível de *Leishmanias* spp. dificultando o diagnóstico microscópico pela semelhança do agente etiológico e o isolamento em cultura (RODRIGUEZ et al., 1994; MICHALSKY, 2002; RODRIGUEZ et al., 2002).

Um fator limitante para utilização dessa técnica é a dificuldade de processar uma grande quantidade de espécimes capturados em área de elevada transmissibilidade, uma vez que dependem de muito tempo para sua execução, bem como, possuem baixa sensibilidade e eficácia (ARANSAY et al., 2000; PEREZ et al., 2007).

Estudos apontam a PCR como uma metodologia molecular de grande relevância para a pesquisa da infecção por *Leishmania* em reservatórios e flebotomíneos, pois tem aumentado a sensibilidade e especificidade da identificação do parasita (PAIVA et al., 2007; RANASINGLE et al., 2008; SILVA et al., 2008; DOUGALL et al., 2011; MICHALSKY et al., 2011; PITA-PEREIRA et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2011).

Pesquisas abordando a taxa de infecção por *Leishmania* spp. em flebotomíneos vetores etiológicos de leishmanioses, ainda é uma questão pouco estudada no estado do Maranhão. Os registros que se tem foram as pesquisas realizadas destacando a identificação de apenas *Leishmania* sp. em *Lu. whitmani* (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006) e de *Le. infantum* em *Lu. longipalpis* (SOARES et al., 2010).

Ambas as leishmanioses, tegumentar e visceral, são prevalentes no município de Caxias. Infecção natural de 0,76% de *Le. chagasi* foi encontrada em *Lu. longipalpis* por Nascimento et al. (2013). Os autores concluíram que, mesmo com baixa taxa de infecção, a espécie *Lu. longipalpis* é capaz de manter a endemicidade da LVA, o que explica a notificação de 44 casos humanos da doença somente no ano de 2013.

Estudos dessa natureza, com a utilização de técnicas de biologia molecular, contribuem significativamente para a correta identificação das espécies de *Leishmania* spp. que ocorrem nos vetores, pois a reação de PCR é um método mais específico e sensível quando comparados à dissecação individual (DOUGALL et al., 2011; MICHALSKY et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2011).

2.7 Fonte Alimentar de Flebotomíneos

O conhecimento dos hábitos alimentares de espécies de flebotomíneos tem sido muito útil no aperfeiçoamento dos conhecimentos sobre a ecologia e epidemiologia das leishmanioses e, neste sentido, tem norteado as atividades de controle e vigilância, pois ajuda a entender como cada espécie interage com o seu hábitat e como ocorre a transmissão da LVA e LTA em determinada área.

A identificação de fonte alimentar sanguínea pode indicar os reservatórios potenciais de *Leishmania* (BARATA et al., 2005; HAOUAS et al., 2007), ou até mesmo o papel atrativo que certos animais poderiam desempenhar, em relação ao homem, em área de transmissão destes parasitos (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008). Tais estudos vêm auxiliar nas atividades de controle e vigilância dessa doença (DIAS et al., 2003, QUARESMA et al., 2012).

De acordo com MARASSÁ et al. (2004) desde a década de 90, métodos imunológicos vêm sendo utilizados para se detectar a fonte alimentar sanguínea em artrópodes, como exemplo a técnica da precipitina que foi adaptada para a determinação da fonte alimentar sanguínea em mosquitos e outros insetos. Embora esta tenha sido a técnica mais utilizada, sua sensibilidade e especificidade é baixa, além de requerer grande quantidade de sangue, o que dificulta a sua utilização com insetos de pequeno porte. Segundo Edrissian e Hafizi (1982) a técnica imunoenzimática (ELISA), foi posteriormente adaptada ao estudo do hábito alimentar de culicídeos, tornando-se uma alternativa, e conforme vários autores esta técnica vem sendo aperfeiçoada ao longo dos anos (BLACKWELL et al., 1995; GOMES et al., 2001).

Algumas dessas técnicas são até hoje utilizadas, determinando as fontes alimentares sanguíneas de flebotomíneos empregando testes de precipitina como nos trabalhos de Barata et al. (2005) no Estado de Minas Gerais e de Dias et al. (2003), Oliveira-Pereira et al. (2008), Fonteles (2009) no Estado do Maranhão. Entretanto, a desvantagem de se usar esses testes é porque consomem tempo e apresentam baixa sensibilidade (SANT'ANNA et al., 2008; RAVASAN et al., 2009), além de apresentarem reatividade cruzada entre as espécies, requerem a produção de anticorpos específicos para uma ampla gama de hospedeiros potenciais, e são incapazes de apontar reservatórios imprevisíveis (HAOUAS et al., 2007).

Um dos problemas encontrados na identificação de fonte alimentar de repastos sanguíneos é a quantidade da amostra de sangue ingerida pelo inseto, que é muito variável. Por exemplo, ceratopogonídeos e flebotomíneos ingerem uma pequena quantidade de sangue (0,01 a 0,1 mg) e esta quantidade requer técnicas muito sensíveis para a identificação da fonte alimentar, enquanto que os triatomíneos podem ingerir mais que 400 mg de sangue. Outro fator é que os testes utilizados usam somente uma parte do sangue ingerido, visto que o processo digestivo inicia rapidamente (MASSARÁ et al., 2004).

Objetivando a identificação de fonte alimentar sanguínea em flebotomíneos, algumas alternativas têm sido utilizadas, como por exemplo, as técnicas moleculares empregadas para o estudo de fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos por ser mais sensíveis e precisas como a Reação da Cadeia da Polimerase - PCR (HAOUS et al., 2007; JAOUADI et al., 2013; STEUBER et al., 2005; SANT'ANNA et al., 2008).

Segundo Oshaghi et al. (2006a) outra técnica utilizada é a PCR seguida pelo corte com enzimas de restrição (PCR-RFLP) que tem demonstrado ser uma análise fácil,

confiável e rápida para a identificação do DNA. A PCR-RFLP se mostra eficiente quando comparada com a T-RFLP e RFLP-hibridização cujos custos são mais altos, e menos usados em países em desenvolvimento.

Nesse contexto, a realização de estudos objetivando estabelecer a fonte alimentar sanguínea dos flebotomíneos é de suma importância para o entendimento de sua biologia, além de possuir valor fundamental para a saúde pública, pois norteará as estratégias de controle para os órgãos de saúde da região.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Estudar a estrutura da comunidade dos flebotomíneos e a sua relação natural com *Leishmania* spp. e hospedeiros vertebrados em área de risco para leishmanioses no município de Caxias-MA.

3.2 Específicos

- ✓ Conhecer a riqueza, abundância e a diversidade de flebotomíneos que ocorrem no peridomicílio de residências rurais e urbanas;
- ✓ Estudar a ocorrência sazonal das espécies de flebotomíneos;
- ✓ Identificar a taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos capturadas;
- ✓ Investigar as fontes alimentares sanguíneas das fêmeas de flebotomíneos ingurgitados.

4. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, as leishmanioses vêm se destacando no contexto da saúde pública, em consequência da sua urbanização, devido a sua rápida expansão geográfica e reemergência em focos endêmicos antigos, sendo os casos humanos frequentemente associados à pressão antrópica sobre o meio ambiente, e a expansão da LVA pode estar intimamente ligada a alguns locais com características rurais (BRASIL, 2014).

Vários fatores contribuem para a expansão das leishmanioses, como o crescimento migratório favorecendo a expansão das áreas periféricas dos médios e grandes centros urbanos, com instalação de residências em áreas de vegetação, favorecendo o contato do vetor com o homem e com os reservatórios domésticos; desmatamento atrelado ao processo de projetos imobiliários que favorece de forma negativa as alterações ambientais, que vem modificando o perfil epidemiológico das leishmanioses no município.

Trabalhos realizados na área urbana de Caxias, estado do Maranhão, sobre levantamento e monitoramento da fauna flebotomínica apontam para um elevado índice de abundância relativa do vetor, estando estes distribuídos em toda a área urbana da cidade. E trabalhos objetivando conhecer a infecção natural por *Leishmania* realizado em Caxias detectou a presença de *Leishmania infatum* em *Lutzomyia longipalpis* (GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013).

O controle das leishmanioses em áreas endêmicas requer o conhecimento da ecologia, epidemiologia das espécies de *Leishmania* e fonte alimentar dos flebotomíneos presentes na região.

O município de Caxias é classificado como área endêmica por registrar casos humanos e caninos de LVA e casos humanos de LTA em áreas urbanas e periurbanas, e por apresentar alta densidade de flebotomíneos, principalmente o vetor da LVA *Lu.longipalpis* seguida da espécie *Lu. whitmani*, principal espécie incriminada como vetor da LTA, e a presença de cães com sorologia positiva para LVA, essa situação predispõe à manutenção da doença no Município (GUIMARÃES-e-SILVA et al., 2012).

Nesse contexto, faz-se necessário o estudo dos vetores, taxa de infecção por leishmânias e a identificação da fonte alimentar das espécies de flebotomíneos, que são de extrema importância no sentido de se conhecer os diferentes elos da cadeia epidemiológica das leishmanioses nas áreas periurbanas e rurais do município de Caxias,

interior do Estado do Maranhão. Dessa forma, essas informações irão subsidiar os serviços de saúde pública, principalmente nas áreas de ocorrência de leishmanioses.

As estratégias de controle devem ser específicas conforme a situação epidemiológica de cada local. A identificação do agente etiológico circulante nas áreas endêmicas, o conhecimento dessas áreas, bem como do papel dos hospedeiros-reservatórios, são fatores importantes para definição de medidas profiláticas adequadas para a redução da incidência da doença.

Neste sentido, a relevância do trabalho pauta-se no sentido de colaborar para o conhecimento da ecologia dos vetores, taxa de infecção natural por *Leishmania* e a fonte alimentar dos flebotomíneos que contribuem para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In RANGEL, E. F.; & LAINSON, R. (eds), **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz: Rio de Janeiro, p. 207- 255, 2003.
- ARAÚJO, J. C.; REBÊLO, J. M. M.; CARVALHO, M. L.; BARROS, V. L. L. Composição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de Raposa - MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. **Entomología y Vectores**, 7: 33-47, 2000.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. WHO Leishmaniasis World wide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE** 7: e 35671, 2012. Available: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicirclekinetoplastic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 1933–1938, 2000.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, 30: 1269-1281. 2000.
- BARATA, R. A.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W., SILVA, J. C.; PRATA, A.; FIUZA, J.; LOROSA, E. S.; FIÚZIA, J. A.; GONÇALVES, C.M.; DE PAULA, K. M.; DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(5): 421-425, 2005.
- BARROS, V. L.; REBÊLO, J. M. M.; SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do município do Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. **Cadernos de Saúde Pública**, 16(1): 265-270, 2000.
- BATES, P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. **International Journal for Parasitology**, 37: 1097-1106, 2007.
- BLACKWELL, A.; BROWN, M.; MORDUE, W. The use of an enhanced ELISA method for the identification of *Culicoides* bloomeals in host-preference studies. **Medical and Veterinary Entomology**, v.9, p. 214-218, 1995.
- BERNAL, A. M.; REBÊLO, J. M. M. Distribuição de flebotomíneos nos ambientes antrópicos e silvestres do município de Santa Quitéria, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(Supl.): 427, 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 120 pp. 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 120 pp. 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, 1ª. ed., 5. reimpr. – Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Visceral**. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 78 pp. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, SVS/MS. Situação epidemiológica, dados. [online]. Brasília, 2014 [citado 2014, jan 15] Available at: <http://portal.saude.gov.br/opition=comcontent&d=11018&Itemid=667>.

CARVALHO, M. L.; REBÊLO, J. M. M.; BARROS, V. L. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. **Entomología y Vectores**, 7(1):19-32, 2000.

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? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C. R.; SILVA, A. C. M.; SERRA-NETO A.; GALVÃO, C. E. S.; SILVA, C. M. P. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no estado do Maranhão: aspectos epidemiológicos, clinicoevolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 25: 115-123, 1992.

COSTA, J. M. L.; VIANA, G. M. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; ALVIM, A. C.; BURATTINI, M. N.; SILVA, A. R. Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A Evolução de uma Epidemia. **Cadernos de Saúde Pública**, 11 (2): 321-324, 1995.

COSTA, J. M. L.; BALBY, I. T. A.; ROCHA, E. J. S.; SILVA, A. R. DA.; REBÊLO, J. M. M.; FERREIRA, L. A.; GAMA, M. E. A.; BRANCO, M. DOS R. F.F.; BURALTINI, M. N.; SOARES, N. DE J. S. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**. 31(3):279-288, 1998.

COSTA, J. M. L.; REBÊLO, J. M. M.; SALDANHA, A. C. R.; BALBY, M. E. A. G.; BEZERRIL, A. C. R.; MAIA, A. N. S. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e perspectivas de controle no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista do Hospital Universitário/UFMA**. 6(1):32-38, 2005.

COUTINHO, J. O. Localização de formas em leptomonas, possivelmente de *Leishmania braziliensis*, na faringe de *Phlebotomus pessoai* naturalmente infectado. **An. Faculdade de Medicina de São Paulo**, 16: 163-71, 1940.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, 27: 305-318, 2004.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, 19:1373-1380, 2003.

DOUGALL, A. M.; BRUCE, A.; HOLT, D. C.; HARRIS, T.; SULTAN, H. A.; BATES, P. A.; ROSE, K.; WALTON, S. A. Evidence incriminating midges (Diptera ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. **International Journal for Parasitology**, n.41, p. 571-579, 2011.

EDRISSIAN, G. H.; HAFIZI, A. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of *Anopheles* mosquito blood meals. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, 76: 54-56, 1982.

FONTELES, R. S. **Estudo do ciclo de vida, fonte alimentar e capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* no Maranhão, Brasil**, Dissertação, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 69 p, 2009.

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

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; BOGIONI, P. C.; DORVAL, M. E.; CRISTALDO, C.; ROCHA, H. C. (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra Bodoquena, Mato Grosso do Sul state Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 47 (2) 283-96, 2003.

GOMES, L. A. M.; DUARTE, R.; LIMA, D. C.; DINIZ, B. S.; SERRÃO, M. L.; LABARTHE, N. Comparison between precipitin and ELISA tests in the blood meal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes flaviventris* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96: 693-695, 2001.

GRIMALDI Jr., G.; TESH, R.B.; MACMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 41: 687-725, 1989.

GUIMARÃES-E-SILVA, A. S.; LEONARDO, F. S.; COSTA, E. R. S.; ALCÂNTARA, S. H.; PINHEIRO, V. C. S.; REBELO, J. M. M. The Occurrence of Flebotomines (*Dipterapsychodae*) in a Leishmaniasis Endemic Area. **Revista Paraense de Medicina**, v. 26 (2) abril-junho, 23-28, 2012.

HAOUAS, N.; PESSON, B.; BOUDABOUS, R.; DEDET, J. P.; BABBA, H.; RAVEL, C. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 77(6): 1054-1059, 2007.

JAOUADI, K.; HAOUAS, N.; CHAARA, D.; BOUDABOUS, R.; GORCII, M.; KIDAR, A.; DEPAQUIT, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; BABBA, H. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) blood meal sources in Tunisian cutaneous leishmaniasis foci: could *Sergentomyia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens? **Annals of the Entomological Society of America**, 106: 79-85, 2013.

JÚNIOR, A. N. A.; SILVA, O.; MORAES, J. L. P.; NASCIMENTO, F. R. F.; PEREIRA, Y. N. O.; COSTA, J. M.L.; REBÊLO, J. M. M. Foco emergente de Leishmaniose Tegumentar (LT) no entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Nordeste, Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, 79(Supl.3):103-109, 2009.

KAYE, P. & SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 9 (8): 604-15, 2011.

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**, 100: 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (eds). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, 1:1-120, 1987.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V. F.; MICHELE, P. L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, 142(3-4): 271-80, 2006.

MARASSÁ, A. M.; CONSALES, C.A.; GALATI, E. A. B. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(6): 441-446, nov-dez, 2004.

MARTINS, L. M.; REBÊLO, J. M. M.; SANTOS, M. C. F. V.; COSTA, J. M. L.; SILVA, A. R. DA. FERREIRA, L. A. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. **Cadernos de Saúde Pública**, 20: 735-43, 2004.

MENDES, W. DA.; SILVA, A. A. M. DA.; TROVÃO, J. DE R.; SILVA, A. R. DA.; COSTA, J. M. L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35: 227-231, 2002.

MICHALSKY, E. M. FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Phlebotominae) **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo. 44, 255-9. 2002.

MICHALSKY, E. M., GUEDES, K. S.; SILVA, F. O. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DIAS, C. L. F.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 44, 58-62, 2011.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; SILVA, M. H.; VIANA, G. M. C.; LEONARDO, F. S.; BEZERRA, G. F. B.; SILVA, A. S. G.; SOARES, V. C. P.; PEREIRA, S. R. F.; REBÊLO, J. M. M.; BRAZIL, R. P. Spacial dynamics of urban populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Caxias, State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46: 555-559. 2013.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Preferência alimentar sanguínea de flebotômíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cadernos Saúde Pública**, 24(9): 2183-2186, 2008.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotômíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmanias* pp. na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(6): 540-543, 2006.

OSHAGHI, M. A.; CHAVSHIN, A. R.; VATANDOOST, H 2006a. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. **Experimental Parasitology**, 114: 259-264, 2006a.

PAIVA, B. R.; SEGUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; JUNIOR, H. F. A.; MALQFRANTE, R. S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania spp.* em flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, Jan, 2007.

PAIVA-CAVALCANTE, M. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães.** Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

PENHA, T. A.; SANTOS, A. C. G.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; GUERRA, R. M. S. N. C. Fauna de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral canina na região metropolitana de São Luís-MA. **Biotemas**, 26: 121-127, 2013.

PESSÔA, S. B.; COUTINHO, J. O. Infecção natural do *Phlebotomus pessoai* por formas de leptomonas, possivelmente de *Leishmania braziliensis*. **Revista de Biologia e Higiene**, 10: 139-142. 1939.

PESSÔA, S. B.; PESTANA B. R. Infecção natural do *Phlebotomusmigonei* por formas de leptomonas, provavelmente *Leishmania braziliensis*. **Acta Médica**, 5: 106-111, 1940.

PEREZ, J.E.; VELAND, N.; ESPINOSA, D.; TORRES, K.; OGUSUKU, E. LLANOS-CUENTAS, A.; GAMBOA, D.; ARÉVALO, J. Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102: 655–658, 2007.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G. D.; PEREIRA, T. A.; ZWETSCH, A.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Tropica**, n. 120, 273-275, 2011.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C. DE.; SECUNDINO, F. C. A interação do Protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. Centro de Pesquisa René Racho – Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-MG. 2012.

QUARESMA, P. F.; CARVALHO, G. M. L.; RAMOS, M. C. N.; ANDRADE FILHO, J. D. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 107 (4): 480-485, 2012.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M. E.; HAMILTON, J. G.; BATES, P.; MAINGON, R. D. A. Real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, v. 102, p. 875-882, 2008.

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

RAVASAN, N. M.; OSHAGHI, M. A.; JAVADIAN, E.; RASSI, Y.; SADRAEI, J.; MOHTARAMI, F. Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, 3(1): 8-18, 2009.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, This article's doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153557. 58: 227-50, 2013.

REBÊLO, J. M. M.; LEONARDO, F. S.; COSTA, J. M. L.; PEREIRA, Y. N. O.; SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 15: 623-630, 1999b.

REBÊLO, J. M. M.; MENDES, W. A.; COSTA, J. M. L.; CAVALEIRO, N. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia*, França 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 12: 545-549, 1996.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S. Flebotomíneos da Amazônia maranhense. IV. Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. **Entomología y Vectores**, 7: 61-72, 2000a.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; COSTA, J. M. L.; FERREIRA, L. A.; SILVA, A. R. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, 33:11-19, 2000b.

REBÊLO, J. M. M.; ROCHA, R. V.; MORAES, J. L.P.; SILVA, C. R. M.; LEONARDO, F. S.; ALVES, G. A. The fauna of phlebotominae (Diptera, Psychodidae) in diferente phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n.3, 494-500, 2010b.

RODRIGUES, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 9, 2246-2252, 1994.

RODRIGUEZ, N.; LIMA, H.; AGUIAR, C.; RODRIGUEZ, A.; BARKER, D.; CONVIT, J. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, v. 96. Suplemento 1, 105-109, 2002.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of infective stage of *Leishmania* promastigotas. **Science**, 223: 1417-1419, 1984.

SANT'ANNA, M. R. V.; JONES, N. G.; HINDLEY, J. A.; MENDES-SOUSA, A. F.; DILLON, R. J.; CALVACANTE, R. R.; ALEXANDER, B.,; BATES, P. A. Blood meal identification and parasite infection in laboratory-fed and field-captured. *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Tropica**, 107: 230-237, 2008.

SHERLOCK, I. A. A Importância dos Flebotomíneos. In. RANGEL, E F. E.; LAISON, R. 2003. Flebotomíneos do Brasil, **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, p. 15-21, 2003.

SHIMABUKURO, P H. F.; TOLEZANO, J. E.; GALATI, E. A. B. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, (27): 399-441, 2011.

SILVA, A. R.; MARTINS, G.; MELO, J. E. M.; ARAUJO, P.; MENDES, J. R.; MENDES, M. G. Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (Estado do Maranhão), Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 21: 1-62, 1979.

SILVA, A. R.; MENDES, J. R.; RODRIGUES, M. L. M.; CARVALHO, Z. S.; REIS, F. M. P.; MELO, J. E. M.; MORAIS, J. C. O. Leishmaniose cutânea difusa (LCD): registro de um caso em Buriticupu (Estado do Maranhão, Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 23:31-35, 1981.

SILVA, A. R. DA.; VIANA, G. M. C.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M. DO. D. S. D.; COSTA, J. M.L. Leishmaniose Visceral (Calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: Evolução e Perspectiva. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(5):359-368, 1997.

SILVA, A. R.; TAUIL, P. L.; CAVALCANTE, M. N. S. [Epidemiological situation of visceral leishmaniasis on the Island of São Luis, State of Maranhão]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 358-64, 2008.

SILVA, L. B. DA.; AQUINO, D. M. C. DE.; LEONARDO, F. S.; GUIMARÃES-E-SILVA, A. S.; MELO, M. N.; REBÊLO, J. M. M.; PINHEIRO, V. C. S. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em focos urbanos de Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 44 (2): 181-193, 2015.

SILVEIRA, F. T. **Patogenia da leishmaniose tegumentar americana**: caracterização clínica, histopatológica e imunológica da leishmaniose disseminada, com ênfase na *Leishmania (L.) amazonensis*. Tese de Doutorado. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 2001.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Casos de Leishmaniose Tegumentar no Maranhão. 2014. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabgi>, acesso em: 11/03/2014.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Casos de Leishmaniose Tegumentar no Maranhão. 2016. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabgi>, acesso em: 10/05/2016.

SOARES, M. R. A.; CARVALHO, C. C.; SILVA, L. A.; LIMA, M. S. C. S.; BARRAL, A. M. P.; REBÊLO, J. M. M.; PEREIRA, S. R. F. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 12 2409-2413, 2010.

SOUZA, M. B. Vetores das leishmanioses no município do Rio de Janeiro. **Boletim de Divulgação Técnica e Científica**, nº 9 – dezembro de 2000. Secretaria Municipal de Saúde – Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária/SCZ – Centro de Estudos – Prefeitura do Rio de Janeiro, 2000.

STEUBER, S, ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P.H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host specie identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, 97: 247-54, 2005.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GURTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, 118: 1301-1310, 2008.

SVE/CAXIAS-MA – Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Município de Caxias, Maranhão. Fevereiro de 2015.

TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI ELIAS, C. R.; LOROSA, R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66: 709-717, 2001.

VASCONCELOS, D. R. B.; MELO, L. M.; ALBUQUERQUE, E. S.; LUCIANO, M. C. S.; BEVILAQUA, M. L. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 3, 234-239, 2011.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de saúde pública/Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, Escola Nacional de Saúde Pública, v. 24, n. 12, p. 2937-40, 2008.

WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 26(4): 644-645, 2010.

WHO - World Health Organization – Leishmaniasis. [cited 2014 Jul 14] Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em 03 de julho de 2014.

YOUNG, D. G.; DUCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memories of the American Entomological Institute**, 54, 1994.

6. ARTIGOS

ARTIGO 1 – REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em peridomicílios rurais e urbanos em área de transmissão de leishmaniose

A.S. GUIMARÃES-E-SILVA¹; J. SOARES-DA-SILVA²; V.C.S. PINHEIRO³; e
J.M.M. REBÊLO⁴

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação da Rede Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Rede Bionorte da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

²Curso de Ciências Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Campos VII, Codó, Maranhão, Brasil

³Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Caxias, MA, Brasil

⁴Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

Endereço para correspondência: José Manuel Macário Rebêlo Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses S/N, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brasil, São Luís, Maranhão, Brasil (e-mail: macariorebello@uol.com.br).

RESUMO

Estudou-se a estrutura da comunidade de flebotomíneos em ambientes peridomiciliares urbano e rural, em área de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Os espécimes foram capturados com armadilha luminosa CDC em 20 residências, assim especificadas: 10 na zona urbana e 10 na zona rural, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015. As residências foram selecionadas de acordo com o registro de casos de leishmanioses e criação de animais domésticos. Coletaram-se 15.892 espécimes pertencentes a 17 espécies: uma do gênero *Brumptomyia*, e 16 do gênero *Lutzomyia*. As espécies mais abundantes foram *L. longipalpis* (90,26%) e *L. whitmani* (7,65%). Na zona urbana, a abundância de flebotomíneos foi maior no período chuvoso, e na zona rural, na estação seca. *L. longipalpis* e *L. whitmani* ocorreram nas duas estações, ainda que a primeira tenha predominado na estação chuvosa, e a segunda, na estação seca. A presença frequente dessas duas espécies justifica a ocorrência em Caxias de casos de LTA e LVA. Essas informações são importantes tanto para o conhecimento da ecologia dos flebotomíneos, como para auxiliar os órgãos de saúde na prevenção e controle dessas doenças.

Palavras-chave: Ecologia, Vetor, Epidemiologia, Leishmaniose, Ambiente Antrópico.

ABSTRACT

This research studied the structure of the sandflies community in rural and urban peridomestic environments in Brazil, in the transmission areas for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and American Visceral Leishmaniasis (AVL). The specimens were caught using CDC (Center of Disease Control) light traps in 20 homes (10 located in urban areas and 10 in rural areas) between March 2013 and February 2015. The residences were selected according to the registration of cases of leishmaniasis and domestic animals. A total of 15.892 specimens belonging to 17 species were collected: 1 from the genus *Brumptomyia* and 16 from the genus *Lutzomyia*. The most abundant species were *L.longipalpis* (90.26%) and *L.whitmani* (7.65%). The abundance of the sandflies was higher in the rainy season in the urban areas and in the dry season in the rural areas. *L. longipalpis* and *L. whitmani* occurred in both seasons, and were predominant in the rainy and dry seasons respectively. The frequent presence of these two species explained the occurrences of ACL and AVL in the municipality of Caxias, Maranhão. These findings are important both for increasing knowledge of the ecology of sandflies and for aiding health authorities in preventing and controlling these diseases.

Keywords: Vector, Ecology, Epidemiology, Anthropic Environment, Tropical Disease

INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos pertencem à família Psychodidae, constituída por dípteros nematóceros de pequeno porte. Nessa subfamília, estão incluídas espécies hematófagas, com grande interesse médico e veterinário, por serem vetores dos agentes etiológicos das leishmanioses em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (READY, 2013).

As espécies de flebotomíneos vetoras mais importantes pertencem a dois gêneros: *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. As espécies desses gêneros estão implicadas na transmissão de espécies de protozoários do gênero *Leishmania* spp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), os agentes etiológicos das leishmanioses (DESJEUX, 2004).

As leishmanioses são doenças que ocorrem em 98 países distribuídos em cinco dos seis continentes. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano. As leishmanioses manifestam-se sob duas formas clínicas básicas, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014).

No Brasil, essas doenças vêm se destacando no contexto da saúde pública, em consequência da urbanização, à rápida expansão geográfica e à reemergência em focos endêmicos antigos, sendo os casos humanos frequentemente associados à pressão antrópica sobre o meio ambiente (BRASIL, 2015).

Os flebotomíneos são encontrados em todos os estados brasileiros com muitas espécies, distribuindo-se nas áreas nordestinas (AGUIAR & MEDEIROS, 2003). No Maranhão, Estado situado no Nordeste brasileiro, são conhecidas 91 espécies, das quais quatro pertencem ao gênero *Brumptomyia*, e 87 ao gênero *Lutzomyia* (REBÊLO et al., 2010b). Essa riqueza de espécies justifica a situação endêmica da doença, pois nesta pesquisa, entre os anos de 2012 e 2013, foram registrados 4.249 casos de LTA e 996 casos de LVA no estado (SINAN, 2014).

No município de Caxias-MA, já foram registradas 11 espécies de flebotomíneos, uma pertencente ao gênero *Brumptomyia*, e 10, ao gênero *Lutzomyia* (GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2012). É alta a densidade desses flebotomíneos, principalmente do vetor da LVA, o *L. longipalpis*, e de *L. whitmani*, uma das espécies de flebotomíneos incriminadas como vetor da LTA (LAINSON & SHAW, 1979; RANGEL

& LAINSON, 2003). Nesse contexto, tal município é classificado como área endêmica de LVA humano e canino e de LTA em áreas urbanas e periurbanas (GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2012). Para se ter uma ideia da situação, no período compreendido entre os anos de 2012 e 2014, foram registrados 59 casos de LTA e 103 casos de LVA (BRASIL, 2014; SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO-SINAN, 2014).

Diante desse fato, realizou-se o monitoramento da fauna de flebotomíneos em foco de LVA e LTA, objetivando conhecer a composição, riqueza e abundância mensal e sazonal das espécies existentes ao longo de dois anos, no município de Caxias, Estado do Maranhão nos peridomicílios de áreas urbanas e rurais. As informações obtidas irão subsidiar os serviços de saúde pública, principalmente nas áreas de ocorrência de leishmanioses.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. O estudo foi desenvolvido no município de Caxias (04°51'32''S e 43°21'22''W), estado do Maranhão, situado a 66m de altitude, na mesorregião do Leste Maranhense e na Microrregião da cidade de Caxias, com área aproximada de 5.150,667 Km². A população é de aproximadamente 159.396 habitantes, e apresenta densidade demográfica em torno de 30,12 hab/Km² (IBGE 2015).

A vegetação predominante é a savana do tipo cerrado, o clima é o tropical quente e sub-úmido e apresenta apenas duas estações bem definidas: chuvosa e seca. Durante o período chuvoso (janeiro a junho), a média de temperatura é de 26,1°C, e no período seco (julho a dezembro) a média chega a 35,6°C (GEPLAN, 2002). A umidade relativa do ar máxima ocorre nos meses de março e abril, com valor de 83%, no entanto, no período seco pode chegar a 57%, com média anual de 70%.

As áreas de estudo propriamente ditas foram o bairro periurbano Salobro e o povoado rural Bom Jardim. Salobro (4°53'05''S e 43°22'18''W) está localizado às margens da BR 316, com 963 prédios e uma população aproximada de 2.383 habitantes. Banhado pelo riacho Salobro, é uma área com muita vegetação, com ruas pavimentadas com asfalto, saneamento básico precário e edificações, em sua maioria, de tijolos. Comumente, encontra-se nos quintais das residências um grande acúmulo de lixo depositado a céu aberto, constituído, predominantemente, por matéria orgânica, que pode se transformar em criadouros para os flebotomíneos. As pessoas ainda conservam o hábito de criar animais domésticos como galinhas, equinos, suínos (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Quintal com manejo (ponto 1), A: Presença de galinhas, esgoto a céu aberto. B: Presença de cão e plantas. C e D: Local acidentado com presença de galinha e plantas, local sombreado.



Fonte: A.S. Guimarães-e-Silva, 2015

Figura 2. Quintal sem manejo (ponto 2), A e B: Presença de entulho, plantas e cão. C: Acúmulo de madeira e cão, local sombreado. D: Criação de suíno em chiqueiro



Fonte: A.S. Guimarães-e-Silva, 2015

O povoado Bom Jardim ($5^{\circ}02'23''S$ e $43^{\circ}18'02''W$) localiza-se a 23 km da sede de Caxias e é uma área banhada pelo riacho Poraquê. Apresenta 103 prédios, com aproximadamente 256 habitantes e sua principal fonte de renda vem da agricultura. A vegetação nativa é alterada pela ação antrópica para a produção de alimentos do tipo subsistência. O povoado caracteriza-se também por criação de

suínos, galinhas e gado bovino, além de animais como equinos e cães (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Quintal com manejo (ponto 4), A: Presença de plantas em jarros, canteiros, B: presença de chiqueiro, com mata ao redor. C: Presença de galinheiro, D: local sombreado, com árvores e anexo desativado.



Fonte: A.S. Guimarães-e-Silva, 2015

Figura 4. Quintal sem manejo (ponto 6), A: Anexo desativado e abandonado. B: Canteiro com presença de mato ao redor. C: Presença de entulhos, galinha e grande quantidade de mato ao redor. D: Casa de forno, mato ao redor da casa e presença de galinha.



Fonte: A.S. Guimarães-e-Silva, 2015

Amostragem. Os flebotomíneos foram estudados no período de março de 2013 a fevereiro de 2015. Os espécimes foram capturados com armadilhas luminosas do tipo CDC (Center on Disease Control), alimentadas com baterias de 6 volts. As armadilhas foram instaladas nos abrigos de animais domésticos, a uma altura de 1,5 metros do solo, uma vez por mês, das 18 às 6 horas, durante duas noites consecutivas. Foram colocadas 10 armadilhas no bairro Salobro, e 10 no bairro Bom Jardim, uma por casa, totalizando 20 armadilhas. Considerando as 20 armadilhas x 12 horas x 2 noites, o esforço de captura foi de 5.760 horas de coletas. Todas as residências foram georreferenciadas por meio do Sistema de Posicionamento Global (GPS), com consentimento de todos os moradores.

Os insetos capturados foram sacrificados por resfriamento e logo após foram colocados em placas de Petri, triados sob estereomicroscópio e acondicionados em microtubos a seco, contendo as seguintes informações: local de coleta, data, número da armadilha. Os espécimes foram separados por sexo. Os machos foram diafanizados utilizando hidróxido de potássio (KOH) a 10%, por duas horas; em seguida foram lavados com solução de ácido acético a 10% por 20 minutos, três séries de água destilada por 15 minutos cada, fenol por 24 horas e montados inteiros entre lâmina e lamínula com fluído de Berlese (VILELA et al., 2003).

As fêmeas foram dissecadas, a cabeça e os últimos segmentos abdominais foram clarificados com hidróxido de potássio (KOH) a 10% por duas horas; em seguida, foram lavados com solução de ácido acético a 10% por 20 minutos, três séries de água destilada por 15 minutos cada, fenol por 24 horas e montados entre lâmina e lamínula com fluído de Berlese. O restante do corpo foi colocado em microtubo individual e armazenado a seco para realização dos procedimentos moleculares. Os flebotomíneos foram identificados morfológicamente utilizando chave proposta por YOUNG; DUNCAN (1994).

Análises estatísticas. Para as análises ecológicas, utilizou-se o índice de diversidade de Shannon, o índice de dominância de Simpson e o índice de equitabilidade de Pielou. A análise estatística incluiu o teste não paramétrico do Qui-quadrado, para analisar as diferenças entre as proporções de machos e fêmeas, ambiente de coleta (rural e urbano) e estações do ano. O software estatístico utilizado foi o R, versão 3.13, 2015. Calculou-se também a distribuição das espécies de flebotomíneos no período de estudo por meio do índice de constância, fórmula: $C = P \times 100/N$, onde P = número de coletas com a espécie estudada e N = número total de coletas efetuadas. Assim, as espécies foram

classificadas em constantes, quando presentes em mais de 50 % das coletas, acessórias aquelas encontradas entre 25 % e 50 % das coletas ou acidentais, encontradas em menos de 25 % das coletas (SILVEIRA NETO et al., 1976).

RESULTADOS

Foram encontradas 17 espécies de flebotomíneos, pertencentes a dois gêneros: *Brumptomyia* (FRANÇA & PARROT, 1921) e *Lutzomyia* (FRANÇA, 1924). Para o gênero *Lutzomyia*, identificaram-se três subgêneros: *Lutzomyia* (1 espécie), *Nyssomyia* (2), *Sciopemyia* (1) e cinco grupos: *Migonei* (6), *Oswaldoi* (3), *Saulensis* (1), *Aragaoi* (1) e *Dreisbachi* (1). Na tabela 1, observa-se que a zona rural apresentou maior riqueza de espécies (S=14) que a zona urbana (S=12). No entanto, três espécies presentes na zona urbana não foram encontradas na zona rural: *L. goiana*, *L. migonei* e *L. sallesi*. Por outro lado, *L. saulensis*, *L. oswaldoi*, *L. flaviscutellata*, *L. aragaoi* e *L. hermalenti*, presentes na zona rural, não ocorreram na zona urbana, pelo menos durante o desenvolvimento desse estudo. As demais espécies estiveram presentes em ambos ambientes, urbano e rural (Tabela 1).

No total, capturaram-se 15.892 espécimes de flebotomíneos. A proporção de machos (77,85%) foi significativamente maior do que das fêmeas (22,15%) ($X^2=31.0918$, $df=1$, $p\text{-value } 2.46 \times 10^{-8}$). A espécie mais abundante foi *L. longipalpis*, (90,01%), seguida por *L. whitmani* (7,63%). As demais espécies representaram apenas 2,12% (Tabela 1). A abundância foi maior na zona urbana (77,6%) que na zona rural (22,4%). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($X^2 = 4.8552$, $df=1$, $p\text{-value } 0,02$). Na zona rural, do total de 3.554 espécimes coletados, 57,06% eram machos, contra 42,94% de fêmeas. Na zona urbana esse número aumentou para 12.338 espécimes, entre machos (83,84%) e fêmeas (16,16%). Essas diferenças foram estatisticamente significativas ($X^2 = 5.5808$, $df=1$, $p\text{-value } 0,01$).

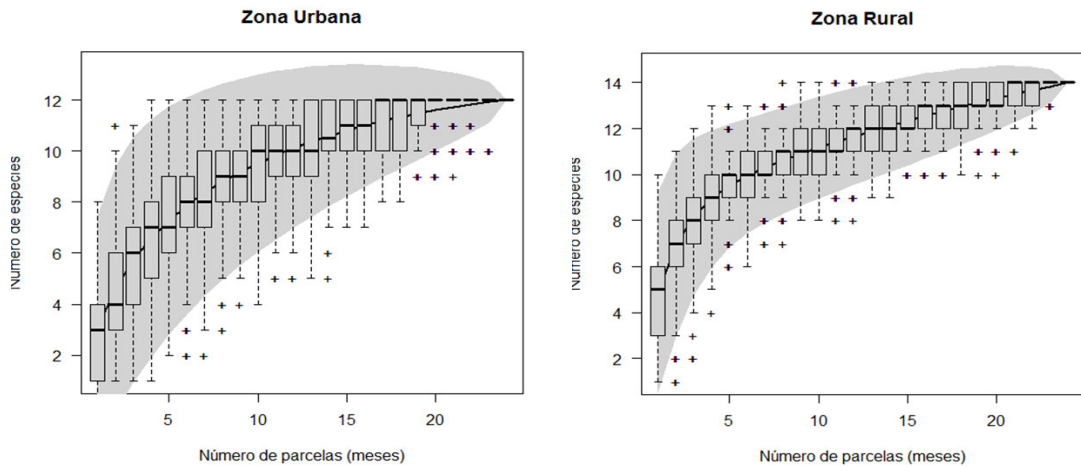
O índice de diversidade de Shannon foi maior na Zona Rural ($H' = 1.0094$) do que na Urbana ($H' = 0.1066$). O índice de dominância de Simpson na zona rural foi superior (0.5301) ao da zona urbana (0.0312). Já o Índice de Equitabilidade de Pielou foi mais alto na zona rural (0.3825) que na zona urbana (0.0429). Por meio da análise da curva de acumulação de espécies (curva do coletor) (Figura 5), observou-se que os índices obtidos da riqueza de espécies foram sempre próximos ao longo do estudo tanto para a zona urbana, como para a rural, indicando que o número de coletas realizadas possibilitou atingir a assíntota, sendo provável que todas as espécies que ocorrem nas duas áreas tenham sido encontradas.

Tabela 1 - Riqueza e abundância relativa das espécies de flebotomíneos em área rural e urbana no município de Caxias, Estado do Maranhão, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015.

Environment	Rural				Urban				Total			
	M	F	Soma	%	M	F	Soma	%	M	F	Nº	%
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1287	874	2161	60,8	10232	1911	12143	98,42	11519	2785	14304	90,0
<i>Lutzomyia whitmani</i>	631	488	1119	31,49	81	13	94	0,76	712	501	1213	7,6
<i>Lutzomyia evandroi</i>	33	39	72	2,03	7	11	18	0,15	40	50	90	0,6
<i>Lutzomyia lenti</i>	18	12	30	0,84	14	25	39	0,32	32	37	69	0,4
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>	8	38	46	1,29	2	11	13	0,11	10	49	59	0,4
<i>Lutzomyia termitophila</i>	9	22	31	0,87	3	8	11	0,09	12	30	42	0,3
<i>Lutzomyia cortelezzi</i>	0	1	1	0,03	0	2	2	0,02	0	3	3	0,0
<i>Lutzomyia sordelli</i>	8	33	41	1,15	4	7	11	0,09	12	40	52	0,3
<i>Lutzomyia saulensis</i>	0	1	1	0,03	-	-	-	-	0	1	1	0,0
<i>Lutzomyia oswaldoi</i>	3	0	3	0,08	-	-	-	-	3	0	3	0,0
<i>Lutzomyia goiana</i>	-	-	-	-	0	1	1	0,01	0	1	1	0,0
<i>Lutzomyia migonei</i>	-	-	-	-	0	1	1	0,01	0	1	1	0,0
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	1	0	1	0,03	-	-	-	-	1	0	1	0,0
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	0	2	2	0,06	-	-	-	-	0	2	2	0,0
<i>Lutzomyia sallesi</i>	-	-	-	-	-	3	3	0,02	0	3	3	0,0
<i>Lutzomyia hermalenti</i>	0	1	1	0,03	-	-	-	-	0	1	1	0,0
<i>Brumptomyia avellari</i>	30	15	45	1,27	1	1	2	0,02	31	16	47	0,3
Total	2028	1526	3554	22,4	10344	1994	12338	77,6	12372	3520	15892	100,0
%	57,06	42,94	100		83,84	16,16	100		77,85	22,15	100	

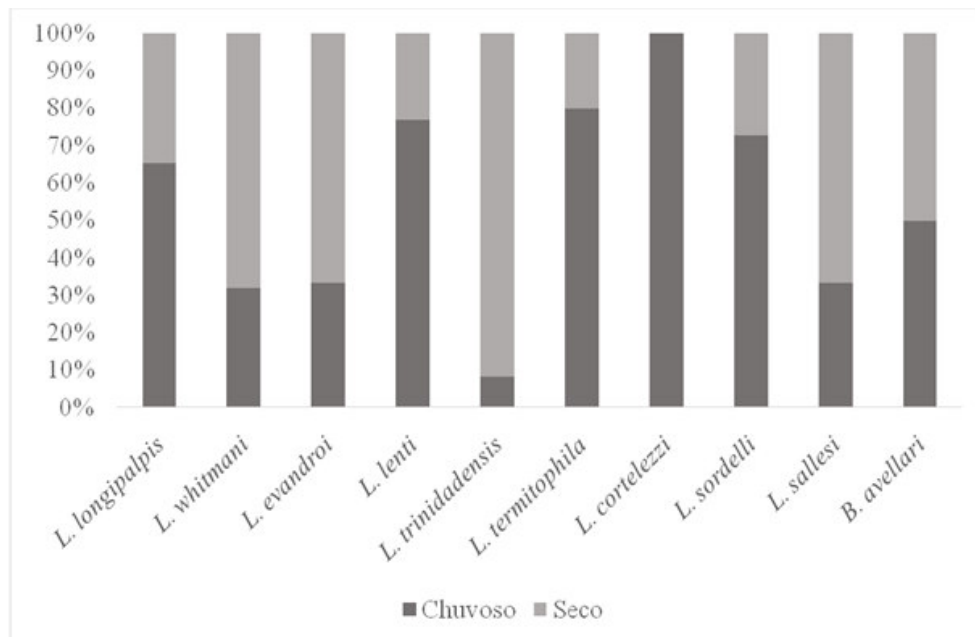
M= Macho; F= Fêmea; %= percentagem; Nº= total de indivíduos por espécies.

Figura 5. Curva de acumulação de espécies de flebotomíneos estudadas na zona urbana e rural do município de Caxias-MA, Brasil, no período de março/2013 a fevereiro/2015



Os flebotomíneos ocorreram em todos os meses do estudo, mas houve variação na quantidade de espécies e de indivíduos capturados mensalmente. Na zona urbana, das doze espécies presentes, duas não foram incluídas na análise, porque só foram representadas por um espécime, classificadas como espécies raras. Nove espécies ocorreram nas duas estações, seca e chuvosa, e uma, *L. cortelezzi*, só ocorreu na chuvosa. Das espécies que ocorreram nas duas estações, quatro predominaram na estação chuvosa: *L. longipalpis*, *L. lenti*, *L. termitophila* e *L. sordelli*. Outras quatro predominaram na estação seca: *L. whitmani*, *L. evandroi*, *L. trinidadensis* e *L. sallesi*. Enquanto *B. avellari* ocorreu com igual frequência em ambas às estações (Figura 6). Duas espécies foram consideradas constantes, *L. longipalpis*, que ocorreu em todos os meses ($C = 100$), e *L. whitmani*, presente em mais de 50% dos meses ($C = 54,1$).

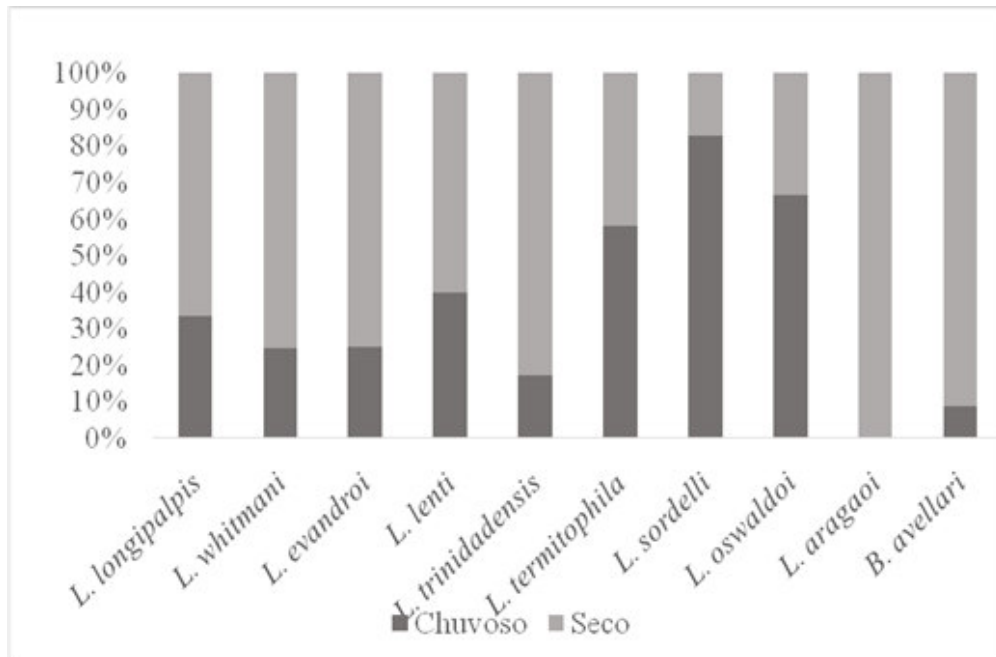
Figura 6. Frequência sazonal das espécies de flebotomíneos capturadas na zona urbana do município de Caxias, Estado do Maranhão, nas estações seca e chuvosa, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015.



Na zona rural nove espécies ocorreram nas duas estações, sendo que apenas três prevaleceram na estação chuvosa: *L. termitophila*, *L. sordelli* e *L. oswaldoi*. As outras seis predominaram na estação seca: *L. longipalpis*, *L. whitmani*, *L. evandroi*, *L. lenti*, *L. trinidadensis* e *B. avellari*. Já a espécie *L. aragaoi* só ocorreu apenas na estação seca (Figura 7). Três espécies foram consideradas constantes: *L. longipalpis* (C = 100), *L. whitmani* (C = 79,1) e *L. evandroi* (C = 58,3).

Considerando as duas áreas juntas, a abundância de indivíduos foi maior na estação chuvosa (57,26%) do que na seca (42,74%). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($X^2=5.5808$, $df=1$, $p\text{-value } 0,01$). No entanto, na zona urbana, a abundância foi maior no período chuvoso, e na zona rural, os flebotomíneos prevaleceram na estação seca (Figuras 6 e 7).

Figura 7. Frequência sazonal das espécies de flebotomíneos capturadas na zona rural, do município de Caxias, Estado do Maranhão, nas estações seca e chuvosa, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015.



DISCUSSÃO

A riqueza da fauna de flebotomíneos encontrada no presente estudo foi considerada intermediária quando comparada a outros estudos que estimaram essa variável em áreas dentro do Bioma Cerrado (MARTIN & REBÊLO, 2006; SILVA et al., 2012; CAMPOS et al., 2013; SILVA et al., 2015). Por exemplo, o número máximo de espécies registradas em um único estudo foi de 30 (CAMPOS et al. 2013), o que pode ser explicado pelo fato do estudo ter sido realizado numa mata úmida dentro do domínio do cerrado. Enquanto em regiões de clima semi-árido a riqueza é geralmente mais baixa, conforme constatado em outros estudos (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2015). Em áreas de florestas úmidas (Amazônicas), onde foram obtidas 49 espécies (REBÊLO et al., 2011).

Quanto à abundância das espécies, observou-se uma grande diferença na proporção de indivíduos, com o domínio de apenas duas espécies – *L. longipalpis* e *L. whitmani*, enquanto a maioria ocorreu em baixíssima densidade. Isso levaria à interpretação de que as proporções com que foram encontradas representam diferentes graus de adaptação das espécies aos ambientes estudados, nos quais respondem à presença de fontes alimentares sanguíneas, criadouros e abrigos (MARTIN & REBÊLO, 2006).

Na zona urbana, os dados mostram claramente que a maior abundância de flebotomíneos foi influenciada pelo grande número de espécimes de *L. longipalpis*, que representou cerca de 90% dos indivíduos capturados. A princípio, pode-se julgar que, no presente estudo, *L. longipalpis* é a espécie mais bem ajustada às condições ambientais locais e, sobretudo, aos ambientes que sofreram profundas modificações antrópicas nos *habitats* naturais, provocando a restrição de espaços ecológicos, como o ambiente urbano. Vários estudos têm mostrado a capacidade biológica de *L. longipalpis* frequentar ambientes antropizados, sobretudo, em área de transmissão de leishmaniose visceral (XIMENES et al., 2007).

Contudo, quando comparada com outras espécies, *L. whitmani* também se destacou na quantidade de espécimes capturados. Esta espécie também se associa bem a áreas antropogênicas, onde exibe comportamento eclético quanto à fonte alimentar, o que permite sua permanência em diferentes ecótopos, favorecendo a sua ocorrência e abundância (REBÊLO et al., 1999a).

L. whitmani tem sido relatado com maior frequência que *L. longipalpis* em área de mata mista (LEONARDO e REBÊLO, 2004), bem como na região do Cerrado, atraídos tanto

com armadilhas com lâmpada incandescente, como com a utilização de lâmpada de LED (SILVA et al., 2016).

Apesar da maior abundância de espécimes na Zona Urbana, no entanto, houve uma maior riqueza de espécies na Zona Rural, resultado que está de acordo com o padrão encontrado em outras áreas do Maranhão, onde já foi registrada a existência de mais de noventa espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (REBÊLO et al., 2010), muitas das quais foram encontradas em áreas rurais, onde as leishmanioses ocorrem de forma endêmica (REBÊLO et al., 1999; BARROS et al., 2000; CARVALHO et al., 2000; MARTIN & REBÊLO, 2006).

Nos últimos anos, porém, tem havido um crescente interesse em pesquisas de comunidades de flebotomíneos em ambientes silvestres (REBÊLO et al., 2000a, 2000b). Muitas espécies foram encontradas em seus ambientes naturais, em áreas de cerrado, cocal, restinga e na floresta estacional perenifólia, assim como, em áreas cuja vegetação é mista, resultantes da superposição dessas diferentes formações vegetais (REBÊLO et al., 2010).

A espécie *L. whitmani* pode ter ocorrido principalmente na zona rural pelo fato da diversidade de espécies estar associada a essas áreas, com ambiente mais preservado, que favorece a permanência de maior variedade de espécies de flebotomíneos, pois nesses ambientes há maior variedade de fonte alimentar, ou seja, maior número de animais silvestres, que servem como fonte de repasto sanguíneo para esses insetos. Vários estudos em outras regiões do maranhão mostram, porém, que esta espécie encontra-se adaptada às condições humanas (REBÊLO et al., 1999a,b; LEONARDO & REBÊLO, 2004; MARTIN & REBÊLO, 2006). Esse vetor apresenta evidências indiretas de que seja a responsável pela transmissão da LTA nesse ambiente, pois já foi capturado naturalmente, infectado com as espécies de *Leishmania* do complexo *braziliensis*, espécie envolvida na transmissão da leishmaniose cutânea no Maranhão, bem como em outras áreas do Brasil (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006; RANGEL & LAINSON, 2003).

Quanto a diversidade de espécies não houve predomínio por estação. Observou-se que cerca de 50% das espécies registradas nesse estudo ocorrem nas duas estações, no entanto, a abundância no geral foi maior no período chuvoso. Na zona urbana, a maior frequência mensal das espécies de flebotomíneos ocorreu na estação chuvosa, sendo os meses de abril de 2013 e janeiro de 2015 os mais representativos. Diferentemente, na zona rural, foi na estação seca que se capturaram mais espécimes, sendo os meses de dezembro de 2013 e julho de 2014 os mais representativos. Esse resultado demonstra que os flebotomíneos do

município de Caxias são capazes de responder às variações dos fatores ambientais, mantendo-se em maior ou menor diversidade e abundância durante o ano inteiro, a depender da área.

Neste estudo, verificou-se que as espécies mais abundantes foram também as mais constantes. *L. longipalpis* ocorreu rigorosamente durante todos os meses de coleta, tanto na zona urbana como na zona rural, e *L. whitmani* manteve-se no segundo posto, quanto a este aspecto. Esse comportamento de *L. longipalpis* e *L. whitmani* se manteve durante os dois anos de estudos, contudo somente *L. longipalpis* foi abundante durante o período de coleta. Para essas espécies, já havia sido registrado a constância ao longo dos anos também no peridomicílio na região do Cerrado (Silva et al., 2010), não havendo mudança de comportamento para essa região. Do ponto de vista epidemiológico, esse comportamento é muito importante, uma vez que estas espécies são incriminadas como principais vetoras das leishmanioses a nível local.

Sabe-se que *L. longipalpis* é o vetor competente da *L. infantum chagasi*, o agente etiológico da leishmaniose visceral na região do presente estudo (SOARES et al., 2010). A frequência constante desse vetor, ao longo do ano também tem sido relatada em várias regiões do Brasil. É o que ocorre na região Nordeste, tanto em áreas tropicais quente e úmidas (REBÊLO et al., 2001) como semi-áridas (MACEDO et al., 2008). Apesar de ter ocorrido em todos os meses do ano, *L. longipalpis* alternou o período de maior abundância entre as áreas estudadas, sendo mais abundante na estação chuvosa em uma área, e na estação seca, em outra. Considerando a proximidade das áreas rural e urbana, os motivos para essa variação podem estar relacionados à disponibilidade de criadouros e de fontes alimentares que devem variar localmente. Em Belo Horizonte, no Sudeste do Brasil, onde o clima é subtropical, a abundância dessa espécie alcança as maiores proporções no período chuvoso, quando as temperaturas médias são também mais elevadas (RESENDE et al., 2006), pois lá, no período frio, há um decréscimo na abundância. Ao contrário da área do presente estudo, que é quente o ano inteiro, só as chuvas oscilam sazonalmente.

Em relação à *L. whitmani*, sabe-se que é um competente vetor de *Le. braziliensis* em ambientes silvestres do Nordeste do Brasil (SILVA & VASCONCELOS, 2005; OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006). Essa espécie, apesar de distribuir-se em vários meses, apresentou uma clara tendência para elevar a sua abundância em épocas chuvosas, permanecendo com o seu comportamento típico de espécies selvagem, como demonstrado por Pinheiro et al. (2013).

Em relação à curva de acumulação de espécies, o esforço de coleta foi suficiente para mostrar que todas as espécies que ocorreram nas duas áreas tenham sido encontradas, corroborando com o trabalho realizado por Almeida et al. (2010).

Em síntese, na área estudada, foram registradas 17 espécies, das quais *L. longipalpis*, *L. whitmani*, *L. flaviscutellata* e *L. migonei* são importantes do ponto de vista epidemiológico. Foi constatada a presença constante e em abundância de *L. longipalpis* e, secundariamente, de *L. whitmani*, fato que se reveste de extrema importância por estarem incriminadas como vetores de LVA e LTA. Os flebotomíneos ocorreram o ano inteiro, ora predominando na estação chuvosa, ora na estação seca, a depender da área.

A área rural apresentou maior riqueza de espécies do que a área urbana. Além disso, foi observada a presença de três espécies capturadas exclusivamente na área urbana: *L. goiana*, *L. migonei* e *L. sallesi* e cinco espécies ocorreu essencialmente na área rural: *L. saulensis*, *L. oswaldoi*, *L. flaviscutellata*, *L. aragaoi* e *L. hermalenti*.

Os dados obtidos nesse estudo servem como referência para os Programas de Controle e prevenção dessas patologias na área estudada.

Concluindo, verificamos que as espécies de flebotomíneos encontrada no presente estudo representou satisfatoriamente a fauna que tem sido encontrada nos ambientes de cerrado. Destaca-se pela primeira vez, a ocorrência de *L. oswaldoi*, *L. migonei* e *L. aragaoi* em áreas antropizadas dentro do domínio de cerrado. Contudo, essas espécies nos dois anos de estudos não mostraram um padrão de ciclicidade, o que revela a necessidade de estudos de monitoramento, principalmente para *L. migonei*, por ser incriminada como vetora de LTA no Maranhão (REBÊLO et al. 2009). As espécies mais abundantes foram *L. longipalpis* e *L. whitmani*, a primeira predominou na estação chuvosa, e a segunda, na estação seca. Essa segregação pode ser importante na determinação do perfil epidemiológico da LVA e LTA, respectivamente. Essas informações devem ser consideradas tanto para o conhecimento da ecologia dos flebotomíneos, como para auxiliar os órgãos de saúde na prevenção e controle vetorial dessas endemias.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria Municipal de Saúde de Caxias, ao Centro de Controle de Zoonoses, aos Técnicos do Laboratório de Entomologia CCZ e à Vigilância Epidemiológica do Município de Caxias, pelo apoio. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade concedida ao JMMR.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In RANGEL, E. F. & LAINSON, R. (eds), **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro p. 207- 255. 2003.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J. & BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE** 7: e 35671, 2012.
- ALMEIDA, P. S.; MINZÃO, E. R.; MINZÃO, L. D.; SILVA, S. R.; FERREIRA, A. D.; FACCENDA, O.; ANDRADE-FILHO, J. D. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba; 43(6), 2010.
- BARROS, V. L.; REBÊLO, J. M. M.; SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do município do Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. **Cadernos de Saúde Pública**, 16(1): 265-270, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Saúde: Press 180 pp. 2014. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/opition=comcontent&id=11018&Itemid=667>. Acesso em 12 de jan. de 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde, SVS/MS. **Situação epidemiológica dados**. [on line]. Brasília; 2015. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/opition=comcontent&id=11018&Itemid=667>. Acesso em 16 de jan. de 2015.
- CAMPOS, A. M.; MATAVELLI, R.; SANTOS DOS, C. L. C.; MORAES, L. S.; REBÊLO, J. M. M. Ecology of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a Transitional Area between the Amazon and the Cerrado in the State of Maranhão, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 50 (1): 52-58, 2013.
- CARVALHO, M. L.; REBÊLO, J. M. M.; BARROS, V. L. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. **Entomología y Vectores**, 7(1): 19-32, 2000.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, 27: 305-318, 2004.
- GEPLAN. Gerência de planejamento e desenvolvimento econômico (Atlas do Maranhão). 2ed. São Luís: GEPLAN. Governo do Estado do Maranhão, 2002.
- GUIMARÃES-E-SILVA, A. S.; LEONARDO, F. S.; COSTA, E. R. S.; ALCÂNTARA, S. H. PINHEIRO, V. C. S.; REBÊLO, J. M. M. The Occurrence of Flebotomines (Diptera, Psychodidae) in a Leishmaniasis-Endemic Area. **Revista Paraense de Medicina**, v.26(2) abril-junho 23-28, 2012.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [uptaded 2015 Dez 03: cited 2013 Dez 10] Disponível

em:<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=210170&search=marahaolbarrairinhas>. Acesso em 03 de dezembro de 2015.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden W. H. R.; Evans, D. A. (Editors). London and New York: **Academic Press**, 2: 1-116, 1979.

LEONARDO, F. S.; REBÊLO, J. M. M. *Lutzomyia whitmani* periurbanization in a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 37, no. 3, pp. 282-284, 2004.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, N. B. DE.; SOUSA, L. C. DE.; LINHARES, F. E.; AMÓRA, S. S. A.; OLIVEIRA, L. M. B. DE. Sazonalidade de Flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no Município de Sobral, Ceará Brasil. **Ciência Animal**, 18: 67-74, 2008.

MARTIN, A. M. C. B.; REBÊLO, J. M. M. Dinâmica espaço-temporal de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do municíp de Santa Quitéria, área de cerrado do Estado do Maranhão, Brasil. **Iheringia Ser Zool**, 96 (3): 283-288, 2006.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; SILVA, M. H.; VIANA, G. M. C.; LEONARDO, F. S.; BEZERRA, G. F. B.; SILVA, A. S. G.; SOARES, V. C. P.; PEREIRA, S. R. F.; REBÊLO, J. M. M.; BRAZIL, R. P. Spacial dynamics of urban populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Caxias, State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46: 555-559, 2013.

OLIVEIRA-PEREIRA Y. N. O.; REBÊLO J. M. M.; MORAES J. L. P.; PEREIRA S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* spp. na Amazônia Maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39: 540-3, 2006.

PINHEIRO, M. P. G.; SILVA, J. H. T.; SILVA, V. E. P.; ANDRADE, M. J. M.; XIMENES, M. F. F. M. *Lutzomyia wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em Fragmento de Mata Atlântica do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **EntomoBrasilis**, 6: 232-238, 2013.

PROGRAMA ESTATÍSTICO R, versão 3.1.3. [on line]. 2015 [cited 2015 dez 15]. Available from: <http://www.r-project.org>.

RANGEL, E. F. R.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL E. F.; LAINSON R. (org). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003, p. 311-36.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, This article's doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153557. 58: 227-50, 2013.

REBÊLO, J. M. M.; ARAUJO, J. A. C.; CARVALHO, M. L.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, S. T. Flebotomos (*Lutzomyia*, Phlebotominae) da ilha de São Luís, zona do golfão maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, 32: 247-253, 1999a.

REBÊLO, J. M. M.; LEONARDO, F. S.; COSTA, J. M. L.; PEREIRA, Y. N. O.; SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 15: 623-630, 1999b.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S. Flebotomíneos da Amazônia maranhense. IV. Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. **Entomology Vectors**, 7: 61-72, 2000a.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L.L.; SILVA, F. S.; COSTA, J. M. L.; FERREIRA, L. A.; SILVA, A. R. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, 33: 11-19, 2000b.

REBÊLO, J. M. M.; ROCHA, R. V.; MORAES, J. L. P.; ALVES, G. A.; LEONARDO, F. S. Distribuição de *Lutzomyia whitmani* em fitoregiões do estado do Maranhão, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 43(6): 1070-1074. 2009.

REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L.P.; ALVES, G. A.; LEONARDO, F. S.; ROCHA, R. V. DA.; MENDES, W. A.; COSTA, E.; CÂMARA, L. E. M. B.; PEREIRA, Y. N.O. Dípteros vetores de leishmaniose e malária na Amazônia maranhense. In: **Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação**. MARTINS, M. B.; OLIVEIRA, T. G. de. Belém: MPEG, 2011.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de matas de terra firme e de várzea, do município de Paragominas, estado do Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, 31: 145-154, 2001.

REBÊLO, J. M. M.; ROCHA, R. V.; MORAES, J. L. P.; SILVA, C. R. M.; LEONARDO, F. S.; ALVES, G. A. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 54: 494-500, 2010b.

REBÊLO, J. M. M.; ROCHA, R. V.; MORAES, J. L. P.; SILVA, C. R. M.; LEONARDO, F. S.; ALVES, G. A. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, p. 494-500, 2010.

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**, 39: 51-55, 2006.

SILVA, D. F.; VASCONCELOS, S. D. Flebotomíneos em fragmentos de Mata Atlântica na Região Metropolitana do Recife, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38: 264-266, 2005.

SILVA, F. S.; CARVALHO, F. P.; CARDOZO, J. L. P.; MORAES, L. P. C.; REBÊLO, J. M. M. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cerrado area of the Maranhão state, Brazil. **Neotropical Entomology**, 39: 1032-1038, 2010.

SILVA, F. S.; CARVALHO, L. P. C.; SOUZA, J. M. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) associados a abrigos de animais domésticos em área rural do Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, 41(3): 337-347, 2012.

SILVA, L. B. DA.; AQUINO, D. M. C. DE.; LEONARDO, F. S.; GUIMARÃES-E-SILVA, A. S.; MELO, M. N.; REBÊLO, J. M. M.; PINHEIRO, V. C. S. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em focos urbanos de Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 44 (2): 181-193, 2015.

SILVA, F. S.; BRITO, J. M.; COSTA-NETA, B. M.; LOBO, S. E. P. D. Evaluation of light-emitting diodes as attractant for sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in northeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 110(6): 801-803, 2015.

SILVA, F. S.; da SILVA, A. A.; REBELO, J. M. M. An evaluation of light-emitting diode (LED) traps at capturing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a livestock area in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 2016.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Secretaria Municipal de Saúde de Caxias, Maranhão, 2014.

SILVEIRA-NETO, S.; NAKANO, O.; BARDIN, D.; VILLANOVA, N. A. **Manual de Ecologia dos Insetos. Agrônômica Ceres**, Piracicaba, Brasil, 419 pp, 1976.

SOARES, M. R. A.; CARVALHO, C.C.; SILVA, L.A.; LIMA, M.S.C.S.; BARRAL, A. M. P.; REBÊLO, J. M. M.; PEREIRA, S. R. F. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 26: 2409-2413, 2010.

VILELA, M. L.; RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Métodos de coleta e preservação de flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Ed.) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. cap. 8, 2003, p. 353-367.

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

WHO - World Health Organization – Leishmaniasis. [cited 2014 Jul 14] Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em 03 de julho de 2014.

YOUNG, D. C.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memories of the American Entomological Institute**, 54: 881pp, 1994.

ARTIGO 2 - REVISTA PLOs ONE**Identificação e caracterização molecular de coinfeção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos de Área Endêmica de Leishmaniose Visceral e Cutânea no Brasil**

A.S. GUIMARÃES-E-SILVA,¹ S. DE O. SILVA,² J.M.M. REBÊLO³ e M.N. MELO,²

¹Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação da Rede Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA/Brasil (E-mail: antoniasuely-silva@bol.com.br).

²Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação do Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901. Belo Horizonte, MG/Brasil (E-mail: silvaso@icb.ufmg.br).

³Departamento de Biologia, Laboratório de Entomologia e Vetores, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses S/N, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brasil, São Luís, MA/Brasil (E-mail: macariorebelo@uol.com.br).

⁴Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG/Brasil (E-mails: melo@icb.ufmg.br, normamelo@gmail.com).

Endereço para correspondência: Maria Norma Melo, Laboratório de Biologia de *Leishmania*-Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (E-mails: melo@icb.ufmg.br; normamello@gmail.com)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar as espécies de *Leishmania* presentes em populações de flebotomíneos, em ambientes com notificações de casos de leishmanioses. Foram realizadas capturas mensais de flebotomíneos, de março de 2013 a fevereiro de 2015, de forma alternada, em 20 residências localizadas em área urbana e rural do município de Caxias, Maranhão - Brasil. Do total de 3.520 espécimes capturados, 982 exemplares de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas e não ingurgitadas foram utilizadas para a identificação das espécies de *Leishmania*. O DNA foi extraído, e foram realizadas reações de PCR, tendo como alvo a região ITS-1, utilizando os primers LITSR e L5.8S, sendo o produto digerido com a enzima de restrição *HaeIII*. Foram detectadas sete espécies de *Leishmania* infectando os flebotomíneos: *Le. infantum* (9,0%) em *Lutzomyia longipalpis*, *Lu. termitophila* (20,0%) e *Lu. whitmani* (9,0%); *Le. infantum/Le. braziliensis* em *Lu. longipalpis* (1,3%), *Lu. whitmani* (4,0%) e *Lu. trinidadensis* (17,0%); *Le. shawi* em *Lu. longipalpis* (1,1%); *Le. mexicana* em *Lu. longipalpis* (0,7%); *Le. braziliensis* em *Lu. longipalpis* (0,6%), *Lu. whitmani* (4,0%); *Le. guyanensis* em *Lu. longipalpis* (0,6%) e *Lu. termitophila* (20,0%); *Le. amazonensis* (0,1%) em *Lu. longipalpis* e *Le. lansonii/Le. naiffi* (0,1%) em *Lu. longipalpis* (a técnica utilizada não separa essas duas espécies). *Lu. longipalpis* (0,3%) e *Lu. trinidadensis* (17,0%) estavam infectados com *Leishmania* sp. O estudo mostra a circulação concomitante de espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose visceral (LVA) e tegumentar (LTA), na área de estudo. Isto explica a ocorrência de casos humanos de ambas as formas clínicas de leishmanioses autóctones em Caxias, MA.

Palavras-chave: Infecção natural, PCR, PCR-RFLP, Flebotomíneos, Leishmanioses.

ABSTRACT

This study aimed to identify and characterize the *Leishmania* species present in populations of sandflies in environments with notifications of cases of leishmaniasis. Catches of sandflies were performed every month from March 2013 to February 2015, alternately, in 20 houses located in urban and rural area of the municipality of Caxias, Maranhão - Brazil. From the total 3.520 of captured specimens, 982 samples of engorged and not engorged females of sandflies were used for the identification of *Leishmania* species. The DNA was extracted, and PCR reactions were performed, targeting the ITS-1 region, using the primers LITSR and L5.8S and the product is digested with the restriction enzyme HaeIII. Seven species of *Leishmania* were found infecting the sandflies: *Le. infantum* (9.0%) in *Lutzomia longipalpis*, *Lu. termitophila* (20.0%) and *Lu. whitmani* (9.0%); *Le. infantum/Le. braziliensis* in *Lu. longipalpis* (1.3%), *Lu. whitmani* (4.0%) and *Lu. Trinidadensis* (17.0%); *Le. shawi* in *Lu. longipalpis* (1.1%); *Le. Mexicanin Lu. longipalpis* (0.7%); *Le. braziliensis* in *Lu. longipalpis* (0.6%), *Lu. whitmani* (4.0%); *Le. guyanensis* in *Lu. longipalpis* (0.6%) and *Lu. termitophila* (20.0%); *Le. amazonensis* (0.1%) in *Lu. longipalpis* and *Le. lansonil/Le. naiffi* (0.1%) *Lu. longipalpis* (the technique used does not separate these two species). *Lu. longipalpis* (0.3%) and *Lu. trinidadensis* (17.0%) were infected with *Leishmania*. The study shows the concurrent circulation of *Leishmania* species that causes visceral (AVL) and cutaneous (ACL) leishmaniasis in the study area. This explains the occurrence of human cases of both clinical forms of autochthonous leishmaniasis in Caxias, MA.

Key words: Natural infection, PCR, PCR-RFLP, Sandflies, Leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), endêmica em muitos países do mundo, onde são consideradas um problema de Saúde Pública (ALVAR et al., 2012). A epidemiologia das leishmanioses depende das características das espécies do parasito, das características ecológicas das áreas onde são transmitidas e da presença de reservatórios silvestres e domésticos e de flebotomíneos vetores (Subfamília Phlebotominae – Diptera: Psychodidae) (READY, 2013).

Nas Américas, as leishmanioses ocorrem sob duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral americana (LVA), ou calazar, que tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) infantum*; e a leishmaniose tegumentar americana (LTA), nas formas cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, causada por, pelo menos, sete espécies de *Leishmania* (SILVEIRA et al., 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LAINSON; SHAW, 2005).

No Brasil, *L. infantum* tem como principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, um flebotomíneo antropofílico, amplamente distribuído no território brasileiro. A LVA tem como reservatórios domésticos cães e outros canídeos silvestres (DEANE, 1956; LAINSON; SHAW 2005) e *Lu. cruzi* (MANGABEIRA, 1938) em alguns municípios da região Centro-Oeste (SANTOS et al., 1998; MISSAWA et al., 2011).

Atualmente, são conhecidas no Brasil sete espécies de *Leishmania* que podem ocasionar LTA, das quais seis são do subgênero *Viannia* – *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. lainsoni*, *Le. naiffi*, *Le. shawi* e *Le. lindembergi*, e uma do subgênero *Leishmania* – *L. amazonensis* (SILVEIRA et al., 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LAINSON; SHAW, 2005; CRUZ, 2010). As principais espécies de flebotomíneos associadas à transmissão das leishmanioses tegumentares no homem são: *Lu. intermedia*; *Lu. neivai*; *Lu. whitmani*; *Lu. umbratilis*; *Lu. flaviscutellata*; *Lu. antunesi*; *Lu. migonei*; *Lu. fischeri*; *Lu. pessoai*; *Lu. wellcomei*; *Lu. complexa*; *Lu. ayrozai*; *Lu. paraensis*; *Lu. amazonensis*; *Lu. hirsuta hirsuta*; *Lu. ubiquitalis*; *Lu. gomezi*; *Lu. tuberculata* (RANGEL; LAINSON, 2009). No Brasil, a distribuição dessas espécies de *Leishmania* ainda não é bem conhecida. Para algumas delas, a maioria dos registros restringe-se à região amazônica, em especial ao Estado do Pará (LAINSON; SHAW, 2005).

No estado do Maranhão foram realizadas pesquisas sobre a infecção natural de flebotomíneos, com a identificação de apenas *Leishmania* spp. em *Lu. whitmani* (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006) e de *L. infantum* em *Lu. longipalpis* (SOARES et al., 2010). 91 espécies

de flebotomíneos estão distribuídas nos diversos ecossistemas do Estado (REBÊLO et al., 2010), sendo importante a identificação das espécies de *Leishmania* que ocorrem nesses flebotomíneos e que causam as leishmanioses no homem, para implementação de medidas de controle.

Técnicas moleculares são altamente sensíveis na detecção de *Leishmania* spp. infectando flebotomíneos. Essa sensibilidade aumenta a compreensão da competência de vetores e da epidemiologia de leishmanioses (ARANSAY et al., 2000). Ao nível de complexo, a identificação de *Leishmania* spp. em flebotomíneos tem empregado várias técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (PCR-RFLP), usando diferentes endonucleases de restrição e sondas de hibridização (DE PITA-PEREIRA et al., 2005; CARVALHO et al., 2008; MARGONARI et al., 2010; EL-BESHBISHY et al., 2013). Vários alvos de DNA, tais como gene de rRNA ribossomal, gene derivado do mini exon de RNA, sequências repetidas do genoma, KDNA do minicírculo (ARANSAY et al., 2000; PAIVA et al., 2006) e DNA de espaçadores de transcritos internos (ITS1 e ITS2) são usados na detecção e identificação por PCR de *Leishmania* spp.

Ambas as leishmanioses, tegumentar e visceral, são prevalentes no município de Caxias. Infecção natural de 0,76% de *Le. chagasi* foi encontrada em *Lu. longipalpis* por Nascimento et al. (2013). Os autores concluíram que, mesmo com baixa taxa de infecção, a espécie *Lu. longipalpis* é capaz de manter a endemicidade da LVA, o que explica a notificação de 44 casos humanos da doença somente no ano de 2013. Nesse mesmo período, foram detectados 12 casos de LTA, mas a espécie de *Leishmania* não foi identificada (SINAN, 2014).

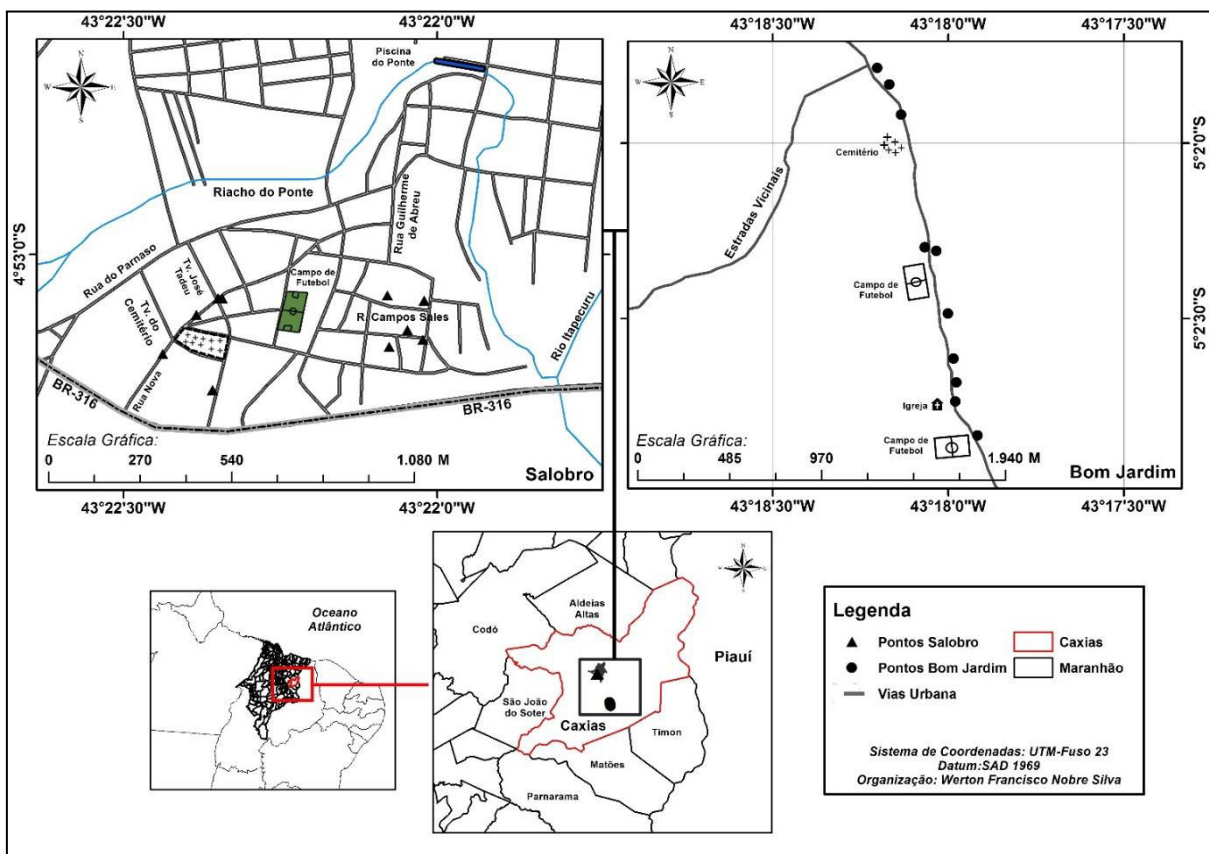
No presente estudo, foram realizadas a identificação e o cálculo da taxa de detecção das espécies de *Leishmania* infectando flebotomíneos, em área urbana e rural do município de Caxias, área endêmica de LVA e LTA, no Estado do Maranhão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de flebotomíneos

A pesquisa foi realizada no município de Caxias (04°51'22 "S e 43°21'22" W), situado na mesorregião do Leste do estado do Maranhão, na região Nordeste do Brasil (Figura 1). Com altitude média de 66m, possui uma área de 5.150.667 km² e uma população de mais de 159.396 mil pessoas (IBGE, 2015). O clima característico da área é o semi-árido, com uma estação chuvosa, que ocorre nos primeiros seis meses do ano (Janeiro / Junho) e uma estação seca (Julho / Dezembro). Esta área apresenta vegetação mista de floresta perenifólia aberta com cerrado. A média da temperatura é de 26,1°C, na estação chuvosa, e de 35,6°C, no período seco (GEPLAN, 2002).

Figura 1. Mapa mostrando a localização do município de Caxias, no estado do Maranhão, Brasil, e os locais de coleta de flebotomíneos de 2013-2015.



Fonte: IBGE, 2006; Organização: Silva, W.F.N., 2016.

Coleta e identificação dos flebotomíneos

O estudo entomológico foi realizado de março de 2013 a fevereiro de 2015, na lua nova, de 18:00 horas da tarde às 6:00 horas da manhã. Os flebotomíneos foram capturados nos abrigos de animais domésticos de 20 casas distribuídas no bairro urbano Salobro (10) e na localidade rural Bom Jardim (1), com o auxílio de armadilhas luminosas do tipo CDC (Center Disease Control) dispostas a 1,5 m de altura acima do solo.

Os insetos foram sacrificados por resfriamento. Após os processos de triagem, os exemplares fêmeas ingurgitados e não ingurgitados foram identificados, submetidos à dissecação para a identificação (montagem em lâmina com líquido de Berlese), e o tórax e abdômen foram acondicionados a seco em freezer a -20°C para a extração do DNA. Este foi extraído utilizando o Kit de extração de tecidos e células Genra Puregene (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e usado nas reações de PCR e PCR-RFLP para a identificação de *Leishmania* spp. Todos os flebotomíneos foram identificados de acordo com o Sistema de classificação de Young e Duncan (1994).

No total, 960 fêmeas de flebotomíneos foram utilizadas para o estudo de infecção natural por *Leishmania* spp. Dependendo do número de espécimes coletados, fêmeas da mesma espécie que eram da mesma armadilha e da mesma data da coleta foram processadas individualmente ou em *pool* que continham até 10 exemplares. As fêmeas foram agrupadas em 616 amostras, e 551 fêmeas de flebotomíneos que tinham sangue no trato digestivo foram processadas individualmente. De 409 exemplares de fêmeas não ingurgitadas, 9 foram analisadas individualmente, e as demais foram agrupadas em 57 *pools*.

Detecção de DNA de flebotomíneos por PCR

Iniciadores que amplificam a região de IVS6 do gene cacofonia de flebotomíneos, constitutivo do gênero *Lutzomyia* (5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3' e 5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3') (LINS et al., 2002) foram utilizados para avaliar a extração do DNA, para excluir a possibilidade de inibição da PCR e para servir como um controle para o processo de extração. O protocolo foi baseado em Saraiva et al. (2010). Foram utilizados controles positivo (DNA obtido a partir de *Lu. longipalpis* criado em laboratório) e negativo (ausência de DNA), em todas as reações de PCR.

PCR e PCR-RFLP para a identificação das espécies de *Leishmania*

Para a detecção de *Leishmania* spp. nas amostras de DNA dos flebotomíneos, foram realizadas reações de PCR da região intergênica de *Leishmania* ITS1 (Internal Transcribed Spacer ITS1), que amplifica um fragmento de aproximadamente 300 a 350 pares de bases. Foram utilizados os iniciadores: [LITSR-5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' e L5.8S5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'] segundo Schonian et al. (2003). Três microlitros do produto da PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante (SAMBROOK et al., 1989), corado por nitrato de prata (SANTOS et al., 1993). Em todas as reações, foram utilizados controles positivos de cepas de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS): *Le. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Le. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M1176), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Le. lainsoni* (MHOM/ BR/81/M6426), *Le. naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), *Le. shawi* (MCEB/BR/1984/M84408) e *Le. infantum* (MHOM/1973/BH46).

As amostras amplificadas pelo ITS1 foram submetidas à digestão com a enzima de restrição *HaeIII*. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 10 μ L, contendo 0,2 μ L de *HaeIII* (10U/ μ L), 1,8 μ L de tampão da enzima, 3,0 μ L de H₂O destilada e 5,0 μ L de produto de PCR. A mistura foi incubada por 1h a 37°C, e os perfis de restrição foram analisados em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante, corado pelo nitrato de prata e comparados com os padrões obtidos pela digestão dos produtos da ITS1-PCR das cepas de referência para confirmação das espécies.

Inferência da taxa de infecção natural

Considerando-se os agrupamentos de espécimes e dada à impossibilidade de se saber a real taxa de infecção natural para cada fêmea, a taxa mínima de infecção natural (TMI) foi estimada atribuindo-se o critério de que pelo menos um dos exemplares estava infectado, quando o *pool* ao qual pertence for positivo para *Leishmania* spp. como descrito por Paiva et al. (2006), o que corresponde ao número de grupos positivos x 100/número total de insetos. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), no ano de 2014, sob parecer nº 909.095 e número de autorização para coleta dos flebotomíneos do ICMBio: nº 46319-1 para coleta de insetos.

RESULTADOS

Todas as amostras amplificaram um fragmento de 200pb correspondente ao gene da cacofonia. A presença desse fragmento confirma a qualidade do DNA obtido das fêmeas de flebotomíneos.

De 982 fêmeas de flebotomíneos dissecadas, 769 eram da área urbana pertencentes às espécies: *Lu. longipalpis* (763), *Lu. evandroi* (3), *Lu. sordellii* (1), *Lu. lenti* (1) e *Lu. whitmani* (1); e 213 provenientes da área rural e das espécies: *Lu. longipalpis* (175), *Lu. whitmani* (23), *Lu. termitophila* (5), *Lu. trinidadensis* (6), *Lu. sordellii* (1) e *Lu. lenti* (3) (Tabelas 1 e 2).

Dentre as fêmeas examinadas, 51 foram positivas para o gênero *Leishmania* e identificadas ao nível de espécie pelo PCR-RFLP (Tabelas 1 e 2, Figuras 3 e 4). A taxa de infecção geral foi de 5,2%. Na zona urbana, 24 fêmeas estavam infectadas, com uma taxa geral de 3% de positividade e na zona rural 27 fêmeas estavam infectadas, com uma taxa geral de 12,7% de positividade. As amostras positivas amplificaram uma banda de 300-350bp (Tabela 1; Figura 2). As amostras que tiveram o produto de PCR digerido com a enzima de restrição *HaeIII* apresentaram o padrão de restrição característico de *Le. infantum* (28), *Le. braziliensis* (3), *Le. infantum/Le. braziliensis* (8), *Le. shawi* (3), *Le. mexicana* (2), *Le. amazonenses* (1), *Le. guyanensis* (2), *Le. lainsoni/naiffi* (1) e *Leishmania* sp. (3) (Tabelas 1 e 2, Figuras 3 e 4).

Na zona urbana, apenas *Lu. longipalpis* estava infectada, com uma taxa de infecção geral de 3,0% para: *Le. infantum* (2,0%), infecção mista por *Le. infantum/Le. braziliensis* (0,7%), *Le. shawi* (0,1%), *Le. mexicana* (0,1%), *Le. amazonensis* (0,1%) *Le. lainsoni/naiffi* (0,1%) e *Leishmania* spp. (0,3%).

Na zona rural, quatro espécies de flebotomíneos estavam infectadas. *Lu. longipalpis* apresentou uma taxa de infecção geral de 11,0% para: *Le. infantum* (7,0%), *Le. braziliensis* (0,6%), infecção mista por *Le. infantum/Le. braziliensis* (0,6%), *Le. shawi* (1,0%), *Le. mexicana* (0,6%), *Le. guyanensis* (0,6%). O flebotomíneo *Lu. whitmani* apresentou uma taxa de infecção geral de 17,0% para: *Le. infantum* (9,0%), *Le. braziliensis* (4,0%) e infecção mista por *Le. infantum/L. braziliensis* (4,0%). A espécie *Lu. termitophila* apresentou uma taxa geral de infecção de 40,0% para: *Le. infantum* (20,0%) e *Le. guyanensis* (20,0%). *Lu. trinidadensis* apresentou uma taxa geral de 34,0% para: infecção mista por *Le. infantum/Le. braziliensis* (17,0%) e *Leishmania* spp. (17,0%), conforme tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Fêmeas de flebotomíneos positivas pelo teste do PCR-RFLP para *Leishmania* spp, no município de Caxias, estado do Maranhão, Brasil de 2013 a 2015.

Ambientes/Espécies	Fêmeas examinadas	Fêmeas positivas	<i>Le. infantum</i>	<i>Le. braziliensis</i>	<i>Le. infantum /braziliensis</i>	<i>Le. shawi</i>	<i>Le. mexicana</i>	<i>Le. guyanensis</i>	<i>Le. amazonensis</i>	<i>Le. lansoninaffi</i>	<i>Leishmania</i> sp.
	N	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Urbana											
<i>Lu. longipalpis</i>	763	24 (3,0)	13 (2,0)	0	5 (0,7)	1 (0,1)	1 (0,1)	0	1 (0,1)	1 (0,1)	2 (0,3)
<i>Lu. evandroi</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lu. sordelli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lu. lenti</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lu. whitmani</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma	769	24 (3,0)	13 (2,0)	0	5 (0,7)	1 (0,1)	1 (0,1)	0	1 (0,1)	1 (0,1)	2 (0,3)
Rural											
<i>Lu. longipalpis</i>	175	19 (11,0)	12 (7,0)	1 (0,6)	1 (0,6)	2 (1,0)	1 (0,6)	1 (0,6)	0	0	0
<i>Lu. whitmani</i>	23	4 (17,0)	2 (9,0)	1 (4,0)	1 (4,0)	0	0	0	0	0	0
<i>Lu. termitophila</i>	5	2 (40,0)	1 (20,0)	0	0	0	0	1 (20,0)	0	0	0
<i>Lu. trinidadensis</i>	6	2 (34,0)	0	0	1 (17,0)	0	0	0	0	0	1 (17,0)
<i>Lu. sordelli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lu. lenti</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma	213	27 (12,7)	15 (7,0)	2 (0,9)	3(1,4)	2 (1,1)	1 (0,5)	2 (0,9)	1 (0,1)	0	3 (1,4)
Total	982	51 (5,2)	28	3	8	3	2	2	1	1	3

Tabela 2. Identificação das fêmeas de flebotomíneos positivas pelo teste do PCR-RFLP para *Leishmania* spp. no município de Caxias, estado do Maranhão, Brasil de 2013 a 2015.

Ambientes/Espécies	Espécies/Número do flebotomíneo								
	<i>Le. infantum</i>	<i>Le. braziliensis</i>	<i>Le. infantum/ braziliensis</i>	<i>Le. shawi</i>	<i>Le. mexicana</i>	<i>Le. guyannensis</i>	<i>Le. amazonensis</i>	<i>Le. lansonii/naiffi</i>	<i>Leishmania</i> sp.
Urbana									
<i>Lu. longipalpis</i>	16, 41, 76, 81, 87, 88, 90, 108, 113, 157, 158, 207, 209	18	37, 40, 75, 107	85	09		03	86	20, 42
<i>Lu. evandroi</i>			17						
Rural									
<i>Lu. longipalpis</i>	24, 29, 30, 57, 63, 68, 70, 74, 82, 84, 95, 101	23	56, 96	26, 67	73	64			
<i>Lu. whitmani</i>	100, 127	152							
<i>Lu. termitophila</i>	27					36			
<i>Lu. trinidadensis</i>			97						55

Figura 2 – Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata mostrando os produtos amplificados pela PCR para o fragmento do gene ITS1 de *Leishmania*. M: PROMEGA marcador de peso molecular padrão de 100 pb; Linhas: 1- controle positivo (DNA de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*; 2-15: amostras extraídas das fêmeas de flebotomíneos; 16- controle negativo sem DNA.

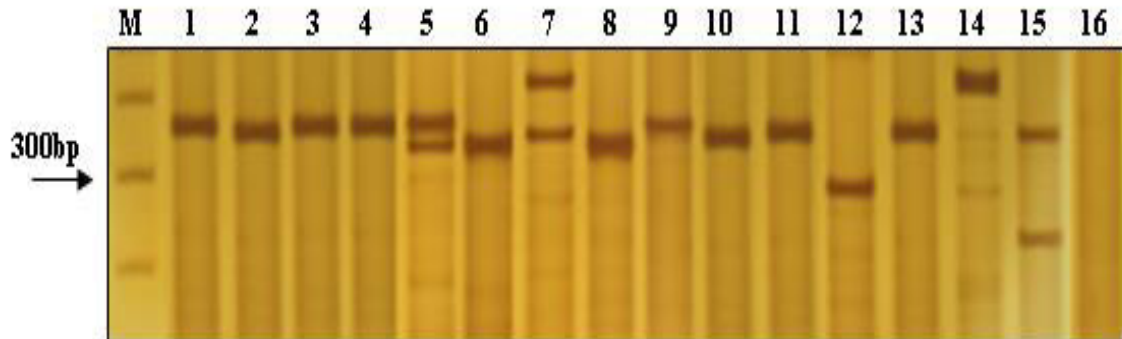


Figura 3- Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *HaeIII*. M: PROMEGA marcador de peso molecular padrão de 25bp; Linhas I-IX controles positivos: I - *L. amazonensis*; II - *L. mexicana*; III - *L. guyanensis*; IV - *L. braziliensis*; V - *L. lansoni*; VI - *L. naiffi*; VII - *L. shawi*; VIII - *L. infantum*; IX - *L. infantum* / *L. braziliensis*; Linhas 03-55 amostras de *Leishmania* spp. positivas (03 - *L. amazonensis*; 09 - *L. mexicana*; 36 - *L. guyanensis*; 18, 23 - *L. braziliensis*; 26 - *L. shawi*; 16, 24, 27, 29, 30, 41 - *L. infantum*; 17, 37, 40 - *L. infantum* / *L. braziliensis*).

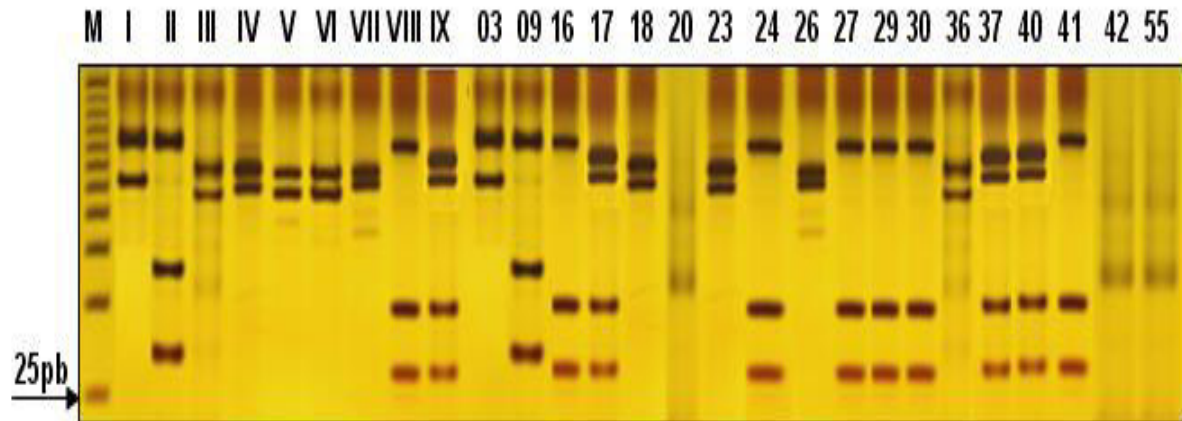
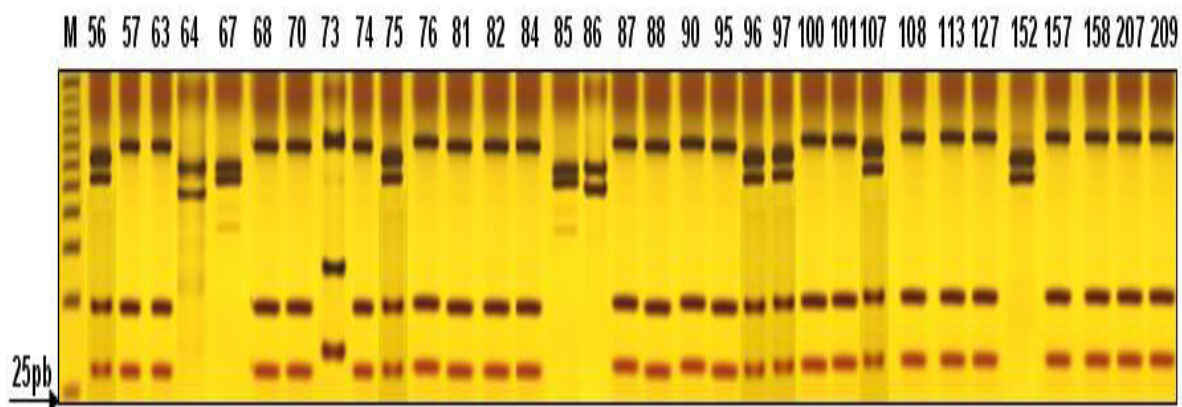


Figura 4 - Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *HaeIII*. M: PROMEGA marcador de peso molecular padrão de 25bp; Linhas 56-209 fêmeas de flebotomíneos *Leishmania* spp. (64 - *L. guyanensis*; 152 - *L. braziliensis*; 86 - *L. Lansonii / naiffi*; 67 - *L. shawi*; 57, 63, 68, 70, 73, 74, 76, 81, 82, 84, 85, 87, 88, 90, 95, 100, 101, 108, 113, 127, 157, 158, 207, 209 - *L. infantum*; 56, 75, 96, 97, 107 - *L. infantum / L. braziliensis*).



DISCUSSÃO

Várias técnicas moleculares têm se mostrado efetivas para detectar, identificar e caracterizar espécies de *Leishmania*, tanto na infecção natural de hospedeiros mamíferos, como em flebotomíneos, de diferentes áreas geográficas (ARANSAY et al., 2000; MIRANDA et al., 2002; DE PITA-PEREIRA et al., 2005; PERRUOLO et al., 2006; CARVALHO et al., 2008).

A sensibilidade dessas técnicas permite um melhor entendimento da competência do vetor e da epidemiologia das leishmanioses. Para definir uma espécie de flebotomíneo como vetora de uma espécie de *Leishmania*, além da ocorrência de infecção natural, é preciso que ela se enquadre nos parâmetros descritos por Killick-Kendrick (1990), que são aceitos e adotados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2007). Embora a dissecação do tubo digestivo dos flebotomíneos seja o padrão ouro para o estudo de infecção natural, esse método tem uma probabilidade muito pequena de detectar flagelados, além de ser trabalhoso e limitante para o processamento de um grande número de exemplares, necessários para os estudos epidemiológicos.

De 2013 até 2015 foram registrados no município de Caxias, 61 casos humanos de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e 99 de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Essa situação explica os índices de infecção de *Lu. longipalpis*, considerado o principal vetor de LVA no Brasil, encontrado infectado com *Le. infantum*, com uma taxa de infecção de 2,0% na área urbana e 7,0% na área rural; também justifica a presença de *Lu. whitmani*, vetor de LTA com uma taxa de infecção de 4,0% com *Le. braziliensis*, na área rural.

No presente estudo, *Le. infantum* foi encontrada em *Lu. longipalpis* e pela primeira vez em Caxias, também em *Lu. whitmani* e *Lu. termitophila* espécies que não são consideradas vetoras de LVA no Brasil.

A *Le. infantum*, agente etiológico da LVA, já havia sido registrada em foco de LVA em São Luís, capital do Maranhão, infectando *Lu. longipalpis* seu vetor natural (SOARES et al., 2010). Esta espécie tem sido encontrada naturalmente infectada por *Le. infantum* em várias regiões do Brasil (SARAIVA et al., 2010; MICHALSKY et al., 2011; REGO et al., 2015).

A infecção por esta espécie de *Leishmania* em flebotomíneos não vetores de LVA, já havia sido detectada em outras áreas biogeográficas do país. O primeiro registro de infecção natural de *Lu. whitmani* com *Le. infantum* foi reportado por Saraiva et al. (2010), no estado de Minas Gerais. Também há registros de infecção natural de *Lu.*

cortelezzii e *Lu. migonei*, este último, vetor comprovado de LTA no Brasil e na Argentina (CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; SALOMÓN et al., 2010). Isto demonstra a capacidade de espécies distintas de flebotômíneos de se infectarem com *Le. infantum* em diferentes regiões do país. Entretanto, há necessidade de se estudar a importância desses encontros, mesmo que ocasionais, para se entender a real importância desses achados em relação a eco-epidemiologia das leishmanioses.

Em nosso estudo, infecção mista por *Le. infantum* e *Le. braziliensis* foi encontrada em três espécies de flebotômíneos: *Lu. longipalpis*, *Lu. whitmani* e *Lu. trinidadensis*. A espécie, *Lu. longipalpis* não é vetor natural de *Le. braziliensis*, porém foi a espécie de flebotômíneo mais prevalente, tanto na zona urbana como rural, sendo que as taxas de infecção mista foram muito baixas, na maioria dos casos, variando entre um e cinco exemplares infectados na zona rural.

A espécie *Lu. whitmani* é considerado o mais importante vetor de LTA no Brasil associado a *Le. braziliensis*. Evidências epidemiológicas e o achado de infecções naturais por *Le. braziliensis* indicam a participação de *Lu. whitmani* na transmissão de LTA. Em todas as áreas de transmissão de LTA no Nordeste, estudadas até o momento, esta espécie de flebotômíneo está sugerida como transmissora de LTA, sendo uma espécie que predomina no peridomicílio, com alto grau de antropofilia (RANGEL; LAINSON, 2003). No presente estudo, ela foi encontrada infectada com *Le. braziliensis* e *Le. infantum* no peridomicílio da área rural. Outros autores também relataram infecções por *Le. infantum*, em *Lu. whitmani* na região Sudeste do país (MARGONARI et al., 2010; SARAIVA et al., 2010).

Dois espécies de flebotômíneos, *Lu. whitmani* e *Lu. trinidadensis* foram encontradas com co-infecção de *Le. infantum/Le. braziliensis*. No entanto, não há relatos na literatura recentes sobre essa associação nessas espécies de flebotômíneos, encontradas no presente estudo. Ainda não existem evidências de que *Lu. whitmani* e *Lu. trinidadensis* tenham importância na transmissão de *Le. infantum* para o homem. Infecções mista de *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis* já haviam sido relatadas por Silveira et al. (1984) em *Lu. flaviscutellata*.

Acredita-se que a ocorrência e a frequência de infecção natural por mais de uma espécie de *Leishmania*, especialmente em focos onde duas espécies se sobrepõem, são mais comuns do que os casos reportados na literatura. Foi demonstrado que, em co-cultivo de mais de uma espécie de *Leishmania*, que a espécie dominante tende a inibir o crescimento da outra espécie. O grau de detecção desse fenômeno não está inteiramente elucidado e provavelmente está subestimado (IBRAHIM et al., 1994).

As espécies *Le. braziliensis*, *Le. shawi*, *Le. mexicana*, *Le. guyanensis*, *Le. lainsoni/Le. naiffi*, todas causadoras de LTA, foram encontradas infectando *Lu. longipalpis*. Este flebotomíneo não é considerado uma espécie vetora dessas *Leishmania* e, no entanto, foi a espécie mais abundante e bem distribuída na região do estudo tanto na área urbana como rural. Pela primeira vez foi relatada no estado do Maranhão, em áreas de cerrado, fora da Região Amazônica a infecção natural de *Lu. longipalpis* por *Le. shawi*, *Le. mexicana*, *Le. guyanensis*, *Le. amazonensis* e *Le. lansonii/Le. naiffi*. Porém, foram encontrados poucos exemplares infectados, o que justifica as baixas taxas de infecção de apenas 0,1% por *Le. shawi*, *Le. mexicana* e *Le. amazonensis* na área urbana e de 0,6% a 1,0% para *Le. shawi*, *Le. mexicana* e *Le. guyanensis* na área rural, respectivamente.

O parasita *Le. braziliensis* foi encontrado infectando *Lu. longipalpis* apenas na área rural. Como vimos, *Lu. longipalpis* não é uma espécie vetora de *Le. braziliensis*, mas essa é uma espécie de flebotomíneo permissiva, sendo bem conhecida sua adaptação ao ambiente antrópico, sobretudo no peridomício. Infecções naturais por *Le. braziliensis* em *Lu. longipalpis* já foram relatadas na área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul por Paiva (2010). É considerada a espécie mais prevalente no homem no Brasil, causando lesões cutâneas e mucosas. Distribui-se por toda a zona endêmica de LTA, de norte a sul do país, em áreas de colonizações antigas ou recentes, estando geralmente associada à presença de animais domésticos (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Essa espécie foi também identificada em *Lu. whitmani*, considerado um vetor natural de *Le. braziliensis* em várias áreas do país. No Brasil essa espécie é transmitida por: *Lu. whitmani*, *Lu. wellcomei*, *Lu. intermedia*, *Lu. migonei* e *Lu. fischeri* dentre outras (LAINSON; SHAW, 1987).

O caso de *Le. shawi* infectando *Lu. longipalpis* não tinha registro no estado do Maranhão. Até agora a distribuição dessa espécie de *Leishmania* incluía os estados do Amazonas e Pará (LAINSON et al., 1989). Não há registro de infecção natural de *Lu. longipalpis* com *Le. shawi* em outras regiões do Brasil. O vetor natural de *Le. shawi* na região Amazônica é *Lu. whitmani*.

Duas espécies do subgênero *Leishmania*: *Le. mexicana* e *Le. amazonenses* foram encontradas infectando *Lu. longipalpis*. As espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* no Novo Mundo pertencem ao complexo *Leishmania (Leishmania) mexicana*, as leishmanias desse grupo são exclusivamente dermatotrópicas nos seus reservatórios naturais, representados por roedores silvestres. Os vetores conhecidos são do complexo *Lu. flaviscutellata*. Não há registros de *Le. mexicana* infectando *Lu.*

longipalpis no Brasil. *Le. mexicana* tem sido ocasionalmente relatada no homem no país (LAINSON; SHAW, 1987).

A espécie *Le. amazonensis*, o agente etiológico de LTA, incluindo a forma anérgica ou leishmaniose cutânea difusa, apresenta como principais vetores na Amazônia brasileira *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca* (SHAW; LAINSON, 1975). Este é o primeiro registro de infecção natural de *Lu. longipalpis* por *Le. amazonensis* no Maranhão. Savani et al. (2009), no Mato Grosso do Sul, também observaram *Le. amazonensis* em *Lu. longipalpis* com uma taxa de infecção de 1.25%.

Le. guyanensis com ocorrência antes circunscrita à região amazônica, em áreas de colonização recente, associada à edentados e marsupiais (LAINSON; SHAW, 2005; SHAW, 2003), tem como principais vetores as espécies *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (LAINSON; SHAW, 1987). Neste estudo, foi encontrada fora da Região Amazônica em *Lu. longipalpis* e *Lu. termitophila* apenas na área rural, com baixas taxas de infecção. Nessas duas espécies de flebotomíneos não vetoras de LTA. *Le. guyanensis* foi também encontrada por outros autores em *pool* de diferentes espécies de flebotomíneos fora da região Amazônica (REGO et al., 2015; QUARESMA et al., 2011).

Quanto à *Le. lainsoni* já foi registrada no Pará, Amapá e Rondônia (SILVEIRA et al., 1984; 1991a,b). Na América do Sul, essa espécie foi encontrada também na região sub-Andina do Peru (LUCAS et al., 1994; 1998) e na Bolívia (MARTINEZ et al., 2001; BASTRENTA et al., 2002), infectando *Lu. nuneztovari anglesi* (BASTRENTA et al., 2002). Estes dados demonstram a grande distribuição desta espécie no continente sulamericano, podendo ser ampliado para Caxias, no estado do Maranhão, infectando *Lu. longipalpis*.

Outra espécie de leishmânia encontrada no presente estudo, *Le. naiffi* tem registro de ocorrência nos Estados do Pará e Amazonas. Os seus principais vetores são a *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. ayrozai* (SHAW, 1999). Entretanto, no presente estudo, não foi possível separar *Le. lainsoni/Le. naiffi* com a técnica utilizada.

Com relação às três amostras identificadas como *Leishmania* sp., isso pode ser devido à pequena quantidade de DNA presente nestas amostras, inviabilizando a técnica de PCR-RFLP, ou as espécies presentes em tais flebotomíneos não puderam ser identificadas pelas técnicas empregadas.

O encontro de vetores incriminados ou suspeitos de transmitir LTA, com DNA do agente etiológico de LVA, e vice-versa, sugere permissividade de algumas espécies de flebotomíneos para infecção com diferentes espécies de *Leishmania*.

Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar a competência vetorial de espécies de flebotomíneos que não são vetores de determinadas espécies de *Leishmania* e infecção cruzada de vetores e parasitos de LVA/LTA.

Nossos resultados apontam para a circulação de diferentes espécies de *Leishmania* em diferentes espécies de flebotomíneos, capturados na área de realização da pesquisa, e ainda relatam o encontro de infecção mista em duas espécies de flebotomíneos, *Lu. longipalpis* e *Lu. trinidadensis*, o que caracteriza como um dado novo na literatura. Nossos dados também confirmam a importância de *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani*, como vetores de LVA e LTA, respectivamente. Porém, é importante destacar que o registro de infecção natural nessas e outras espécies de flebotomíneos, por espécies de *Leishmania* das quais eles não participam do ciclo de transmissão, não confirma a participação dessas espécies na transmissão de LVA e LTA em Caxias, no estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 1933–1938, 2000.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. WHO Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOs ONE** 7: e35671, 2012. Available: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- BASTRENTA, B.; BUITRAGO, R.; VARGAS, F.; LE PONT, F.; TORREZ, M.; FLORES, M.; MITA, N.; BRENIÈRE, S. F. First evidence of transmission of *Leishmania (Viannia) lainsoni* in a sub-Andean region of Bolivia. **Acta Tropica**, 83: 249-253, 2002.
- BRASIL – Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2007, 180 pp.
- CARVALHO, G. M. L.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; ROCHA LIMA, A. C. V. M.; GONTIJO, C. M. F. Naturally Infected *Lutzomyia* sand flies in a Leishmania-Endemic Area of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 8 (3): 413-414, 2008.
- CARVALHO, M. R.; VALENÇA, H. F.; SILVA, F. J.; PITA-PEREIRA, D.; DE ARAÚJO PEREIRA, T.; BRITTO, C.; BRASIL, R. P.; BRANDÃO FILHO, S. P. Natural *Leishmaniainfantum* infection in *Migonemyiamigonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) theputative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, 116: 108-110, 2010.
- CRUZ, C. F. R. **Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Bandeirantes – Paraná, entre 2000 e 2009**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 135p. 2010.
- DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. Tese (Livre-Docência) – Universidade de São Paulo. 1956.
- DE PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C. R.; SOUZA, M. B.; BRASIL, R. P.; BERTHO, A. L.; BARBOSA, A. F.; BRITO, C. C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, 99: 905-913, 2005.
- EL-BESHBISHY, H. A.; AL-ALI, K. H.; EL-BADRY, A. A. Molecular characterization of *Leishmania* infection in sand flies from Al-madinahAl-munawarah province, western Saudi Arabia. **Experimental Parasitology**, 134(2): 211-215, 2013.
- GONTIGO, B.; CARVALHO, M. L. DE. American Cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36:71-80, 2003.

GEPLAN. Gerência de planejamento e desenvolvimento econômico. **Atlas do Maranhão**. 2ed. São Luís: GEPLAN. Governo do Estado do Maranhão, 2002.

IBRAHIM, M. E.; SMYTH, A. J.; ALI, M. H.; BARKER, D. C.; KHARAZMI, A. "The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites," **Acta Tropica**, 57: 327–332, 1994.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2015. [on line]. 2015 [cited 2015 Dez 10]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=210300>.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a Review. **Medical Veterinary Entomology**, 14: 1-24, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th ed., Vol 5, **Parasitology**, Arnold, London, 313-349, 2005.

LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; DE SOUZA, A. A. A.; PÓVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A.; SILVEIRA, F. T. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brasil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee (Paris)**, v. 64, n. 3, p. 200-207, 1989.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 421-424, 1987.

LINS, R. M. M. A.; OLIVEIRA, S. G.; SOUZA, N. A.; QUEIROZ, R. G.; JUSTINIANO, S. C. B.; WARD, R. D. et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. **Insect Molecular Biology**, 11(2): 117-122, 2002.

LUCAS, C. M.; FRANKE, E. D.; CACHAY, M. I.; TEJADA, A.; CARRIZALES, D.; KREUTZER, R. D. *Leishmania (Viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 51: 533-537, 1994.

LUCAS, C. M.; FRANKE, E. D.; CACHAY, M. I.; TEJADA, A.; CRUZ, M. E.; KREUTZER, R. D.; BARKER, D. C.; MCCANN, S. H.; WATTS, D. M. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 59: 312-317, 1998.

MARGONARI, C.; SOARES, R. P.; ANDRADE-FILHO, J. D.; XAVIER, D. C.; SARAIVA, L.; FONSECA, A. L.; SILVA, M. E.; BORGES, E. C.; SANGUINETTE, C. C.; MELLO, M. N. Phlebotominae Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 47(6): 1212-1219, 2010.

MARTINEZ, E.; LE PONT, F.; MOLLINEDO, S.; CUPOLILLO, E.; A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, 95: 375-377, 2001.

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M. G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETTO M.; BARRAL, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotominae with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian

endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97: 185–188. PMID:12016439, 2002.

MICHALSKY, E. M.; GUEDES, K. S.; SILVA, F. O. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DIAS, C. L. F.; BARATA, R. A. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantumchagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44:58-62, 2011.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, G. B. M. L.; MICHALSKY, E. M.; DIAS, E. S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jacira, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44:76-78, 2011.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; SILVA, M. H.; VIANA, G. M. C.; LEONARDO, F. S.; BEZERRA, G. F. B.; SILVA, A. S. G.; SOARES, V. C. P.; PEREIRA, S. R. F.; REBÊLO, J. M. M.; BRAZIL, R. P. Spacial dynamics of urban populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Caxias, State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46: 555-559. 2013.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmaniasp* na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(6): 540-543, 2006.

PAIVA, B. R.; OLIVEIRA, A. G.; DORVAL, M. E. M. C.; GALATI, E. A. B.; MALAFRONTTE, R. S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**, 115: 126-130, 2010.

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

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A.; SILVA, S. R.; JUNIOR, A. J. M.; TEIXEIRA NETO, R. G.; MADEIRA, F. M.; CARVALHO, M. B.; PAGLIA, A. P.; MELO, M. N.; GONTIJO, C. M. F. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, 105: 579–585, 2011.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003, p. 291-309.

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

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, This article's doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153557. 58: 227–50, 2013.

REBÊLO, J. M. M.; ROCHA, R. V.; MORAES, J. L. P.; SILVA, C. R. M.; LEONARDO, F. S.; ALVES, G. A. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, p. 494-500, 2010.

RÊGO, D. R.; RUGANI, J. M. N.; SHIMABUKURO, P. H. F.; TONELLI, G. B.; QUARESMA, P. F.; GONTIJO, C. M. F. Molecular Detection of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniasis Focus at Xakriabá Indigenous, Reserve, Brazil. **PLOs ONE**, 10(4): e 0122038. doi:10.1371/journal.pone.0122038; p. 1-14, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA, 1650 pp, 1989.

SALOMÓN, O. D.; QUINTANA, M. G.; BEZZI, G.; MORÁN, M. L.; BETBEDER, E.; VALDÉZ, D. V. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**, 113: 84–87, 2010.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA, H. M.; DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SAVANI, E. S.; NUNES, V. L.; GALATI, E. A.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERE, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almeiroi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v 160, n. 1-2, p. 18-24, 2009.

SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J. D.; SILVA, S. DE O.; ANDRADE, A. S.; MELO, M. N. The molecular detection of different *Leishmania* species within sandflies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105(8): 1033-1039, 2010.

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, 47: 349-358, 2003.

SHAW, J. J. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brasil. In: **Memoirs on Entomology**, International. JFB. (eds). Associated Publishers, 1999.

SHAW, J.; ROSA, A. T.; SOUZA, A.; CRUZ, A. C. Transmissão de colaboradores agentes: Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2003, 337-351.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 69: 323-335, 1975.

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

SILVEIRA, F. T.; SHAW, J. J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. n., a new parasite from the state of Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 82: 289-292, 1984.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A.; SOUZA, A. A. A. Leishmaniose cutânea na amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, 33: 18-22, 1991a.

SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 8, 1991b.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RIBETB, DA S. M. Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de Leishmânias: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 272-275, 1984.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). **Casos de Leishmaniose Tegumentar no Maranhão**. 2014. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabgi>, acesso em: 11/03/2014.

SOARES, M. R. A.; CARVALHO, C. C.; SILVA, L. A.; LIMA, M. S. C.; BARRAL, A. M. P.; REBÊLO, J. M. M.; PEREIRA, S. R. F. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 26 (12): 2409-2413, 2010. PMID:21243235. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2010001200019>.

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

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

Agradecimentos

Os autores agradecem as Agências Brasileiras de Suporte Financeiro Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq).

ARTIGO 3 - REVISTA ACTA TROPICA**Estudo de fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de transmissão de leishmanioses, na região do Cerrado do Maranhão**

A.S. GUIMARÃES-E-SILVA¹ S. DE O. SILVA² R.C.R. DA SILVA³ J.M.M. REBÊLO⁴ e M.N. MELO⁵

¹Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação da Rede Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA/Brasil (E-mail: antoniasuely-silva@bol.com.br).

²Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação do Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901. Belo Horizonte, MG/Brasil (E-mail: silvaso@icb.ufmg.br).

³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde da Universidade Estadual do Maranhão/CESC-UEMA, Caxias, MA (e-mail: rosinhachris@hotmail.com).

⁵Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses S/N, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brasil (e-mail: macariorebelo@uol.com.br).

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, caixa Postal 486 31270-901. Belo Horizonte, MG/Brasil (e-mail: melo@icb.ufmg.br).

Endereço para correspondência: Maria Norma Melo, Laboratório de Biologia de *Leishmania*-Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (E-mails: melo@icb.ufmg.br, normamello@gmail.com).

RESUMO

Estudou-se o hábito alimentar de fêmeas do gênero *Lutzomyia* em áreas de transmissão de leishmanioses no estado do Maranhão, objetivando discriminar a fonte alimentar desses flebotomíneos pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e reações de PCR-RFLP com enzimas de restrição *HaeIII* e *MboI*. Os espécimes foram capturados com armadilhas luminosas do tipo CDC, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015, no Município de Caxias, Estado do Maranhão. Examinamos 778 fêmeas ingurgitadas, pertencentes a sete espécies de flebotomíneos. Do total de fêmeas analisadas foi possível identificar a fonte sanguínea de 74% (573 indivíduos), sendo na zona urbana o maior índice de positividade (63,37%). Os animais mais sugados foram galinha (22,3%), cão (16,9%), roedor (7,7%), respectivamente, mas também foram encontradas fêmeas alimentadas em sangue de humano (3,8%), porco (2,3%), cavalo (1,5%), gambá (1,5%) e boi (1,0%). As demais apresentaram padrão característico misto (17%), predominando galinha/cão (44,9%) e cão/roedor (32,6%), dentre outros. Dentre as espécies de *Lutzomyia* encontradas, *L. longipalpis* destacou-se, por ter se alimentado do sangue de todos os hospedeiros pesquisados. As demais espécies sugaram sangue de no máximo dois dos hospedeiros. O encontro de exemplares de flebotomíneos, especialmente de *L. longipalpis* e *L. whitmani* alimentados, ao mesmo tempo, com sangue humano, de roedores e de cão no peridomicílio mostra um comportamento oportunístico dessas espécies de *Lutzomyia* e reforça a hipótese de que a transmissão da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) esteja ocorrendo em áreas urbanas e rurais da região de estudo.

Palavras-chave: Vetor biológico, hospedeiros, reservatórios, Biologia molecular.

ABSTRACT

The food habit of female of genus *Lutzomyia* in leishmaniasis transmission areas in the state of Maranhão was studied, in order to discriminate the food source of these sandflies by polymerase chain reaction (PCR) technique and PCR-RFLP reactions with restriction enzymes *HaeIII* and *MboI*. The specimens were captured with light traps CDC, from March 2013 to February 2015, in the municipality of Caxias, Maranhão State. We examined 778 engorged females, belonging to seven species of sandflies. From the total of females analyzed, it was possible to identify the blood source of 74% (573 individuals) and in the urban area the highest positivity rate (63.37%). The animals most sucked were chicken (22.3%), dog (16.9%), rodent (7.7%), respectively, but also have been found females fed in human blood (3.8%), pig (2.3%), horse (1.5%), opossum (1.5%) and ox (1.0%). The others presented mixed characteristic pattern (17%), prevailing chicken/dog (44.9%) and dog/rodent (32.6%), among others. Among the species of *Lutzomyia* found, *Lu. longipalpis* was highlighted, by having been fed with blood of all hosts studied. The other species have sucked the blood of at most two of the hosts. The meeting of sandfly specimens, especially *Lu. longipalpis* and *Lu. whitmani* fed, at the same time, with human blood, rodent and dog in peridomiciliary shows an opportunistic behavior of these *Lutzomyia* species and reinforces the hypothesis that the transmission of American Visceral leishmaniasis (AVL) and American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is occurring in urban and rural areas of the study area.

Key words: Biological Vector hosts; Reservoirs, Molecular Biology.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças transmitidas por insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos, no entanto, somente as fêmeas são capazes de realizar a hematofagia (Forattini 1952). O conhecimento dos hábitos alimentares de insetos hematófagos foi desenvolvido à medida em que foram realizadas descobertas em relação ao envolvimento desses insetos na transmissão de doenças. A identificação da fonte alimentar de flebotomíneos permite um melhor entendimento da dinâmica dos vetores e vias de transmissão das doenças carregadas por eles, podendo ser útil no entendimento de como as espécies interagem com o seu hábitat. Esse conhecimento pode nortear as atividades de controle e vigilância das leishmanioses (DIAS et al., 2003; QUARESMA et al., 2012).

Através da identificação da fonte alimentar sanguínea de fêmeas de flebotomíneos, é possível conhecer os reservatórios que estariam atuando na manutenção do ciclo enzoótico das leishmânias, além de avaliar o grau de antropofilia das espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose (BARATA et al., 2005; HAOUAS et al., 2007) ou, até mesmo, o papel protetor ou atrativo que certos animais podem desempenhar, em relação ao homem, em área de transmissão destes parasitos (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008).

Um dos problemas encontrados na identificação da fonte alimentar de repastos sanguíneos é a quantidade da amostra de sangue ingerida pelo inseto, que é muito variável. Por exemplo, ceratopogonídeos e flebotomíneos ingerem uma pequena quantidade de sangue (0,01 a 0,1 mg) e essa quantidade requer técnicas muito sensíveis para a identificação da fonte alimentar, enquanto os triatomíneos podem ingerir mais que 400 mg de sangue. Outro fator é que os testes utilizados usam somente uma parte do sangue ingerido, visto que o processo digestivo inicia rapidamente (MARASSÁ et al., 2004).

Tradicionalmente, as análises da fonte alimentar de artrópodes hematófagos têm sido realizadas utilizando técnicas imunológicas (MUKABANA et al., 2002). Os métodos sorológicos são, no entanto, limitados, consomem muito tempo, apresentam baixa sensibilidade (SANT'ANA et al., 2008; RAVASAN et al., 2009), não permitem distinguir espécies geneticamente próximas e restringem sua análise a um grupo de vertebrados pela utilização de antisoros espécie-específicos (DIAS et al., 2003; MARASSÁ et al., 2006; HAOUAS et al., 2007).

A técnica de precipitina vem sendo utilizada desde a década de 1990, método imunológico que foi adaptado para a determinação da fonte alimentar sanguínea em mosquitos e outros insetos. Embora tenha sido a técnica mais utilizada, tem baixa sensibilidade e especificidade, além de requerer grande quantidade de sangue, o que dificulta a sua utilização com insetos de pequeno porte (MARASSÁ et al., 2004).

Alguns estudos no Brasil relatam a utilização da técnica de precipitina para determinação de fontes alimentares sanguíneas de flebotomíneos, como os trabalhos de Barata et al. (2005), em Minas Gerais, e Dias et al. (2003), Oliveira-Pereira et al. (2008) e Fonteles et al. (2009), no Estado do Maranhão.

Outras técnicas que apresentaram um maior grau de sensibilidade passaram a ser testadas, como a técnica de ELISA. Desta forma, essa técnica imunoenzimática foi adaptada para o estudo do hábito alimentar de dípteros (EDRISSIAN & HAFIZI 1982; BLACKWELL et al., 1995; GOMES et al., 2001; MWANGANGI et al., 2003; OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008).

Objetivando a identificação da fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos, por técnicas mais sensíveis e mais específicas, algumas alternativas têm sido empregadas, como as técnicas moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), bem como, o uso da PCR seguida pelo corte com enzimas de restrição (PCR-RFLP), que têm mostrado ser eficazes para a identificação do DNA da fonte alimentar de flebotomíneos (QUARESMA et al., 2012; JAOUADI et al., 2013; SOARES et al., 2014).

Poucos estudos sobre o hábito alimentar dos flebotomíneos têm sido realizados no estado do Maranhão, mais especificamente no município de Caxias, situado na região do Cerrado. No presente estudo foram identificadas as fontes alimentares sanguíneas de flebotomíneos da zona urbana e rural do município de Caxias, cujos resultados serão usados para nortear os serviços de saúde, visando à prevenção e controle das leishmanioses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O município de Caxias está localizado a 04°51'32"S e 43°21'22"W, com altitude de 66m, no estado do Maranhão, na mesorregião do Leste Maranhense e na Microrregião de Caxias, com área aproximada de 5.150,667 Km². Limita-se a Norte pelos municípios de Codó, Aldeias Altas e Coelho Neto; ao Sul com os municípios de São João do Sóter, Parnarama e Matões; a Leste com o município de Timon e o Estado do Piauí; e Oeste, pelo município de Gonçalves Dias, apresentando uma população de aproximadamente 159.396 mil habitantes e densidade demográfica em torno de 30,12 hab/Km² (IBGE, 2015).

Possui bioma típico de Cerrado e de mata mista, o clima tropical quente e sub-úmido, apresentando apenas duas estações definidas: chuvosa e seca. Durante o período chuvoso (janeiro a junho), a média de temperatura é de 26,1°C e no período seco (julho a dezembro), a média chega a 35,6°C (GEPLAN, 2002). A umidade relativa do ar máxima ocorre nos meses de março e abril, com valor de 83%, no entanto, no período seco pode chegar a 57%, com média anual de 70%.

Coleta e identificação dos flebotomíneos

O estudo foi realizado em 10 casas distribuídas nas zonas urbana e rural. As coletas foram feitas com auxílio de armadilhas luminosas do tipo CDC (*Center Disease Control*), alimentadas com baterias de 6 Volts, dispostas em abrigos de animais domésticos (galinheiros, chiqueiros e estábulos), a 1,5m de altura acima do solo. Os flebotomíneos foram capturados no período de março de 2013 a fevereiro de 2015, na fase de lua nova, mensalmente, das 18h às 6h da manhã seguinte.

Os insetos retidos nas armadilhas foram transportados para o Laboratório de Entomologia do Centro de Controle de Zoonoses de Caxias, Maranhão, onde foram sacrificados por resfriamento, posteriormente, foram realizados os processos de triagem, identificação e acondicionados a seco em freezer a - 20°, para posterior realização das análises moleculares objetivando a identificação da fonte alimentar sanguínea dos flebotomíneos.

Para realizar o processo de identificação das fêmeas ingurgitadas, foram retirados a cabeça e os três últimos segmentos abdominais com auxílio de estiletos

estéreis. Essas estruturas foram posteriormente, clarificadas com hidróxido de potássio a 10% por 3 horas, ácido acético a 10% por 20 minutos, três seções de 15 minutos em água destilada e lactofenol por 24 horas e montados entre lâmina e lamínula com uma gota de líquido de Berlese. O processo de identificação seguiu o exame das espermatecas e características do cibário. No momento da dissecação a face ventral da cabeça e a parte ventral dos últimos segmentos abdominais ficam voltadas para cima. O tórax e o abdômen foram acondicionados em frasco do tipo microtubos de 1,5ml a seco em freezer a -20°C para posterior extração de DNA. As fêmeas foram identificadas com auxílio da chave taxonômica proposta por Young e Duncan (1994). Os frascos contendo os espécimes foram devidamente identificados de acordo com a área de coleta, destacando-se nome do bairro e/ou localidade, data e número da residência, dentre outras informações importantes. Para a extração de DNA, realização das reações em PCR e reações de PCR-RFLP (cortes com enzimas de restrição), as fêmeas ingurgitadas, provenientes do mesmo dia e do mesmo ponto de coleta foram processadas individualmente.

Extração de DNA das fêmeas

A extração do DNA foi realizada utilizando Kit de Extração de tecidos e células Gentra Puregene® da Qiagen, de acordo com o protocolo do fabricante. Dessa forma, tórax e abdômen das fêmeas foram macerados utilizando um pistilo de plástico, posteriormente, adicionou-se nas amostras 200 μL de solução de lise celular e 1 μL de proteinase K. O macerado foi homogeneizado utilizando um vortex, incubando à 55°C por uma noite e logo após o período de incubação, adicionou-se 1 μL de RNase à solução, que foi homogeneizada por inversão e incubada a 37°C por 30 minutos.

Os macerados foram incubados por 1 minuto no gelo, adicionando 100 μL de solução de precipitação de proteínas a cada amostra. Os tubos foram homogeneizados por 20 segundos, seguidos de centrifugação por cinco minutos a 14.000rpm, sendo o sobrenadante transferido para um tubo novo contendo 300 μL de isopropanol e agitado lentamente por inversão cuidadosa por 50X. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 14.000rpm. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado, e o tubo foi colocado para secar de forma invertida sobre um papel absorvente. Posteriormente, adicionou-se 300 μL de etanol 70% aos tubos já secos e 30 μL de acetato de sódio 3M, invertendo-os lentamente por 15X e colocando-os no freezer a -70°C por uma hora.

O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados aos tubos 500µL de etanol 70%. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por dez minutos a 14.000rpm. O sobrenadante foi descartado. Repetiu-se a operação anterior, deixando o tubo invertido sob um papel absorvente para secagem. Ao final, adicionou-se 20µL de solução de hidratação de DNA (para uma fêmea), e os tubos foram estocados a uma temperatura de -20°C.

Reação de PCR para detecção de fonte alimentar sanguínea dos flebotomíneos

Para verificar a presença do DNA da fonte alimentar sanguínea das fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas, foram realizadas reações de PCR com os iniciadores: CyTB1 5'- CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' e CyTB2 5'- CCATCCAACATCTCAGCAT GATGAAA-3', que amplificam um fragmento de 358 pb, da região conservada do gene do citocromo *b* (*cytb*), do DNA mitocondrial de vertebrados (Steuber et al. 2005).

Para as reações de PCR, foi utilizado o Kit *Pure Taq Ready To go PCR Beads* (Amersham Biosciences), e as reações foram submetidas ao termociclador *MJ Research Wartertown*, Mass USA, utilizando o programa de amplificação conforme descrito a seguir: Desnaturação Inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; Anelamento a 58°C por 30 segundos e Extensão dos ciclos a 72°C por 1 minuto; Extensão Final a 72°C por 6 minutos. Em todas as reações foram utilizados controles positivos de DNA de amostras sanguíneas de diferentes grupos de animais vertebrados: suíno (*Sus domesticus*), bovino (*Bos taurus*), caprino (*Capra aegagrus*), humano (*Homo sapiens*), roedor (*Mus musculus*), canídeo (*Canis familiares*), ave (*Gallus domesticus*), equino (*Equus caballus*), coletado por um médico veterinário da Escola de Veterinária da UEMA, em animais presentes nessa área. Já o controle positivo de DNA de amostra sanguínea de marsupial (*Didelphis albiventris*), foi coletado de um espécime capturado na estação ecológica da UFMG com o uso da licença roedor (*Mus* nº 37950-1). Como controle negativo foram utilizados todos os reagentes da reação sem o acréscimo de DNA.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), no ano de 2014, sob parecer nº 909.095 e número de autorização para coleta dos flebotomíneos do ICMBio: nº 46319-1 para coleta de insetos.

Três microlitros de cada produto da reação de PCR foram adicionados a cinco microlitros do tampão de amostra, submetidos à corrida eletroforética em géis de poliacrilamida não desnaturante a 5% (Sambrook et al. 1989), corados com nitrato de prata, fotografados para documentação e análise dos resultados (SANTOS et al., 1993).

PCR-RFLP para a identificação de fonte alimentar sanguínea

As amostras amplificadas para o gene do citocromo *b* (*cytb*) foram submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *Hae*III e *Mbo*I. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 10 μ L para cada enzima, contendo 0,2 μ L de enzima (10U/ μ L), 1,8 μ L de tampão da enzima, 3,0 μ L de H₂O destilada e 5,0 μ L de produto da PCR. A mistura foi incubada por 1h a 37°C, os perfis de restrição foram analisados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 5%, corados pelo nitrato de prata e comparados com os perfis de banda produzidos dos controles positivos das amostras sanguíneas dos vertebrados.

RESULTADOS

As espécies de flebotomíneos identificadas neste estudo foram: *L. longipalpis*, *L. evandroi* e *L. lenti* na zona urbana, e *L. longipalpis*, *L. whitmani*, *L. sordelli*, *L. termitophila* e *L. trinidadensis* na zona rural (Tabela 1).

No total, 778 fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas foram estudadas por meio da técnica de PCR para a pesquisa da fonte alimentar sanguínea. Foi possível identificar a fonte sanguínea de 74% (573 indivíduos), tendo a zona urbana o maior índice de positividade (63,37%).

Os perfis de restrição obtidos das fêmeas ingurgitadas foram comparados aos perfis de bandas dos controles positivos das amostras sanguíneas dos vertebrados. Constatou-se que 39,6% das fêmeas se alimentaram principalmente em galinha, cão (35,4%), roedor (10,3%), humano (8,8%), porco (2,5%), cavalo (2,3%), gambá (0,8%) e boi (0,2%) (Tabela 1). Os resultados da alimentação mista em diferentes tipos de hospedeiros corresponderam a 17% (98 indivíduos), dos quais os predominantes foram: galinha/cão (44,9%) e cão/roedor (32,6%). Nas demais reações mistas, obtivemos as seguintes proporções: galinha/roedor (1,1%), galinha/homem (5,1%), roedor/homem (4%), e cavalo/roedor, roedor/porco e homem/gambá, com 1% cada um (Tabela 2).

No entanto, quando comparadas cada uma das zonas, rural e urbana, com a alimentação do tipo simples, com apenas um hospedeiro, verificou-se que, na zona rural o animal que apresentou maior positividade foi o cão (46,5%), seguido pela galinha (30,4%), roedor (9,7%) e humano (8,6%). Já na zona urbana, a galinha predominou (44,8%), seguida pelo cão (28,9%), roedor (10,6%) e humano (8,9%) (Tabela 1).

Quanto à alimentação mista, com mais de um hospedeiro, verificou-se que na zona rural a positividade foi maior em cão/roedor (43,7%) seguido por galinha/cão (37,5%), galinha/roedor (9,3%), roedor/homem (6,2%), galinha/humano (3,1%). Na zona urbana, predominou a combinação galinha/cão (48,4%) seguida de cão/roedor (27,2%), galinha/roedor (10,6%), galinha/homem (6,0%), roedor/homem (3,0%). Para cavalo/roedor, roedor/porco e homem/galinha a positividade foi igual (1,5%) (Tabela 2).

Em relação aos flebotomíneos seis espécies se alimentaram em cães: três em humanos; duas em roedor e galinha. Os demais hospedeiros foram sugados por apenas uma espécie de flebotomíneos.

Lu. longipalpis realizou respasto sanguíneo de todos os hospedeiros detectados no estudo, principalmente no cão e na galinha. Além disso, esta espécie

também, realizou repasto sanguíneo misto, ou seja, alimentar do sangue de vários hospedeiros, apresentando cinco combinações observadas na zona rural; e oito na zona urbana, predominando cão/galinha e cão/roedor. O vetor *Lu. whitmani* se alimentou em quatro fontes sanguíneas (cão, homem, roedor e galinha). As demais espécies de flebotomíneos se alimentaram em uma ou duas fontes sanguíneas.

Tabela 1. Espécies de flebotomíneos e suas respectivas fontes alimentares, como mostrados pelos perfis de restrição do fragmento amplificado do gene *cyt b*, de sangue de diferentes animais, digeridos com as endonucleases *Hae* III e/ou *Mbol*.

Áreas/animais	Cão	Homem	Roedor	Galinha	Boi	Porco	Cavalo	Gambá	Total
Zona rural	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>L. longipalpis</i>	66(81,48)	12(80,00)	16(94,12)	49(92,45)	1(100)	3(100)	2(100)	2(100)	151
<i>L. whitmani</i>	8(9,88)	2(13,33)	1(5,88)	4(7,55)	0	0	0	0	15
<i>L. sordelli</i>	1(1,23)	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. termitophila</i>	3(3,70)	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>L. trinidadensis</i>	3(3,70)	1(6,67)	0	0	0	0	0	0	4
Soma	81(100)	15(100)	17(100)	53(100)	1(100)	3(100)	2(100)	2(100)	174
Zona urbana	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>L. longipalpis</i>	85(97,70)	26(96,30)	31(96,88)	135(100)	0	9(100)	9(100)	2(100)	297
<i>L. evandroi</i>	2(2,30)	1(3,70)	0	0	0	0	0	0	3
<i>L. lenti</i>	0	0	1(3,13)	0	0	0	0	0	1
Soma	87(100)	27(100)	32(100)	135(100)	0	9(100)	9(100)	2(100)	301
Total (%)	168 (35,4)	42(8,8)	49(10,3)	188(39,6)	1(0,2)	12(2,5)	11(2,3)	4(0,8)	475

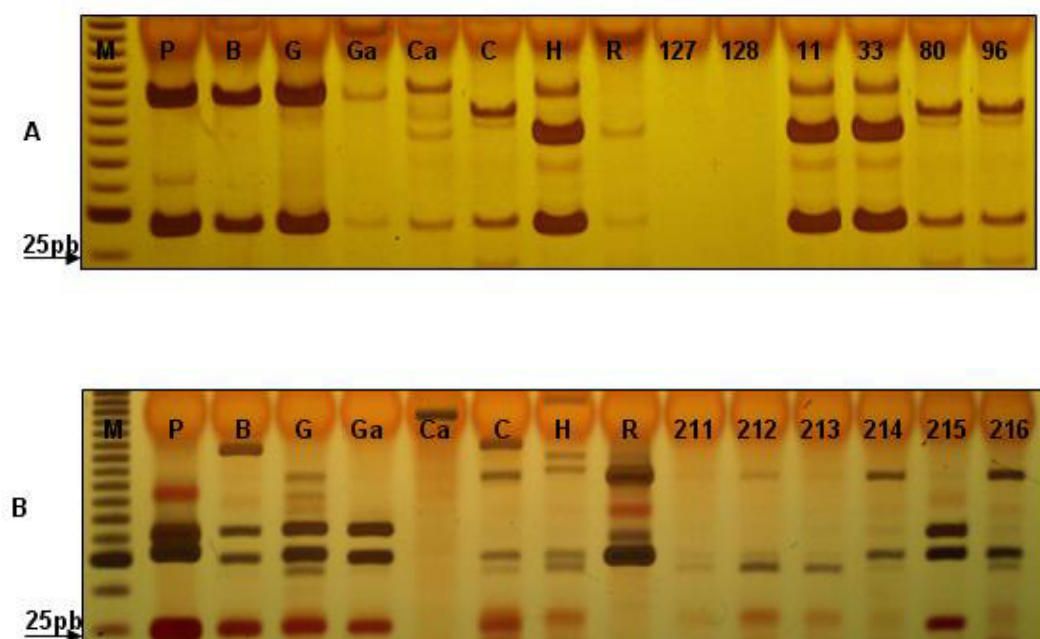
Tabela 2. Espécies de flebotomíneos e suas respectivas fontes alimentares mistas, como mostrados pelos perfis de restrição do fragmento amplificado do gene *cyt b*, de sangue de diferentes animais, digeridos com as endonucleases *HaeIII* e/ou *MboI*.

Áreas/animais	Cão/roedor	Roedor/homem	Galinha/homem	Galinha/roedor	Galinha/cão	Cavalo/roedor	Roedor/porco	Homem/gambá	Total
Zona rural	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>L. longipalpis</i>	6(42,86)	2(100)	1(100)	3(100)	9(75,00)	0	0	0	21
<i>L. whitmani</i>	4(28,57)	0	0	0	3(25,00)	0	0	0	7
<i>L. lenti</i>	1(7,14)	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. termitophila</i>	1(7,14)	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. trinidadensis</i>	2(14,29)	0	0	0	0	0	0	0	2
Soma	14(100)	2(100)	1(100)	3(100)	12(100)	0	0	0	32
Zona urbana	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>L. longipalpis</i>	17(94,44)	2(3,07)	4(6,15)	7(10,76)	32(49,23)	1(1,53)	1(1,53)	1(1,53)	65
<i>L. whitmani</i>	1(5,56)	0	0	0	0	0	0	0	1
Soma	18(100)	2(100)	4(100)	7(100)	32(100)	1(100)	1(100)	1(100)	66
Total	32	4	5	10	44	1	1	1	98

Como exemplos, são mostrados os padrões de restrição de algumas fêmeas de flebotomíneos estudadas: amostras de números 127 e 128 foram inconclusivos, para as fontes alimentares utilizadas como controles; as amostras 11 e 33 mostraram um padrão de restrição associados a humano; 80 e 96 foram associados ao cão digeridas com a enzima de restrição *MboI* (Figura 1A).

As amostras de números 211, 212 e 213 exibiram um padrão misto de restrição associado a roedor/cão; as amostras 214 e 216 exibiram um padrão de restrição associado ao homem; 215 ao porco, digeridas com a enzima de restrição *HaeIII* (Figura 1B).

Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, mostrando os perfis de restrição do fragmento amplificado do gene *Cyt bde* de diferentes grupos de animais, digeridos com endonucleases. A) Endonuclease *MboI*. Canaletas: M – marcador de peso molecular 25pb (*PROMEGA*). Controles positivos das fontes alimentares: P - porco, B - boi, G - gambá, Ga - galinha, Ca - cavalo, C - cão, H - homem, R – roedor; amostras de flebotomíneos provenientes das zonas urbana e rural estão identificadas pelos números (11, 33 – homem; 80, 96 – cão; 127, 128 - inconclusivos). B) Endonuclease *HaeIII*. Canaletas: M – marcador de peso molecular 25pb (*PROMEGA*). Amostras de flebotomíneos provenientes das zonas urbana e rural estão identificadas pelos números 211, 212 – roedor/cão; 214 – homem; 215 – porco e 216 - homem.



DISCUSSÃO

No Brasil, a leishmaniose é caracterizada por perfis epidemiológicos complexos e específicos para cada foco de transmissão. Normalmente, envolve várias espécies de *Leishmania*, com potencial de causar diferentes manifestações clínicas. São diversos os vetores e reservatórios que participam do ciclo da doença (Lainson 2010). Portanto, tornou-se cada vez mais importante estudar a associação entre os vetores e hospedeiros vertebrados, como um meio de planejar estratégias de intervenção e controle da doença.

Os resultados do presente estudo indicam que os flebotomíneos encontrados nas zonas rural e urbana de Caxias utilizam diferentes espécies de vertebrados como fontes alimentares. A maior frequência de repastos sanguíneos foi realizada por *Lu. longipalpis* em galinhas e cães. Esse resultado difere daqueles encontrados por Fonteles et al. (2009), no município de Axixá, também no Estado do Maranhão, onde os flebotomíneos preferiram os roedores, seguidos pelas aves. Nossos resultados se assemelharam aos de Dias et al. (2003), que na ilha de São Luís, também no Estado do Maranhão, verificaram o predomínio de aves, seguidas pelos roedores.

As galinhas apareceram como os hospedeiros mais importantes, talvez por serem os animais mais frequentes e abundante nos quintais, tanto de área urbana como rural. No município de Raposa, onde o calazar é endêmico e *Lu. Longipalpis* é encontrado com grande frequência, as galinhas constituem os animais domésticos mais presentes nas residências e os mais frequentes na área estudada, sendo que foram encontrados em 28,3% das habitações investigadas (BARROS et al., 2014).

Vários estudos demonstram que as galinhas funcionam como um bom atrativo para os flebotomíneos e que os galinheiros podem servir como local de repouso (BRAZIL et al., 1991) e/ou de reprodução para esses insetos (CASANOVA et al., 2013). Embora as galinhas não sejam reservatórios para *Leishmania*, elas podem ser importantes na manutenção de vetores e atrair mamíferos reservatórios para as vizinhanças dos galinheiros (ALEXANDER et al., 2002). Talvez, na epidemiologia das leishmanioses, esse seja o principal papel das galinhas, atraírem os flebotomíneos para os peridomicílios humanos, uma vez que as aves são refratárias, funcionando como reservatórios (DIAS et al., 2003).

Nesse aspecto, o cão, o segundo animal mais presente na fonte alimentar dos flebotomíneos, adquire maior importância, pois é o principal reservatório doméstico de *Le. (Leishmania) infantum*, sendo o responsável pela manutenção desse parasito em áreas endêmicas de LVA (GONTIJO & MELO, 2004). Na área do presente estudo, além da alta porcentagem de fêmeas que se alimentaram em cães, a presença de gambás nos peridomicílios,

ainda que em baixa frequência, chamou a atenção. Esse fato é especialmente importante porque a presença desse animal infectado nos peridomicílios permite que ele atue como um elo entre os ciclos doméstico e silvestre da LVA, podendo aumentar o risco da infecção canina em 2,6 vezes (CABRERA et al., 2003). Isso significa que o gambá pode funcionar como reservatório peridoméstico da *Le. infatum* (CORREDOR et al., 1989).

Dentre os animais sinantrópicos pesquisados, além do gambá estão os roedores. Em estudo realizado, em Buriticupu na Amazônia maranhense (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008) e em Raposa (DIAS et al., 2003), as fêmeas de flebotomíneos examinadas preferiram o sangue de roedor. Essa atração foi moderada em Mato Grosso (MISSAWA et al., 2008). Ao se confirmar o papel de roedores como reservatórios de leishmânias, na área desse estudo, esses animais poderão ser considerados como um elo entre o ambiente silvestre e o domiciliar, no ciclo epidemiológico da LVA.

Nesse estudo, os equinos ficaram entre os animais menos procurados, assemelhando-se aos resultados de Haouas et al. (2007), na Tunísia. Contudo, no Mato Grosso do Sul, segundo estudos de Missawa et al. (2008), foram moderadamente procurados, enquanto no Rio Grande do Norte, esses animais atraíram mais flebotomíneos que os outros vertebrados estudados (XIMENES et al., 1999). Desse modo, deve-se procurar nesses animais, evidências de infecção por *Leishmania*, pois na literatura há relato do encontro de indivíduos naturalmente infectados em área de transmissão de leishmaniose na Venezuela (AGUILAR et al., 1984), em São Paulo (YOSHIDA et al., 1990) e no Brasil, no estado de Minas Gerais (SOARES et al., 2014).

A utilização dos equinos como animal de tração nas áreas rurais ressalta a sua importância no ciclo de transmissão da leishmaniose e sua íntima relação de trabalho com o homem demonstra que a preocupação não deveria ocorrer somente com população canina. O intenso intercâmbio de equinos entre os povoados rurais e até mesmo na periferia urbana é um fator de risco para uma possível difusão do agente etiológico das leishmanioses.

Em nosso estudo, os humanos constituíram a quarta fonte alimentar sanguínea mais encontrada nos flebotomíneos. Esse resultado evidencia o grau de antropofilia do *Lu. longipalpis*, fato já observado em outras áreas do nordeste brasileiro (Ward et al., 1983), onde em certas ocasiões o vetor é atraído com mais frequência pelas pessoas do que, por exemplo, pelos cães (Deane & Deane, 1962). Na Costa Rica, Zeledon et al. (1984) também capturaram números significativos de flebotomíneos em iscas humanas, assim como no cão, porco cavalo e boi. Na Amazônia paraense, por outro lado, *Lu. longipalpis* está mais inclinado a picar o cão do que as pessoas (LAINSON & SHAW, 1979), todavia, de acordo com Quinnell et al. (1992), o inseto tem hábito alimentar oportunístico. A relativa frequência de sangue humano no

conteúdo intestinal dos espécimes de flebotomíneos examinados sugere que estes insetos estão bem adaptados ao peridomicílio. Contudo, a persistência dos focos naturais próximos propicia o contínuo processo de infestação nos anexos peridomiciliares.

O encontro de exemplares de flebotomíneos, especialmente de *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani* alimentados, ao mesmo tempo, com sangue humano, de mucura, roedores e cão no peridomicílio, corrobora a hipótese de que a transmissão de LTA e LVA esteja ocorrendo no peridomicílio ou mesmo na habitação humana. Nas áreas em que ocorre a Leishmaniose Zoonótica, a grande presença de animais domésticos, favorece a alimentação dos flebotomíneos em várias espécies hospedeiras.

Teoricamente, todos os elos da cadeia de transmissão das leishmanioses estão presentes nos ambientes peridoméstico e periurbano do Município de Caxias, o que poderia explicar os números de casos da doença que tem sido notificado nos últimos anos. De 2013 a 2015, foram registrados 99 casos humanos de LVA e 61 casos de LTA no município de Caxias. Nesse caso, a implementação de estratégias de controle da doença deverá levar em consideração a ecologia desses elos.

Considerando que os métodos de controle e prevenção atuais não têm se mostrado eficazes e que várias espécies de animais podem servir como fonte de alimentação para os flebotomíneos e também como reservatórios, novas estratégias de controle deveriam ser desenvolvidas para evitar que esse ciclo de transmissão continue se propagando.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. M.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, R.; DEANE, L. M. Study of an Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela. The Role of Domestic Animals. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, n.2, 181-195, 1984.
- ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H.; MORRISON, A. C.; FERRO C.; TESH R. B. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p 1480-5, 2002.
- BARROS, V. L.L.; MONTEIRO, P.S.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Estudo da fonte alimentar sanguínea de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) na Zona Rural da Ilha de São Luís-MA, Brasil, *Revista Humana*, v. 1, n. 1, p. 61-71, 2014.
- BARATA, R. A.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; FIUZA, J.; LOROSA, E. S.; FIÚZA, J. A.; GONÇALVES, C. M.; de PAULA, K. M.; DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(5): 421-425, 2005.
- BLACKWELL, A.; BROWN, M.; MORDUE, W. The use of an enhanced ELISA method for the identification of *Culicoides* bloodmeals in host-preference studies. **Medical Veterinary Entomology**, v.9, p.214-218, 1995.
- BRAZIL, R. P.; ALMEIDA, D. C.; BRAZIL, B. G.; MAMEDE S. M. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitologia**, 33 (Suppl. 1): 113–117, 1991.
- CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M. & JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 45: 79–83, 2003.
- CASANOVA C.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; SAMPAIO, S. M. P.; MARCORIS, M. L. G.; COLLA-JACQUES, F. E.; PRADO A. P. Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7: 2443, 2013.
- CORREDOR, A.; GALLEGO, J. F.; TESH, R. B.; MORALES, A.; FERRO, C. C.; YOUNG KREUTZER, R. D.; BOSHELL, J.; PALAR, M. Y.; CACERES, E.; PELAEZ, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 40: 480-486, 1989.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, 4:198-212, 1962.
- DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; RÊBELO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, 19:1373-1380, 2003.

EDRISSIAN, G. H.; HAFIZI, A. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of *Anopheles* mosquito blood meals. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, 76: 54-56, 1982.

FONTELES, R. S.; VASCONCELOS, G. C.; AZEVÊDO, P. C. B.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; LOPES, G. N. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana no estado do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, 42: 647-650, 2009.

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

GEPLAN. **Gerência de planejamento e desenvolvimento econômico** (Atlas do Maranhão). 2ed. São Luís: GEPLAN. Governo do Estado do Maranhão, 2002.

GOMES, L. A. M.; DUARTE, R.; LIMA, D. C.; DINIZ, B. S.; SERRÃO, M. L.; LABARTHE, N. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* 77 (Linnaeus) and *Aedes flaviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and humans hosts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96: 693-695, 2001.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n 3, 2004.

HAOUAS, N.; PESSON, B.; BOUDABOUS, R.; DEDET, J. P.; BABBA, H.; RAVEL, C. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 77(6): 1054-1059, 2007.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. [on line]. 2015 [cited 2015 Dez 10]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=210300>.

JAOUADI, K.; HAOUAS, N.; CHAARA, D.; BOUDABOUS, R.; GORCII, M.; KIDAR, A.; DEPAQUIT, J.; PRATLONG, F.; DEDET J. P.; BABBA, H. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) blood meal sources in Tunisian cutaneous leishmaniasis foci: could *Sergentomyia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens? **Annals of the Entomological Society of America**, 106: 79-85, 2013.

LAINSON, R. Espécie neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 01, nº. 02, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: **Biology of the Kinetoplastida**. LUMSDEN, E. D. A. (ed.), p. 1-116, London: Academic Press. 1979.

MARASSÁ, A. M.; CONSALES, C. A.; GALATI, E. A. B.; Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(6): 441-446, 2004.

MARASSÁ A. M.; CONSALES, C. A.; GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura no sistema avidina-biotina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39: 183-186, 2006.

MISSAWA, N. A.; LOROSA E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Luz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(4): 365-368, 2008.

MUKABANA, W. R.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Analysis of arthropod blood meals using molecular genetic markers. **Trends in Parasitology**, 18: 505-509, 2002b.

MWANGANGI, J. M.; MBOGO, C. M.; NZOVU, J. G.; GITHURE, J. I.; YAN, G.; BEIER, J. C. Blood-meal analysis for *anopheline* mosquitoes sampled along the Kenyan coast. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.19, p.371-375, 2003.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 24(9): 2183-2186, 2008.

QUARESMA, P. F.; CARVALHO, G. M. L.; RAMOS, M. C. N.; ANDRADE FILHO, J. D. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 107(4): 480-485, 2012.

QUINNELL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 6: 195-200, 1992.

RAVASAN, N. M.; OSHAGHI, M. A.; JAVADIAN, E.; RASSI, Y.; SADRAEI, J.; MOHTARAMI, F. Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. **Journal of Arthropod-Borne Disease**, 3(1): 8-18, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**, A Laboratory Manual, 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1650 p.

SANT'ANNA, M. R. V.; JONES, N. G.; HINDLEY, J. A.; MENDES-SOUSA, A. F.; DILLON, R. J.; CALVACANTE, R. R.; ALEXANDER, B.; BATES, P. A. Blood meal identification and parasite infection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Tropica**, 107: 230-237, 2008.

SANTOS, J. B.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetic**, 90: 655-656, 1993.

SOARES, I. R.; SILVA, S. O.; MOREIRA, F. M.; PRADO, L. G.; FANTINI, P.; MARANHÃO, R. P. A.; FILHO, J. M. S.; MELO, M. N.; PALHARES, M. S. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, 197: 665-669, 2014.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, 97: 247-54, 2005.

WARD, R. D.; RIBEIRO, A. L.; READY, P. D.; MURTAGH, A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 78: 269-280, 1983.

XIMENES, M. F. F. M.; SOUZA, M. F.; CASTELLÓN, E. G. Density of sandflies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94: 427-432, 1999.

YOUNG, D. G.; DUCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, 54, 1994.

YOSHIDA, E. L. A.; CORREA, F. M. A.; MARQUES, S. A.; STOLF, H. O.; DILLON, N. L.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr. G. Human, Canine and Equine (*Equus caballus*) Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the South-West Region of São Paulo State, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, n.1, p.133-134, 1990.

ZELEDON, R.; MURILLO, J.; GUTIERREZ, H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 79: 455-459, 1984.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos conhecimentos adquiridos após a realização deste estudo foi possível conhecer as espécies de flebotomíneos presente nesta área, permitiu também, conhecer quais espécies de flebotomíneos são mais frequentes, quais as espécies de *Leishmania* estão circulando no município, além de detectar a preferência alimentar sanguínea desses insetos, até então desconhecida para a região leste do Estado.

O município de Caxias, por ser uma área onde as leishmanioses manifestam-se endemicamente, requer atenção constante e contínua para com o ciclo de transmissão de *Leishmania*. Neste contexto, mais estudos sobre a diversidade dos flebotomíneos na região acarretam em maiores contribuições à compreensão da natureza desta parasitose, e logo, em medidas de prevenção mais eficientes.

O presente trabalho supriu uma parte destas demandas, ao dar uma contribuição sobre a diversidade das espécies de flebotomíneos, *Leishmania* e fonte alimentar. Neste sentido, os dados dessa pesquisa possibilitam a realização de estudos futuros a cerca de comprovar a competência vetorial desses insetos, bem como, conhecer quais os reservatórios potenciais de *Leishmania* e indicar o papel protetor que certos animais podem desempenhar em relação ao homem na área de transmissão do parasito.

Todos esses fatores servem de subsídios para implementação de Programa de Controle dos vetores e prevenção das leishmanioses, que consequentemente resultará na diminuição do número de casos das leishmanioses no estado do Maranhão.

ANEXOS

Demais publicações durante o desenvolvimento da tese (2012 a 2016)

1. Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(5):555-559, Sep-Oct, 2013
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0150-2013>

Major Article

Spatial dynamics of urban populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Caxias, State of Maranhão, Brazil

**Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento^{[1],[2]}, Maria Helena Silva^{[1],[2]},
Graça Maria de Castro Viana^{[1],[2]}, Francisco Santos Leonardo^{[1],[2]},
Geusa Felipa de Barros Bezerra^{[1],[2]}, Antonia Suely Guimarães e Silva^{[1],[2]},
Valéria Cristina Pinheiro Soares^{[1],[2]}, Silma Regina Ferreira Pereira^{[1],[2]},
José Manuel Macário Rebêlo^{[1],[2]} and Reginaldo Peçanha Brazil^[3]**

[1]. Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA. [2]. Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, MA. [3]. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

2. Artigo Submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

27/02/2016 ScholarOne Manuscripts

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Manuscript ID
RBPV-2016-0024

Title
Occurrence of Sand Flies (Diptera, Psychodidae) in Rural and Urban Surroundings in Leishmaniasis Transmission Area

Authors
Guimarães e Silva, Antonia
Soares-da-Silva, Joelma
Soares Pinheiro, Valéria
Rebêlo, José

Date Submitted
27-Feb-2016

3. Artigo publicado na Revista de Patologia Tropical Vol. 44 (2): 181-193. abr.-jun. 2015

ARTIGO ORIGINAL

doi:10.5216/rpt.v44i2.36649

**FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE)
EM FOCOS URBANOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL
NO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

Larissa Barros da Silva¹, Dorlene Maria Cardoso de Aquino¹, Francisco Santos Leonardo², Antônia Suely Guimarães e Silva³, Maria Norma Melo⁴, José Manuel Macário Rebêlo⁵ e Valéria Cristina Soares Pinheiro^{1 e 6}

4. Artigo publicado na Revista Paraense de Medicina

ARTIGO ORIGINAL

**THE OCCURRENCE OF PHLEBOTOMINES (*Diptera psychodidae*) IN A LEISHMANIASIS-
ENDEMIC AREA¹**

**OCORRÊNCIA DE FLEBOTOMÍNEOS (*Diptera psychodidae*) EM ÁREA ENDÊMICA DE
LEISHMANIOSES**

Antonia S GUIMARÃES-E-SILVA²; Francisco S LEONARDO³; Erlen R e Silva COSTA⁴; Sérgio H de ALCÂNTARA⁵;
Valéria C Soares PINHEIRO⁶ e José M Macário REBÊLO⁷

5. Artigo Aceito para publicação - Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção

Artigo Original

**Fatores associados à Leishmaniose Visceral na área endêmica de Codó, Estado do
Maranhão, Brasil**

*Factors associated with Visceral Leishmaniasis in endemic area of Codó, State of Maranhão,
Brazil*

Larissa Barros da Silva¹, Dorlene Maria Cardoso de Aquino¹, Juliana Maria Trindade Bezerra², Maria Norma Melo³, Francisco Santos Leonardo⁴, Antônia Suely Guimarães-e-Silva⁵, Valéria Cristina Soares Pinheiro^{1,6}

¹ Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil

² Centro de Pesquisas Rene Rachou-Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz/MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

³ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

⁴ Núcleo de Vigilância Epidemiológica e Controle de Doenças, Codó, Maranhão, Brasil

⁵ Centro de Controle de Zoonoses de Caxias, Caxias, Maranhão, Brasil

⁶ Universidade Estadual do Maranhão de Caxias, Caxias, Maranhão, Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) E INFECÇÃO NATURAL POR LEISHMANIA EM FOCO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO PERÍMETRO URBANO E ZONA RURAL DE CAXIAS, MARANHÃO, BRASIL.

Pesquisador: Antonia Suely Guimarães e Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36713614.0.0000.5554

Instituição Proponente:

Patrocinador Financiamento Próprio

Principal:

Endereço: S/E

Bairro: S/E

CEP: 70.255-010

UF: MA

Município: CAXIAS

Telefone: (99)3251-3938

Fax: (99)3251-3938

E-mail: cepe@cesc.uema.br

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 909.095

Data da Relatoria: 29/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal, exploratório, descritivo e de campo, tendo uma abordagem quantitativa e qualitativa no município de Caxias. Serão realizadas atividades de Educação e Saúde para verificar o nível de entendimento dos conhecimentos repassados e identificar as principais espécies de flebotomíneos que ocorrem na área periurbana e zona rural do município de Caxias-MA. O teste estatístico Qui-Quadrado será utilizado para analisar as diferenças na proporção de indivíduos capturados entre os diferentes ambientes. Dessa forma, as diferenças serão consideradas significativas quando a probabilidade (p) do erro for inferior a 5%, com nível de significância ($p > 0,05$). Para analisar a diversidade nos diferentes ambientes, serão calculados os Índices de Margalef e Shannon. Para medida de Similaridade serão utilizados os Índices de Sorenson, para dados qualitativos de presença/ausência de espécies, e de Morisita-Horn, para dados quantitativos. Será feita a Correlação de Pearson entre o número de espécies encontradas e as médias da temperatura e da pluviosidade, medidos ao longo dos anos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar o estudo bioecológico e análise da taxa de infecção das espécies de flebotomíneos em área de risco para LTA situadas no perímetro urbano e zona rural de Caxias-MA

Objetivo Secundário:

- Identificar as principais espécies de flebotomíneos que ocorrem na área periurbana e zona rural do município de Caxias-MA nas estações chuvosa e seca;
- Verificar a relação da abundância relativa do vetor no peri, intra e extradomicílio;
- Detectar a infecção natural no trato digestivo de fêmeas por formas flageladas promastigotas de protozoários do gênero *Leishmania* através de técnicas moleculares;
- Estabelecer a fonte alimentar sanguínea dos flebotomíneos através de ELISA;
- Realizar atividades de Educação e Saúde para verificar o nível de entendimento dos conhecimentos repassados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A pesquisa com aplicação de questionário e coleta de flebotomíneos não confere nenhum risco a população a ser estudada e a equipe envolvida no projeto.

Benefícios: subsidiar os serviços de saúde visando a prevenção e controle da doença, bem como, para informar a população das áreas de estudo sobre a forma de transmissão das leishmanioses e as principais medidas de combate visando aumentar a participação da população nas campanhas de controle da LTA em Caxias, Maranhão.

Endereço: S/E

Bairro: S/E

CEP: 70.255-010

UF: MA

Município: CAXIAS

Telefone: (99)3251-3938

Fax: (99)3251-3938

E-mail: cepe@cesc.uema.br

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é importante, sendo as informações serão de grande relevância para o entendimento da epidemiologia dessa endemia e seus vetores na região, assim, os resultados serão usados para subsidiar os serviços de saúde visando à prevenção e controle da LTA em Caxias-MA. A equipe encontra-se preparada para realizar a pesquisa

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão presentes: Folha de rosto sem es devidamente assinada, projeto de pesquisa, TCLE, carta de anuência assinada pelo responsável pelo serviço onde aconteceu a coleta de dados, instrumento de coleta de dados, carta de encaminhamento, orçamento, cronograma e declaração de infraestrutura para realização da pesquisa

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Folha de rosto- Falta identificar a instituição proponente e assinatura dos responsáveis;

Continuação do Parecer: 909.095

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atender as pendencias no prazo de 30 dias

CAXIAS, 11 de Dezembro de 2014

Assinado por:
JOSENEIDE TEIXEIRA CAMARA
(Coordenador)

Endereço: S/E

Bairro: S/E

CEP: 70.255-010

UF: MA

Município: CAXIAS

Telefone: (99)3251-3938

Fax: (99)3251-3938

E-mail: cepe@cesc.uema.br