



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLÓGIA DA REDE BIONORTE



EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE AMERICANA DA REGIÃO DO PARQUE NACIONAL DOS LENÇÓIS MARANHENSES. Enfoque na identificação das espécies de leishmânias e na capacidade vetorial dos flebotomíneos.

RAQUEL SILVA FONTELES

**São Luís - MA
Junho/2016**

RAQUEL SILVA FONTELES

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE AMERICANA DA REGIÃO DO PARQUE NACIONAL DOS LENÇÓIS MARANHENSES. Enfoque na identificação das espécies de leishmânias e na capacidade vetorial dos flebotomíneos.

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 para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo (UFMA).

**São Luís - MA
Junho/2016**

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

Silva Fonteles, Raquel.

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE AMERICANA DA REGIÃO DO PARQUE NACIONAL DOS LENÇÓIS MARANHENSES. : Enfoque na identificação das espécies de leishmânias e na capacidade vetorial dos flebotomíneos / Raquel Silva Fonteles. - 2016.

161 p.

Orientador(a): José Manuel Macário Rebelo.

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

1. Barreirinhas - MA. 2. Biologia Molecular. 3. Leishmaniose tegumentar. 4. Lutzomyia whitmani. I. Macário Rebelo, José Manuel. II. Título.

RAQUEL SILVA FONTELES

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE AMERICANA DA REGIÃO DO PARQUE NACIONAL DOS LENÇÓIS MARANHENSES. Enfoque na identificação das espécies de leishmânias e na capacidade vetorial dos flebotomíneos.

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 para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador(a): Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo (UFMA).

Banca examinadora

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo
Orientador- Presidente da banca

Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro
Departamento de Biologia - UEMA

Prof. Dra. Arlene de Jesus Mendes Caldas
Departamento de Enfermagem - UFMA

Profa. Dra. Maria de Rita Seabra N. de C. Guerra
Departamento de Biologia - UEMA

Prof. Dr. Eloísa da Graças do Rosário Gonçalves
Departamento de Patologia - UFMA

**São Luís - MA
Junho/2016**

À Deus, criador de toda vida.

À minha família, pelo apoio emocional durante toda minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À meu pai Luiz, minha mãe Fátima, minha irmã Lia e meu sobrinho Thomas pelo amor e cuidados dedicados a mim e por sempre me apoiarem incondicionalmente na minha escolha profissional.

Ao meu marido João, pela ajuda nas coletas, pelo carinho, amor e dedicação, por entender meus momentos de ausência e me apoiar em tudo.

Ao Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo, meu orientador, por esses anos de ensinamento, de apoio, de conselhos e de oportunidades, essenciais para minha formação acadêmica.

Aos amigos e companheiros de trabalho Jorge, Bruno e Adalberto pelas ajudas nas coletas e nos experimentos de laboratório.

Ao colega Ciro, pela ajuda nos testes estatísticos.

Á minha amiga e colega de curso Suely, pela ajuda nos trabalhos e companhia nas viagens e nos experimentos de laboratório.

RESUMO

Introdução. As leishmanioses constituem um grupo de doenças infectoparasitárias negligenciadas, com grande repercussão a nível mundial e nacional. No Estado do Maranhão tanto a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) como a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) são endêmicas e apresentam grande destaque no cenário nacional. Dentro do território maranhense, uma das regiões de destaque é a do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses – PNLN, cujo entorno, tem sofrido danos ambientais e ecológicos gerados pelo homem, em função das atividades diretas e indiretas do turismo. Como resultado desse processo todos os anos são registrados casos, principalmente de LTA. **Objetivos.** Diante desta realidade, este trabalho objetivou definir o perfil epidemiológico da LTA entre os anos de 2007 e 2013, levando em consideração os fatores demográficos (faixa etária e sexo), ocupacionais e temporais das populações acometidas (casos notificados); demonstrar através de uma ferramenta cartográfica, um mapa da distribuição espaço temporal dos casos de LTA e um mapa interativo para determinação da taxa de risco para aquisição da LT. Também se propôs estudar o ciclo de transmissão da doença, a partir da identificação das espécies de flebotomíneos, de suas fontes de sangue e de seus parasitas do gênero *Leishmania*, e determinar capacidade vetorial de *Lu. whitmani* para *Le. Braziliensis* e *Le. Amazonenses*. **Metodologia.** O município de Barreirinhas foi selecionado para esse estudo porque constitui a principal porta de entrada ao PNLN. Em suma, fez-se o inquérito dos casos da LTA nos arquivos do SINAN de todas as localidades do município (158), no período de 2007-2013, e realizou-se coletas de flebotomíneos em 62 destes povoados. As espécies foram identificadas taxonomicamente e as fêmeas analisadas a nível molecular para pesquisa de infecção natural por *Leishmania* e dos animais que serviram como fonte alimentar. **Resultados.** Foram notificados 458 casos positivos de LTA entre os anos de 2007 e 2013 predominando nos homens provenientes da zona rural e lavradores. Os casos estavam concentrados na região centro-sul do município, ao longo dos anos. Houve certa expansão geográfica com o surgimento de novos focos, entretanto, foi observada a persistência das antigas áreas de ocorrência da doença. Quanto às taxas de risco, os povoados Barra do Sitio, Engenho e Manoelzinho foram os que apresentaram positividade para todas as variáveis estudadas. Já os povoados Quebra, Santa Rosa e Fumaça, ofereceram menor risco, uma vez que, quase todas as variáveis estudadas deram negativas para essas localidades. Quanto aos flebotomíneos, foram coletados 9.853 exemplares de 18 espécies, todas presentes no extradomicílio (mata) e apenas 12 ocorreram nos peridomicílios. A abundância foi maior no peridomicílio (56,2%) do que no extradomicílio (43,8%) e as fêmeas predominaram (51,4%) sobre os machos (48,6%). As espécies dominantes foram *Lu. whitmani* (53,83%), *Lu. longipalpis* (25,60%), *Lu. lenti* (11,69%), *Lu. evandroi* (5,50%) e *Lu. flaviscutellata* (0,87%). As infecções naturais por *Le. infantum*, foram encontradas em fêmeas capturadas nos peridomicílios de cinco povoados e no extradomicílio de outros dois. A espécie *Lu. longipalpis*, vetora de *Le. infantum*, mostrou uma taxa de positividade de 3,7% para esta espécie. Enquanto espécies não consideradas vetoras desta leishmânia, como *Lu. lenti* e *Lu. whitmani* mostraram taxas de infecção de 0,6% e 0,9%, respectivamente. A taxa de infecção natural por *Le. braziliensis*, foi detectada nos peridomicílios de duas localidades; para *Lu. whitmani*, considerada vetora desta espécie de *Leishmania* foi encontrada taxa de 0,3%. A taxa de infecção por *Le. amazonensis* foi de 8% para *Lu. flaviscutelata* obtidos nos peridomicílios de dois povoados e no extradomicílio de um apenas. *Lu. whitmani* foi capaz de se infectar com *Le. Braziliensis* e *Le. Amazonenses*. Para fonte alimentar foram identificados os seguintes hospedeiros: equino (9,0%), humano (1,4%), cão (27,4%), roedor (3,3%), galinha (20,9%) e porco (37,9%). Conclusão. Todos os elementos da cadeia epidemiológica das leishmanioses estavam presentes na área do presente estudo, tanto no peridomicílio como no extradomicílio, o que explica a situação endêmica da doença na região.

Palavra-chaves: Leishmaniose tegumentar; leishmaniose cutânea; leishmaniose visceral; Vetor biológico; Infecção natural, Fonte alimentar; Taxa de risco.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of neglected infectious and parasitic diseases, with major repercussions at global and national level. In the State of Maranhao, both the American Cutaneous Leishmaniasis (LTA) and the American Visceral Leishmaniasis (LVA) are endemic and have great prominence at the national scene. Within the state territory, one of the leading regions is the Lençóis Maranhenses National Park - PNLN, whose surroundings have undergone environmental and ecological damage caused by man, resulting from direct and indirect tourism activities. As a result of this process every year are recorded cases, mostly LTA ones. **Goals.** Facing such reality, this study aimed: **to define** the epidemiological profile of the LTA between the years 2007 and 2013, taking into account demographic (age and gender), occupational and chronological features of the affected populations (reported cases); **to demonstrate** through a cartographic tool, a survey of the timeline distribution of cases of LTA; and an interactive map to determine the risk rate for acquisition of LT. It has been also proposed to study the transmission cycle of the disease, based on the identification of species of sandflies, their sources of blood and their Leishmania genus parasites, and additionally determining vector capacity of *Lu. Whitmani* toward *Le. Braziliensis* and *Le. Amazonians*. **Methodology.** The county of Barreirinhas was selected for this study because it is the main gateway to PNLN. In short, investigation of LTA cases was carried out in SINAN files, comprising all neighborhoods of the county (158), through the cycle 2007-2013, and sandflies collections were held in 62 of these communities. The species were identified taxonomically and females analyzed at the molecular level to research for natural infection by Leishmania, along with the animals that served as a food source. **Results.** 458 positive cases of LTA were reported between the years 2007 and 2013, predominantly in men from rural areas and farmers. The cases were concentrated in the south central area of the county, all year round. There was some geographic expansion with the emergence of new outbreaks, however, it was observed the persistence of the former areas of occurrence of the disease. As for the risk rates, villages Sítio Barra, Engenho and Manoelzinho were those who were positive for all variables. On the other side, the communities Quebra, Santa Rosa and Fumaça, presented less risk, since almost all the variables studied were negative for these locations. As for the sandflies, 9,853 specimens of 18 species have been collected, all present in extra-domicile (forest) and only 12 occurring in peri-domicile areas. The incidence was higher in areas surrounding dwellings (56.2%) than in extra-domicile environment (43.8%) and females predominated (51.4%) over males (48.6%). The dominant species were *Lu. whitmani* (53.83%), *Lu. longipalpis* (25.60%), *Lu. Lenti* (11.69%), *Lu. evandroi* (5.50%) and *Lu. flaviscutellata* (0.87%). Natural infections due to *Le. infantum*, were found in females captured in peri-domicile in five villages and extra-domicile in other two. The species *Lu. longipalpis*, vector of *Le. Infantum*, indicated a positivity rate of 3.7% for this species. While species not considered insect vector of this leishmania, such as *Lu. Lenti* and *Lu. Whitmani*, even so presented infection rates of 0.6% and 0.9%, respectively. Rates of natural infection due to *Le. braziliensis*, were detected in peri-domicile in two locations; while in *Lu. Whitmani*, considered the vector of this Leishmania species, rate of 0.3% was found. The rate of infection due to *Le. amazonensis* was 8% for *Lu. Flaviscutelata*, captured in peri-domicile in two villages and extra-domicile in just one. *Lu. whitmani* was able to get infected with *Le. Braziliensis* and *Le. Amazonians*. Concerning food source hosts, the following were identified: equines (9.0%), human (1.4%), canine (27.4%), rodent (3.3%), fowl (20.9%) and hogs (37.9%). **Conclusion.** All elements of the epidemiological chain of Leishmaniasis were present within the area of study, both in peri-domicile and extra-domicile areas, which explains the endemic state of the disease in the region.

Word-key: Leishmaniasis cutaneous; Cutaneous leishmaniasis; visceral leishmaniasis; biological vector; Natural infection, food supply; Risk rate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de <i>Leishmania spp.</i> Fonte: Teixeira <i>et al</i> (2013).....	20
Figura 2: Localização do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses e os Municípios que o compõem. Adaptado de Ulisses Denache Vieiras (cedido pelo autor em janeiro de 2014).....	40
Fig. 1. (capítulo I): Amplification products for the genus <i>Leishmania</i> performed in <i>Lutzomyia whitmani</i> females fed on mice infected with <i>Leishmania braziliensis</i> . Column 1: negative control; columns 2, 3, 4, 6, 7 and 9: positive females; columns 5 and 8: negative females; column 10: positive control; column 11: molecular weight marker.....	80
Fig. 2. (capítulo I): Amplification products for the genus <i>Leishmania</i> performed on <i>Lutzomyia whitmani</i> females fed on mice infected with <i>Leishmania amazonensis</i> . Column 1: molecular weight marker; column 2: negative control; columns 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13 and 15: positive females; columns 9, 11, 14 and 16: negative females; column 15: positive control.....	80
Figura 1: (capítulo II): Mapa do estado do Maranhão, Brasil, mostrando o município de Barreirinhas, onde realizamos o presente estudo.....	105
Figura 2: (capítulo II): Gel de poliacrilamida 5%, corado com nitrato de prata, mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição <i>HaeIII</i> . Canaletas: M – marcador de peso molecular (100pb); 1-12 (Fêmeas positivas de <i>Lutzomyia</i> do estudo): 1-3 – <i>Leishmania infantum</i> (<i>Lu. longipalpis</i>); 4 – <i>Leishmania brasiliensis</i> (<i>Lu. whitmani</i>); 5-6 – <i>Leishmania linfantum</i> (<i>Lu. lentis</i>); 7-12 – <i>Leishmania infantum</i> (<i>Lu. whitmani</i>); La – controle positivo de <i>Leishmania amazonensis</i> (IFLA/BR/1967/PH8); Lg – controle positivo de <i>Leishmania guyanensis</i> (MHOM/BR/1975/M4147); Lb – controle positivo de <i>Leishmania braziliensis</i> (MHOM/BR/1975/M2903); Ll – controle positivo de <i>Leishmania lainsoni</i> (MHOM/BR/81/M6426); Ls – controle positivo de <i>Leishmania shawi</i> (MCEB/BR/1984/M84408); Ln – controle positivo de <i>Leishmania naiffi</i> (MDAS/BR/1979/M5533); Li – controle positivo de <i>Leishmania infantum</i> (MHOM/1973/BH46).....	106
Figura 1. (capítulo III): Mapa do estado do Maranhão, Brasil, mostrando o município de Barreirinhas, onde realizamos o presente estudo.....	129
Figura 2. (capítulo III): Média e desvio padrão do número de casos de LTA por mês no município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de 2007 a 2013.....	133
Figura 3. (capítulo III): Número de casos de LTA em lavradores por mês no município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de 2007 a 2013.....	134

Figura 4. (capítulo III): Distribuição e evolução dos casos de LTA no espaço geográfico do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão de 2007 a 2013.....	134
Figura 5. (capítulo III): Riqueza e distribuição das espécies de flebotomíneos encontradas por povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, Brasil, de setembro de 2012 a agosto de 2015.....	136
Figura 6. (capítulo III): Mapa do município de Barreirinhas mostrando as taxas de risco de Leishmaniose Tegumentar Americana no período de 2012 a 2015.....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> que infectam o homem.....	17
Tabela 1 (capítulo II): Números de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados nos povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de setembro de 2012 a agosto de 2015.....	102
Tabela 2 (capítulo II): Taxa de positividade para <i>Leishmania</i> por espécie de flebotomíneos capturados, nos povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de setembro de 2012 a agosto de 2015.....	103
Tabela 3 (capítulo II) : Espécies de flebotomíneos e suas respectivas fontes alimentares, como mostradas pelos perfis de restrição do fragmento amplificado do gene do <i>cyt b</i> , de sangue diferentes animais, depois de digerido com a endonucleases <i>HaeIII</i> e/ou <i>MboI</i> , do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de Setembro de 2012 a Agosto de 2015.....	103
Tabela 1. (capítulo III): Correlação dos números de casos de LTA, de acordo com os gêneros, faixas-etárias, ocupações e localidades de procedência dos indivíduos acometidos, no município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de 2007 a 2013 de acordo com fatores analisados.....	132
Tabela 2 (capítulo III): Números de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados nos povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de setembro de 2012 a agosto de 2015.....	137

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
1. REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 Leishmanioses	15
1.2 Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> spp.	18
1.3 Leishmaniose Visceral e Tegumentar	21
1.4 Flebotomíneos	30
1.5 Fonte Alimentar de Flebotomíneos	33
1.6 O uso das ferramentas da Biologia Molecular na identificação da infecção de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	36
1.7 O Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses e as Leishmanioses no seu entorno	38
Referências	43
2 JUSTIFICATIVA	76
3 OBJETIVOS	77
3.1 Objetivo Geral	77
3.2 Objetivos específicos	77
4 ARTIGOS PRODUZIDOS	79
Capítulo I	79
Capítulo II	83
Capítulo III	125
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	160

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho relata dados científicos acerca das características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) na região do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, onde, para isso, fizemos um levantamento da ocorrência de casos por povoado dos últimos sete anos, além de inquérito entomológico para obter dados ecológicos e geográficos da fauna de flebotomíneos da área, além de estudos utilizando técnicas moleculares para detecção das espécies de leishmânias presentes nesses flebotomíneos capturados e suas fontes alimentares sanguíneas.

Todos os povoados estudados foram devidamente georreferenciados caracterizados quanto a alguns fatores ambientais considerados importantes para o ciclo de transmissão da doença e esses dados estão sendo compilados em um banco de dados que está alimentando um programa que irá nos fornecer dados espaciais quanto ao risco da LTA nessa região.

Por último, fizemos experimentos para testar a capacidade vetorial da espécie de flebotomíneo mais abundante na região, o *Lutzomyia whitmani*, quanto à infecção por *Leishmania braziliensis* e *Le. amazonensis*, que são as duas espécies causadoras de leishmanioses tegumentar. Todos esses dados obtidos acerca da LTA originaram três artigos descritos abaixo:

Artigo I – Infecção Experimental de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) com *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana. Este artigo foi publicado no **Journal of Medical Entomology** cuja versão está apresentada no **capítulo I** deste documento.

Artigo II – Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural e da fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) provenientes da Região do Parque

Nacional dos Lençóis Maranhenses. Este manuscrito está preparado nos moldes da Revista **Journal of Medical Entomology** e está apresentada no **capítulo II** deste documento.

Artigo III – Estudo epidemiológico e banco de dados espacial para análise de risco da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses. Este manuscrito está preparado no modelo da Revista **Acta Tropica** para publicação, estando apresentado no **capítulo III** deste documento.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses constituem doenças infecto - parasitárias cujos agentes etiológicos são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) transmitidos por flebotomíneos (Diptera, Psychodidae). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas antropozoonoses e integram o conjunto das seis doenças tropicais mais importantes no Velho Mundo e nas Américas (Desjeux, 2004; Guerra *et al.* 2007).

Apresentam-se como importantes doenças negligenciadas, tanto pelas altas taxas de prevalência, estimando-se que cerca de 14 milhões de pessoas estejam infectadas e que cerca de 350 milhões estejam em situações de risco de infecção, quanto pela sua grande distribuição geográfica, uma vez que estão distribuídas nos cinco continentes (Europa, África, Ásia, América e Oceania) sendo registradas em 98 países em desenvolvimento ou mesmo desenvolvidos (Alvar *et al.* 2012; WHO 2013).

São doenças infecto-parasitárias que podem assumir tanto um caráter zoonótico, envolvendo animais domésticos ou silvestres como reservatórios, com incidência nas Américas, Europa, África, Região do Mar Mediterrâneo e China, quanto um caráter antroponótico, com transmissão restrita aos seres humanos, ou seja, esses funcionando como próprios reservatórios, cujos focos se restringem aos países como Índia, Bangladesh, Nepal e oeste da África (Monteiro *et al.* 2005; Alvar *et al.* 2012).

Causada por protozoários digenéticos, pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, apresentam uma gama de hospedeiros vertebrados mamíferos: canídeos, roedores, edentados (tatu, preguiça e tamanduá), marsupiais (gambás), primatas não humanos e o próprio homem (Brasil, 2007). O gênero é subdividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, baseado no desenvolvimento dos parasitos no interior do

aparelho digestório do inseto vetor. O desenvolvimento das espécies do subgênero *Leishmania* é restrito ao trato digestório médio e anterior, enquanto que o desenvolvimento das espécies do subgênero *Viannia* mostra uma fase que se passa no intestino posterior (Lainson *et al.* 1979; Lainson *et al.* 1987; Lainson, 2010).

As leishmanioses podem manifestar-se clinicamente nas formas visceral e tegumentar, dependendo da interação agente-hospedeiro e da saliva do vetor modulando a resposta deste (Sacks & Kamhawi, 2001). A forma tegumentar pode afetar a pele (cutânea) e acometer a mucosa. As lesões se expandem, podendo provocar mutilações irreversíveis, caso não ocorra a medicação necessária (Gontijo & Carvalho, 2003). A forma visceral acomete os órgãos internos, como baço e fígado, e também é bastante grave, podendo se tornar fatal, na ausência de tratamento (Gontijo & Melo 2004).

O gênero *Leishmania* compreende aproximadamente 30 espécies (Tabela 1), das quais cerca de 20 são patogênicas para a espécie humana (Lainson & Shaw, 1998; Ashford, 2000; Desjeux, 2004; Ready, 2013). A Leishmaniose Visceral (LV) é causada pelas espécies *Le. (Leishmania.) donovani* e *Le. (L.) infantum* e a Leishmaniose Tegumentar (LT) é 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 *Leishmania. (L.) mexicana* e por espécies do subgênero *Viannia*: *Le. (V.) 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 & Scott, 2011).

Tabela 1: Principais espécies de *Leishmania* que infectam o homem, distribuição continental e formas clínicas.

Espécies	Forma Clínica
Novo e Velho Mundo – Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf^o 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
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>Le. (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

A LTA tem apresentado um aumento do número de casos e ampliação de sua ocorrência geográfica nos últimos 20 anos. É encontrada, atualmente, em todos os estados brasileiros, tornando-se uma das infecções dermatológicas mais importantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que pode acarretar. Manifesta-se sob diferentes perfis epidemiológicos e padrões de transmissão em decorrência das modificações socioambientais (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2004;

Andrade *et al.* 2007; Dias *et al.* 2007; Neves *et al.* 2002). Variações cíclicas na incidência da LTA podem ser fortemente influenciadas por fatores geográficos e climáticos, responsáveis pelas flutuações nas populações de febotomíneos (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2004; Dias *et al.* 2007).

Surtos desta doença podem ser associados à derrubada de matas para construção de estradas e criação de povoados em regiões pioneiras. Desta forma, a LTA é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode atingir o homem ao entrar em contato com os focos zoonóticos. Também pode ocorrer a transmissão em áreas de preservação e parques ecológicos, muito procurados por pessoas para lazer e turismo (Cruz *et al.* 2010).

1.2. Ciclo Biológico de *Leishmania* spp.

Os flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Sherlock, 2003), constituem um grupo de insetos responsável pela transmissão das leishmanioses, cujo hábito hematófago é restrito às fêmeas, que utilizam o sangue como fonte de proteínas e aminoácidos, necessários à maturação dos óvulos e ao desenvolvimento dos ovos (Rebêlo, 1999). Em geral, a atividade desses insetos é predominantemente crepuscular ou noturna, isto é, as fêmeas picam seus hospedeiros sanguíneos (mamíferos, aves e répteis) no crepúsculo vespertino, durante a noite e ao amanhecer, permanecendo a maior parte do tempo durante o dia em lugares sombrios e úmidos, protegidos do vento, da insolação e de predadores naturais (Rebêlo, 1999). Algumas espécies, contudo, são ativas no período diurno, podendo, inclusive, praticar a hematofagia, sobretudo em ambientes com pouca luminosidade como em áreas florestais (Rêbello, 1999; Brazil & Brazil, 2003) e cavernas (Galati *et al.* 2003).

As fêmeas infectadas regurgitam no hospedeiro vertebrado formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania*. Estas apresentam duas formas básicas principais: promastigota encontrada no trato digestório dos flebotomíneos vetores e amastigota, parasita intracelular obrigatório de células do sistema monocítico fagocitário (Bates, 2007).

O ciclo biológico das *Leishmania* é um processo complexo e não inteiramente esclarecido, envolvendo mudanças comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, diferindo entre as espécies do parasito (Ready, 2013).

De acordo com Teixeira *et al.* (2013) e ilustrado na **Figura 1**, a infecção do flebotomíneos (1) ocorre durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea pica um hospedeiro infectado e ingere células sanguíneas e outras células, especialmente macrófagos, contendo formas amastigotas (2). No trato digestório do vetor, ocorre o rompimento da membrana dos macrófagos e os parasitos são liberados (3). Na região anterior do trato digestório, ocorre a transformação das amastigotas em promastigotas procíclicos (4), 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 (5). Após a divisão, migram para a região anterior do intestino até a válvula estomodeal (6), onde se concentram e sofrem um processo de diferenciação, denominado de metaciclogênese (Sacks & Perkins, 1984). 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 metacíclicos. Ao danificar a válvula estomodeal pela ação da quitinase (Rogers *et al.* 2008) e pelo bloqueio físico do intestino anterior devido a produção de proteofosfoglicanos filamentosos pelas formas promastigotas (Rogers *et al.* 2004), as formas metacíclicas migram para a probóscide e são regurgitadas e transmitidas ao hospedeiro vertebrado através da picada, onde recomeça o ciclo.

A infecção do homem e outros vertebrados ocorrem quando a fêmea infectada do flebotomíneo (7) pica o mamífero, regurgitando formas promastigotas metacíclicas (8) durante o repasto sanguíneo que penetram na pele do hospedeiro, aderindo e invadindo macrófagos (9). A forma metacíclica no interior do vacúolo parasitóforo começa a se diferenciar (10) em amastigota (11) (Stuart *et al.* 2008) aderindo ao vacúolo parasitóforo e multiplicando-se por divisão binária (12) até ocupar grande parte do citoplasma (13). Em seguida, a membrana do macrófago se rompe liberando os amastigotas (14) no tecido que poderão invadir novos macrófagos (15) ou serem ingeridos por uma nova fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo.

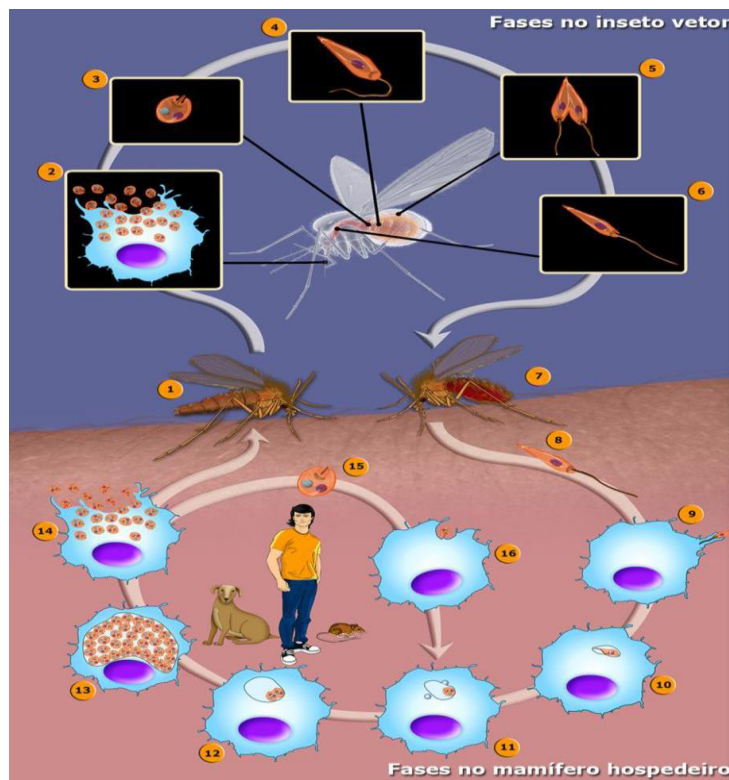


Figura 1: Ciclo de *Leishmania* spp. Fonte: Teixeira *et al* (2013).

1.3. Leishmaniose Visceral e Tegumentar

A LV é uma doença negligenciada endêmica em aproximadamente 88 países, com uma estimativa de incidência de 500.000 novos casos e 59.000 mortes anualmente (WHO, 2010). A LV apresenta uma ampla distribuição geográfica sendo encontrada na Ásia, Europa, Oriente Médio, África, e nas Américas. Nas Américas, a doença é também chamada de leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar (Brasil, 2003). A LVA é uma zoonose de evolução crônica de grande importância epidemiológica nas Américas, sobretudo no Brasil, devido a sua alta incidência, ampla distribuição e gravidade, pois se não tratada adequadamente leva o paciente ao óbito (Gontijo & Melo, 2004).

Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo o Brasil, o que notifica o maior número de casos, onde a doença é considerada endêmica, pois atinge as cinco regiões brasileiras, com a ocorrência de casos humanos em 24 estados (Queiroz *et al.* 2012).

Associado ao seu espectro de morbidade, esta zoonose é causada por um protozoário de ciclo biológico complexo, o que a torna uma enfermidade de grande magnitude e de baixa vulnerabilidade às atuais medidas de controle. A escassez de recursos e a atual falta de infraestrutura dos serviços de saúde, especialmente no que concerne ao diagnóstico da infecção por *Le infantum chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), na população canina e humana, tornam as atuais medidas de controle pouco factíveis. Esse quadro vem se constituindo como um paradigma, favorecendo a perpetuação do ciclo vicioso entre pobreza e doença em muitos estados brasileiros, nos quais a LVA permanece como mais uma doença negligenciada. Em resposta a este cenário desfavorável, têm sido empreendidos vários esforços na tentativa de definir uma nova abordagem mais efetiva para o controle da doença no Brasil (Costa & Vieira, 2001).

Atualmente, a LVA é considerada endêmica em 19 estados do país, destacando-se aqueles da região Nordeste, responsáveis pela maior parte dos casos notificados. Sobretudo nos últimos 20 anos, a doença difundiu-se e tornou-se cada vez mais comum em áreas urbanas ou periurbanas (Silva *et al.* 2001).

A primeira grande epidemia urbana do Brasil concentrou-se em Teresina (PI), capital do Piauí. Mais tarde a doença foi localizada, em Natal (RN) e São Luís (MA), e, posteriormente, se espalhou para outras regiões do país (Werneck, 2010).

Desde então, várias cidades brasileiras vêm apresentando, de forma preocupante, mais casos autóctones da doença ao longo das últimas décadas. A doença alcançou áreas Centrais do Brasil, como a região Centro-Oeste, apresentando casos em Campo Grande (MS), Várzea Grande (MT), região Sudeste: Araçatuba e Bauru (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Montes Claros, Paracatu e Belo Horizonte e Governador Valadares (MG), e chegou até no estado do Rio Grande do Sul onde em 2009, foi detectado o primeiro caso da doença neste estado, o que coloca a LV como uma doença emergente e reemergente no Brasil (Brasil, 2003; Alves & Bevilacqua, 2004; Maia-Elkhoury *et al.* 2008; Brasil, 2011).

No período de 2000 a 2011 a Região Nordeste foi a que registrou o maior número de casos humanos. Foram 23.659 confirmações, que corresponderam a 56,0% dos casos totais no país, e desses 6.514 ocorreram no Estado do Maranhão, sendo a primeira proporção mais elevada da Região Nordeste, com 28,0% dos casos, seguida pelo Estado do Ceará com 5.106 (22,0%) casos e o Estado da Bahia com 4.489 (19,0%) dos casos registros (Brasil, 2011)

No Maranhão, o paradigma da endemia rural é substituído pelo da doença associada a modificações ambientais, à ocupação desordenada do espaço urbano e às precárias condições de vida da população exposta ao risco. Logo, seja no espaço rural ou urbano, a

LVA amplia sua área de ocorrência, ultrapassando antigos limites geográficos definidos e tornando-se um sério problema de saúde pública em praticamente todo território (Brasil, 2015; Mendes et al., 2002)

Os índices de mortalidade só tendem a aumentar, uma vez que grande parte de pessoas têm poder aquisitivo baixo, não tendo acesso aos métodos de diagnóstico e tratamentos específicos, o que reforça a hipótese de que essa classe da população torna-se mais vulnerável à doença (Gontijo & Melo, 2004).

O quadro clínico da LVA se agrava principalmente quando está associado com a desnutrição e a infecção pelo vírus HIV, contribuindo para o aumento da mortalidade. Além disso, as crianças são um público especialmente afetado pela doença nas regiões endêmicas. Os sintomas mais comuns da LVA humana são fraqueza, perda de peso, febre intermitente, anemia, anorexia, pancitopenia e esplenomegalia com ou sem hepatomegalia (WHO, 2010).

No ciclo enzoótico silvestre, a cadeia de transmissão envolve espécies de canídeos silvestres como *Dusicyon vetulus*, *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* como reservatórios primários e possivelmente outros mamíferos silvestres, como o marsupial do gênero *Didelphis* (Deane, 1956; Sherlock *et al.* 1984; Braga *et al.* 1986).

O cão (*Canis familiaris*) é o reservatório doméstico da doença no ambiente urbano (Gontijo & Melo, 2004). Este animal, por apresentar intenso parasitismo na pele, é altamente eficiente na manutenção do parasito nos focos endêmicos, favorecendo dessa forma a infecção dos vetores (Moreno & Alvar, 2002).

Em relação aos vetores, as espécies de flebotomíneos *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lainson 1983; Lainson & Shaw 2005; Shaw & Lainson 1987) e *Lu.* (*Lutzomyia*) *cruzi* constituem os principais vetores da LVA zoonótica no Brasil (Santos *et al.* 1998). A espécie *Lu. cruzi* foi incriminada como vetora da *Le. i. chagasi* em Mato Grosso do Sul, pois

na região de Corumbá não ocorria *Lu. longipalpis* no período estudado, aliado ao fato de que o flebotomíneo foi encontrado com infecção natural por *Le. i. chagasi*, agente etiológico da LVA (Santos *et al.* 1998).

A urbanização é um aspecto de grande importância a ser considerado na disseminação da LVA. A mudança epidemiológica que ocorreu na ecologia da LVA, favorecendo a ocorrência da doença em áreas rurais e periférica de centros urbanos está associada principalmente a ação do homem, atuando diretamente sobre o meio ambiente, a migração de pessoas infectadas da área rural para periferia das cidades, contribuindo como fonte de infecção de indivíduos suscetíveis e a adaptação de espécies de flebotomíneos ao ambiente modificado pelo homem (Harhay *et al.* 2011).

A domiciliação do principal vetor, *Lu. longipalpis*, parece ser estimulada por fatores como a destruição de ecótopos silvestres, pela oferta de fontes alimentares animais e humanas, além da arborização abundante em quintais, acúmulos de lixo e a presença de abrigos de animais silvestres dentro do perímetro urbano, facilitando o aparecimento de criadouros, o que aumenta a probabilidade do surgimento de novos surtos em áreas endêmicas, bem como sua propagação para novos locais no país (Costa *et al.* 1995).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é caracterizada pela produção de lesões cutâneas de diversos tipos, acometendo pele e mucosa. Possui alta incidência anual com novos casos variando entre 0.7 a 1.3 milhões no mundo (Alvar *et al.* 2012). No homem as formas clínicas de LT, que nas Américas é genericamente chamada de LTA, incluem desde quadros assintomáticos a formas tegumentares de gravidade variável, com formação de um nódulo cutâneo pruriginoso o qual evolui para uma úlcera pouco dolorosa, oval ou arredondada, rasa e com os bordos elevados. O tamanho da úlcera é variável desde alguns milímetros até mais de 10 centímetros.

A LTA pode ser apresentar ainda em algumas formas de acordo com características das lesões de pele como forma localizada, forma disseminada e forma difusa. A forma localizada pode ser única ou múltipla, a lesão mais comum se apresenta ulcerada com bordas e fundo granuloso que pode ser seco ou exsudativo. Pode ocorrer variabilidade na apresentação com formação crostosa ou verrucosa. Nestas apresentações, na fase inicial, é frequente a linfagite, que pode preceder a lesão. A forma cutânea disseminada apresenta-se com numerosas lesões pequenas ulceradas e, às vezes, acneiformes. Na forma difusa observa-se poucas lesões ulceradas, caracterizadas por extensas lesões infiltrativas na derme. Estas lesões começam como máculas e progridem para lesões nodulares que se disseminam por todo o corpo. A face, o pavilhão auditivo e os membros são os locais mais acometidos pela forma difusa.

A LTA foi tradicionalmente caracterizada como uma zoonose, com o homem sendo infectado após se encontrar exposto aos ciclos de transmissão silvestre. Este padrão epidemiológico sofreu mudanças, demonstradas por um crescente número de casos de leishmaniose humana, na América. A urbanização e alteração do ecossistema onde a transmissão ocorre são os principais fatores que contribuíram para a expansão da doença (Desjeux, 2001). Tanto a diversidade genética das leishmânias, como a resposta imune diferenciada do hospedeiro à infecção influenciam a forma clínica da doença (Cunningham, 2002). Por isso características como o tipo de lesão e o conhecimento dos agentes etiológicos de cada região podem colaborar com o diagnóstico da doença (Lainson & Shaw, 1987).

No Brasil, ao analisar a evolução da LTA, observa-se que entre 1980 a 2010, ocorreram 702.839 casos da doença em território nacional, sendo que na década entre 1980 a 1990 ocorreram 153.289 casos de LTA no Brasil com prevalência de casos nos anos de 1987, 1988 e 1990, com 26.253, 25.153 e 24.753 casos, respectivamente. Entre 1991 a 2000,

ocorreram 300.716 casos no Brasil, com aumento de 49,02% em relação à década anterior; com prevalência de casos nos anos de 1994, 1995 e 2000, com 35.103 casos, coeficiente de detecção 22,8; 35.103 casos, coeficiente de detecção 22,9; e 33.720 casos, coeficiente de detecção 20,3; respectivamente. De 2001 a 2010 ocorreram 248.834 casos no Brasil, com queda de 17,25% em relação à década anterior, com prevalência de casos nos anos de 2001, com 26.636 casos, coeficiente de detecção 15,5; 2002 com 28.361 casos, coeficiente de detecção 16,2; 2003 com 30.814 casos, coeficiente de detecção 17,4 e 2004, com 28.737 casos e coeficiente de incidência 16,0 (Ministério da Saúde, 2013).

Na Região Nordeste, ocorreu o maior número de casos de LTA no período de 1980 a 1996, com cerca de 37,6% das notificações (11.303 casos) (Fundação Nacional de Saúde, 1999) e entre 1997 e 2002, com 37,1% (67.836 casos) (Ministério da Saúde, 2004). De 2003 a 2014, foram notificados nesta região 84.433 casos de LTA, representando 30,5% dos registros desta doença feitos no Brasil, perdendo apenas para a região Norte que registrou no mesmo período 117.700 casos (Ministério da Saúde, 2016). O aumento do número de casos da doença nesta região pode ser explicado por fatores socioeconômicos, como condições de habitação, pobreza, processo de migração e falta de saneamento básico. (Brasil, 2006; Brasil, 2007; Costa, 2005). Além disso, é importante levarmos em consideração a melhoria no diagnóstico e na notificação dos casos, o controle inadequado do inseto vetor, o aumento da detecção de LTA associada a infecções oportunistas (como exemplo a AIDS) e o aparecimento de resistência aos medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses (Reithinger *et al.* 2007).

Nesse contexto, o Maranhão tem um destaque importante na região, pois foi o Estado que mais contribuiu nos períodos de 1980 a 1996 e 1997 e 2002, com 33,6% e 36,04%, respectivamente (Fundação Nacional de Saúde, 1999; Ministério da Saúde, 2004). Em 2003,

foi o segundo maior em registros de casos do país, sendo notificados 3.988 casos de LTA (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005). Nos 10 anos seguintes, de 2004 a 2014, o Maranhão vem apresentando uma média de 2.347 casos por ano, perdendo apenas, na maioria dos anos, para o Estado do Pará e do Mato Grosso em número de casos notificados (Ministério da Saúde, 2016).

Um dos fatores que pode explicar essa situação da LTA no Maranhão é a sua posição geográfica, pois se localiza numa área de transição entre duas macrorregiões que caracterizam o Brasil, pelo lado oeste a floresta amazônica úmida e, pelo lado leste, as savanas do nordeste seco (Rêbello *et al.* 1999).

Na Amazônia do Maranhão, há muito se conhece a existência de áreas endêmicas de leishmanioses (Rêbello *et al.* 2000). Silva *et al.* (1979) estudaram um surto com 300 casos de LTA, ocorridos em área de colonização recente para implantação de projetos agropecuários e núcleos populacionais em Buriticupu, sabendo-se atualmente que esse é o Município de maior prevalência da doença no Estado (Martins *et al.* 2004). Rebêlo *et al.* (1996) relataram a presença de diversas espécies de flebotomíneos como potenciais agentes transmissores da doença nesta região.

No Cerrado e, principalmente, no Litoral Nordeste do Estado do Maranhão, não existem estudos feitos sobre a LTA, tendo-se conhecimento apenas de trabalhos sobre os flebotomíneos vetores realizados na região do Baixo Parnaíba (Rebêlo *et al.* 1999; Bernal & Rebelo, 2003). Contudo, é preciso salientar que, na região Litoral Nordeste, se localiza um dos pólos de LTA do Estado (Vigilância e Monitoramento da Leishmaniose Tegumentar Americana em Unidades Territoriais – Brasil, 2002), o MA4, composto por onze municípios, destacando Barreirinhas, Santo Amaro e Primeira Cruz como os que fazem parte do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses (PNLM), região que passa por recente processo de

especulação imobiliária e expansão dos núcleos populacionais. Esse fato é observado, sobretudo, em Barreirinhas, área de entorno do PNLM, onde, na década de 90, ocorreu um aumento de 77,5 % da população urbana, enquanto o aumento da população total foi de 33,4% (Atlas do desenvolvimento humano no Brasil, 2000).

De acordo com Gontijo & Carvalho (2003), Lainson & Shaw (2005) e Cruz (2010) até o momento sete espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas, no Brasil, como causadoras de LTA humana. São elas:

**Le. (V.) guyanensis*: de grande relevância, principalmente em função da sua alta frequência na região Amazônica, na margem norte do Rio Amazonas no Brasil (Amazonas, Pará, Amapá e Roraima), nas Guianas, Peru, Equador, Venezuela e Colômbia (Davies *et al.* 2000). Causa predominantemente úlceras cutâneas, únicas ou múltiplas, devido a picadas simultâneas de flebotomíneos ou de metástases linfáticas secundárias (Dedet, 1990). O risco de infecção está associado ao ciclo silvestre. A doença ocorre com frequência em indivíduos que exercem atividades profissionais em matas, muitas vezes apresentando um caráter ocupacional. Os reservatórios são desdentados e marsupiais, como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), e o gambá (*Didelphis albiventris*). As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são: *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani*, sendo o primeiro incriminado como o principal vetor.

**Le. (V.) naiffi* que ocorre nos Estados do Pará e Amazonas, e na Guiana Francesa, tendo o tatu (*Dasypus novemcinctus*) como reservatório natural. O parasita causa LTA de evolução benigna e seus principais vetores são *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis*, *Lu. ayrozai*, que apresentam antropofilia e cujos hábitos zoofílicos são pouco conhecidos (Lainson & Shaw, 2005).

**Le. (V.) shawi*: responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará, e tem

como reservatórios vários animais silvestres como macacos (*Cebus apella*), preguiças (*Choloepus didactylus*), sendo o vetor *Lu. whitmani*, que tem como habitat natural, troncos de árvores em florestas primárias (Lainson & Shaw 2005).

**Le. (V.) lainsoni*: registrada na Amazônia, sendo descrita no Pará, Peru e Bolívia. Como hospedeiro suspeito de reservatório natural tem a paca (*Agouti paca*) e como único vetor conhecido, a *Lu. ubiquitalis*, causando leishmaniose cutânea (Camargo & Basano 2004; Lainson & Shaw 2005).

**Le. (V.) lindenbergi*: presente em Belém (PA). Até o momento foi isolada somente de casos humanos, e o provável vetor envolvido é *Lu. antunesi* (Lainson & Shaw, 2005).

**Le. (V.) braziliensis*: é a espécie mais prevalente no homem no Brasil e pode causar lesões cutâneas e mucosas. A *Le. (V.) braziliensis* foi a primeira espécie descrita e determinada como agente etiológico da LTA. Apresenta ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina, sendo observada em todas as áreas endêmicas do País, de norte ao sul, tanto em áreas de colonizações antigas, onde o ambiente se encontra bastante modificado, assumindo características epidemiológicas distintas no decorrer do tempo, devido à larga distribuição de espécies de flebotomíneos vetores (Andrade-Filho *et al.* 2007). Está associada à presença de animais silvestres ou domésticos. Tem sido descrita nos estados da Rondônia, Amazonas, Pará, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Grisard *et al.* 2000; Silva, 2005; Pita-Pereira *et al.* 2009). A transmissão está associada principalmente aos seguintes vetores: *Lu. wellcomei*, em áreas silvestres dos estados do Pará, Amazonas e Ceará; *Lu. whitmani*, em áreas de cerrado e caatinga nos estados do Ceará, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco;

Lutzomyia intermedia e provavelmente *Lu. migonei* e *Lu. fisheri*, nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Marzochi & Marzochi, 1994); e *Lu. pessoai* no Rio Grande do Sul (Porto Alegre) (da Silva & Grunewalde, 1999). *Le. braziliensis* já foi isolada de roedores silvestres (*Akodon* sp., *Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*, *Oryzomys* sp.) e sinantrópicos (*Rattus rattus*), felídeos (*Felis catus*), canídeos (*Canis familiaris*), eqüídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) e marsupiais (*Didelphis* sp.). O papel desempenhado por estes mamíferos no ciclo de transmissão da doença ainda é incerto, contudo há evidências de que os roedores silvestres seriam os prováveis reservatórios primários (Brasil, 2007; Camargo & Basano, 2004; Silva, 2005; Lainson & Shaw, 2005).

*Apenas uma espécie do subgênero *Leishmania*, a *Le. (L.) amazonensis* é considerada agente etiológico da LTA no Brasil. A infecção ocorre em diferentes regiões do país, distribuindo-se principalmente na região Norte, Amazônia, Pará e Rondônia; Nordeste, Maranhão e Bahia; Sudeste em Minas Gerais, no Centro-Oeste em Goiás e Mato Grosso do Sul (Lainson & Shaw, 2005; Dorval *et al.* 2006), e no Sul foi reportada no Paraná (Silveira *et al.* 1990; Silveira *et al.* 1999) e Santa Catarina (Grisard *et al.* 2000). É responsável pela leishmaniose cutânea e leishmaniose cutâneo difusa anérgica. Geralmente a transmissão está associada à presença de roedores silvestres (*Proechimys* sp., *Oryzomys* sp., *Nectomys* sp. e *Dasyprocta* sp.) marsupiais (*Metachirus* sp., *Didelphis* sp., *Philander* sp. e *Marmosa* sp.) e a raposa (*Cerdocyonthus thous*). Os principais vetores são *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca nociva* e *Lu. reducta* (Camargo & Basano, 2004; Silva, 2005; Brasil, 2006).

1.4. Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos da ordem Diptera, família Psychodidae e popularmente são conhecidos como mosquito palha, tatuquiras ou birigui dependendo da região em que se

encontram (Rebêlo, 1999). Morfologicamente são insetos de pequeno porte (2 a 3mm) e apresentam, em seu corpo, intensa pilosidade (Brazil & Brazil, 2003). Possuem ainda coloração clara e são facilmente reconhecidos por seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas.

O ciclo de vida destes dípteros é caracterizado pela holometabolia, ou seja, compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios que diferem sensivelmente entre si, no que concerne ao tamanho), pupa e adulto (Forattini, 1973).

As fêmeas apresentam um aparelho bucal do tipo sugador-pungitivo adaptado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue (Forattini, 1973). Isso se deve ao hábito hematofágico que essas fêmeas possuem, pois algumas proteínas existentes no sangue dos vertebrados são essenciais para maturação de seus ovócitos. Segundo Brazil (2003), após a hematofagia e a cópula, as fêmeas de flebotomíneos colocam os ovos, que normalmente são elípticos e inicialmente esbranquiçados, mas logo adquirem coloração castanho escuro, sobre um substrato úmido no solo com alto teor de matéria orgânica. A postura é feita isoladamente ou em pequenos grupos de ovos, que ficam aderidos ao substrato graças a uma substância viscosa rica em ácidos graxos liberada no momento da postura.

As larvas são terrestres, pequenas, brancas, de aspecto vermiforme, apresentando no 1º estágio um par de cerdas caudais e nos demais, dois pares. Logo após a eclosão, alimentam-se das cascas dos ovos, dos corpos dos adultos mortos e de outras matérias orgânicas disponíveis (Ferro *et al.* 1997). As pupas têm coloração esbranquiçada ou amarelada, escurecendo progressivamente à medida que se aproxima a eclosão do adulto e possuem uma fenda em forma de T por onde os adultos emergem (Delgado e *et al.* 1993). Não se alimentam e normalmente permanecem imóveis e fixas ao substrato, podendo executar movimentos de flexão e extensão.

Os adultos, ao emergirem da pupa, permanecem por um tempo pouco ativos e o aparelho bucal das fêmeas demora cerca de 24 a 48 horas para amadurecer e tornar-se haptó para a realização do repasto sanguíneo. Desde a eclosão apresentam dimorfismo sexual aparente (Brazil & Brazil, 2003).

Além da hematofagia apresentada pela fêmea, os adultos (macho e fêmea) se alimentam de açúcares (Cameron *et al.* 1995), provenientes de néctar e seiva de plantas, essencial para que estes insetos possam realizar atividades como vôo e cópula.

A maioria dos flebotomíneos possuem hábitos de vida silvestre. Seus principais ecótopos concentram-se na base e na copa das árvores, no chão ou em tocas de animais. Estes variam de acordo com os hábitos alimentares de cada espécie, ou seja, algumas espécies adaptaram-se, ao longo de seu processo evolutivo, a alimentar-se de vertebrados cujos habitats são as copas das árvores, já outras espécies co-evoluíram com animais que vivem no chão ou na base das árvores.

Recentemente, Pessoa *et al.* demonstraram em um monitoramento de espécies realizado na região Amazônica, que as populações de flebotomíneos vem sofrendo um significativo decréscimo em resposta aos constantes desmatamentos que estão ocorrendo na região. Isso acontece pela destruição do habitat natural destes insetos (Pessoal *et al.* 2007), redução da disponibilidade de animais silvestres que servem como fonte de alimento para o inseto e pelo processo migratório que traz para a periferia das cidades, populações humanas de áreas rurais (Costa *et al.* 1990).

Assim, algumas espécies acabaram se adaptando ao ambiente peridomiciliar, podendo ser observados em abrigos de animais domésticos e sob materiais acumulados nos quintais das habitações (Rebêlo, 1999).

Este fato é de grande importância no que diz respeito a doenças infecto – parasitárias, pois os flebotomíneos constituem um grupo de insetos de grande interesse na saúde pública por estarem envolvidos na transmissão das Leishmanioses.

1.5. Fonte Alimentar de Flebotomíneos

Os flebotomíneos, assim como muitos outros dípteros hematófagos, necessitam de suprimentos de carboidratos que, na natureza, adquirem diretamente da seiva de plantas, néctar (Alexander & Usma, 1994), secreções de afídeos e frutas maduras (Cameron *et al.* 1995). Para as fêmeas, esses requerimentos são utilizados como complemento na alimentação sanguínea (Magnarelli & Modi, 1988; Van Handel, 1984). Aliás, a hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas, que necessitam do sangue tão somente para a maturação dos ovários e o obtém sugando diversos vertebrados (mamíferos, aves, répteis e anfíbios).

Com isso, o estudo do conteúdo intestinal de insetos hematófagos vetores de patógenos é de grande importância ecológica e epidemiológica, pois permite verificar o grau de relação do vetor para com o hospedeiro reservatório infectado, levando a compreensão dos vários componentes do ciclo de transmissão. Algumas espécies de flebotomíneos, por exemplo, se alimentam exclusivamente em um vertebrado específico, enquanto outros são oportunistas e se alimentam de vários hospedeiros, incluindo espécies que servem como reservatórios de *Leishmania* (Christensen *et al.* 1982; Meece *et al.* 2005; Oshaghi *et al.* 2006a).

A atração que diferentes animais silvestres e domésticos exercem sobre os flebotomíneos como fonte alimentar constitui-se importante para o conhecimento das relações hospedeiro-vetor nos diversos ambientes, sobretudo em áreas com transmissão de leishmanioses (Fonteles *et al.* 2009).

As ações humanas sobre o meio ambiente atuam na seleção das espécies de flebotomíneos e mamíferos reservatórios de *Leishmania*, permitindo àqueles com maior valência ecológica se adaptarem ao ambiente antrópico. Essas ações parecem favorecer a presença desses insetos e mamíferos no domicílio e peridomicílio, explicando, em parte, a persistência das leishmanioses nesse tipo de ambiente. Além disso, as habitações humanas de má qualidade e em locais inadequados, a construção desordenada de abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar e a carência de condições mínimas de saneamento básico são condições comuns em áreas rurais e periféricas de centros urbanos (Lima *et al.* 2002). Nessas áreas, os mamíferos reservatórios de *Leishmânia* têm sobrevivido e os flebotomíneos têm sido capturados em grande número (Teodoro, 1996) favorecendo a infecção humana e de animais domésticos.

As técnicas de identificação de repasto sanguíneo foram inicialmente baseadas em análises imunológicas (Ngo & Kramer, 2003), utilizando nas décadas de 20 e 40 testes de precipitação para identificar hospedeiros vertebrados (Reeves & Hammon, 1944), de coloração de anticorpo fluorescente dos eritrócitos para detectar o DNA do hospedeiro, na década de 70 (McKinney *et al.* 1972) e início dos anos 80 e 90 ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Hunter & Bayly, 1991, Chow *et al.* 1993) e a difusão em gel de agarose (Srinivasan & Panicker, 1992).

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, estes testes 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).

Recentemente abordagens moleculares, mais sensíveis e precisas, baseadas em técnicas moleculares como a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizadas na identificação da fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos, como o gene prepronociceptin (Jaouadi *et al.* 2013) e regiões do citocromo b (Steuber *et al.* 2005; Sant'anna *et al.* 2008). A identificação de um conjunto de iniciadores universais dirigidos para as regiões conservadas do gene mitocondrial do citocromo b (*cyt b*) de vertebrados por Kocher *et al.* (1989), e alguns protocolos desenvolvidos no trabalho anterior de Irwin *et al.* (1991) descrevem iniciadores capazes de amplificar o gene do citocromo b de vários mamíferos, permitindo a amplificação de sequências nucleotídicas relevantes para amostras de DNA mitocondrial encontradas no repasto sanguíneo em artrópodes hematófagos (Kent & Noris, 2005; Molaei *et al.* 2008; Steuber *et al.* 2005). Este gene tem uma comprovada utilidade para a identificação de fontes alimentares sanguíneas de artrópodes, já que um número variável de mitocôndrias pode ocorrer em uma única célula. Embora os eritrócitos maduros não apresentem mitocôndrias, outras células sanguíneas como leucócitos contribuem com um número significativo de mitocôndrias (Tyler, 1992).

A PCR seguida pela digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) tem mostrado ser uma análise fácil, confiável e rápida para a identificação do DNA. A PCR-RFLP se mostra exequível quando comparada com outros métodos de biologia molecular tais como T-RFLP e RFLP-hibridização cujos custos são mais onerosos, e menos usados em países em desenvolvimento (Oshaghi *et al.* 2006a).

A análise de PCR-RFLP do citocromo b foi usada em trabalhos anteriores na

identificação da origem de fontes alimentares sanguíneas em carrapatos *Ixodes ricinus* (Kirstein & Gray, 1996), na mosca tsé-tsé (Steuber *et al.* 2005) em mosquitos do gênero *Anopheles* (Oshaghi *et al.* 2006a,b) e flebotomíneos (Quaresma *et al.* 2012; Ravasan *et al.* 2009) e vem sendo cada vez mais utilizada na pesquisa da origem da fonte alimentar sanguínea de insetos hematófagos. Em flebotomíneos Ravasan *et al.* (2009) mostraram que esta técnica apresentou ótimos resultados na identificação da alimentação sanguínea desses insetos capturados no campo, sendo capaz de identificar fontes alimentares mistas de alimentação.

1.6. O uso das ferramentas da Biologia Molecular na identificação da infecção de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

A determinação da taxa de infecção natural de flebotomíneos em áreas endêmicas e a identificação das espécies de Leishmânia que infectam uma determinada espécie de flebotomíneos são importantes para os estudos epidemiológicos das leishmanioses.

Anteriormente, os métodos mais comumente utilizados para a investigação em laboratório eram pesquisas de parasitas *in loco* através da dissecação do trato digestivo para visualização de formas promastigotas, entretanto, esses procedimentos eram extremamente dependentes da habilidade e técnica do pesquisador, e, em casos positivos, a infecção tem que ser confirmada pela cultura *in vitro* da Leishmânia, frequentemente suscetível à contaminação (Michalsky *et al.* 2002).

Outra forma de confirmar a infecção consiste em preparar um macerado com fêmeas de flebotomíneo em solução salina, seguida de inoculação em animais de laboratório como hamsters ou camundongos (Galati *et al.* 1996), pois elas também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por um estágio de promastigota

indistinguível das leishmânias (Michalsky, 2002), complicando, sobremaneira, o diagnóstico microscópico e o isolamento em cultura, além de consumir maior tempo para a sua realização e não permitem a identificação a nível de espécie dos parasitas.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), possibilitou uma maior especificidade na identificação de material genético de *Leishmania* (Fu *et al.* 1998). Trabalhos utilizando a PCR têm sido realizados no diagnóstico de leishmaniose (Oliveira *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2002; Schubach *et al.* 1998) bem como na identificação de reservatórios animais (Llanos-Cuentas *et al.* 1999), detectando parasitas independentemente da abundância, estágio, local e transmissibilidade (Perez *et al.* 1994).

Com isso, diversos autores têm utilizado técnicas de Biologia Molecular em estudos sobre as leishmanioses, sobretudo em trabalhos que visam detectar, identificar e caracterizar estes parasitos em infecções humanas, caninas e em reservatórios Cortes *et al.* 2004; Gontijo, 2000; Volpini *et al.* 2004). Em flebotomíneos, as principais vantagens do uso de tais técnicas no estudo da infecção natural, são a sensibilidade e especificidade, independente do número, estágio, e localização dos parasitos no tubo digestório dos flebotomíneos (Perez *et al.* 1994).

A reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos (Molina & Tobo, 2004), e veio substituir as técnicas de dissecação do inseto e observação direta do parasito, sendo empregada com sucesso na determinação da infecção natural de flebotomíneos com boa especificidade e sensibilidade (Soares *et al.* 2010).

Para a detecção e identificação de *Leishmania* spp. em amostras, sem a necessidade do cultivo prévio dos parasitos, diversas regiões do DNA têm sido pesquisadas. Entre os

vários alvos podemos citar, o gene da pequena subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA) (Van Eys *et al.* 1992), o gene hsp70 (Garcia *et al.* 2004), o gene codificador para gp63 (Guerbouj *et al.* 2001) e o kDNA (Disch *et al.* 2005; Assis *et al.* 2009). Outra região bastante estudada é a ITS1 do gene rRNA. Esta região situa-se entre a pequena unidade do rRNA (SSU) e o gene 5.8S rRNA. Sequências do ITS1 têm sido extensivamente estudadas em *Leishmania* spp. (Schonian *et al.* 2001). A PCR-RFLP baseada na amplificação dessa região pela PCR e a subsequente utilização de enzimas de restrição, capazes de reconhecer e clivar a fita dupla da molécula de DNA em sítios específicos tem possibilitado a determinação de parasitos do gênero *Leishmania* em amostras clínicas, hospedeiros acidentais e potenciais reservatórios (Schonian *et al.* 2003).

Estudos sobre infecção por Leishmânia utilizando técnicas de biologia molecular, ainda são incipientes no Maranhão, mas têm-se conhecimento de alguns trabalhos como o de Soares (2006), que encontrou uma taxa de infecção em populações de *Lu. longipalpis* através da PCR, de 1,25% no município de São José de Ribamar e de 0,25% na Raposa, ambos pertencentes à ilha de São Luís e Pereira (2004) em Buriticupu, Amazônia maranhense.

1.7. O Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses e as Leishmanioses no seu entorno

Os flebotomíneos ocorrem em todos os estados brasileiros (Aguilar & Medeiros, 2003). No Maranhão já foram encontradas mais de sessenta espécies distribuídas nas diversas regiões do Estado (Rebêlo *et al.* 1999a,b; Rebêlo *et al.* 2000; IBGE, 2008). Contudo, algumas áreas ainda necessitam de investigação entomológica, incluindo o Município de Barreirinhas onde, apesar de apresentar um dos maiores coeficientes de detecção de LTA, os flebotomíneos ainda não foram adequadamente estudados.

O Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses (PNLM), que é uma unidade de conservação brasileira de proteção integral à natureza, situada no nordeste do Estado do Maranhão constituem a mais antiga categoria de unidades de conservação, que são áreas protegidas por lei e dedicadas à proteção da biodiversidade (Brasil, 2013b). É formado pela sucessão de dunas de areia que encerram inúmeras lagoas distribuídas em 155 mil hectares de área do litoral nordeste do Estado (D'Antona, 2000). Está inserido no bioma costeiro marinho e é um expoente dos ecossistemas de mangue, restinga e dunas, associando ventos fortes e chuvas regulares (ICMBio, 2013). O clima na área é quente, com pouca variação térmica ao longo do ano e com precipitação pluviométrica anual que pode variar entre 1600-2400 milímetros, dependendo da longitude (Castro & Piorski, 2002).

O PNLM está inserido em 3 municípios maranhenses: o de Barreirinhas, no qual estão dois terços de sua área, Santo Amaro, consistindo de quase um terço, e Primeira Cruz com o restante (**Figura 2**), que dispõem de estrutura para recepção e condução de visitantes.

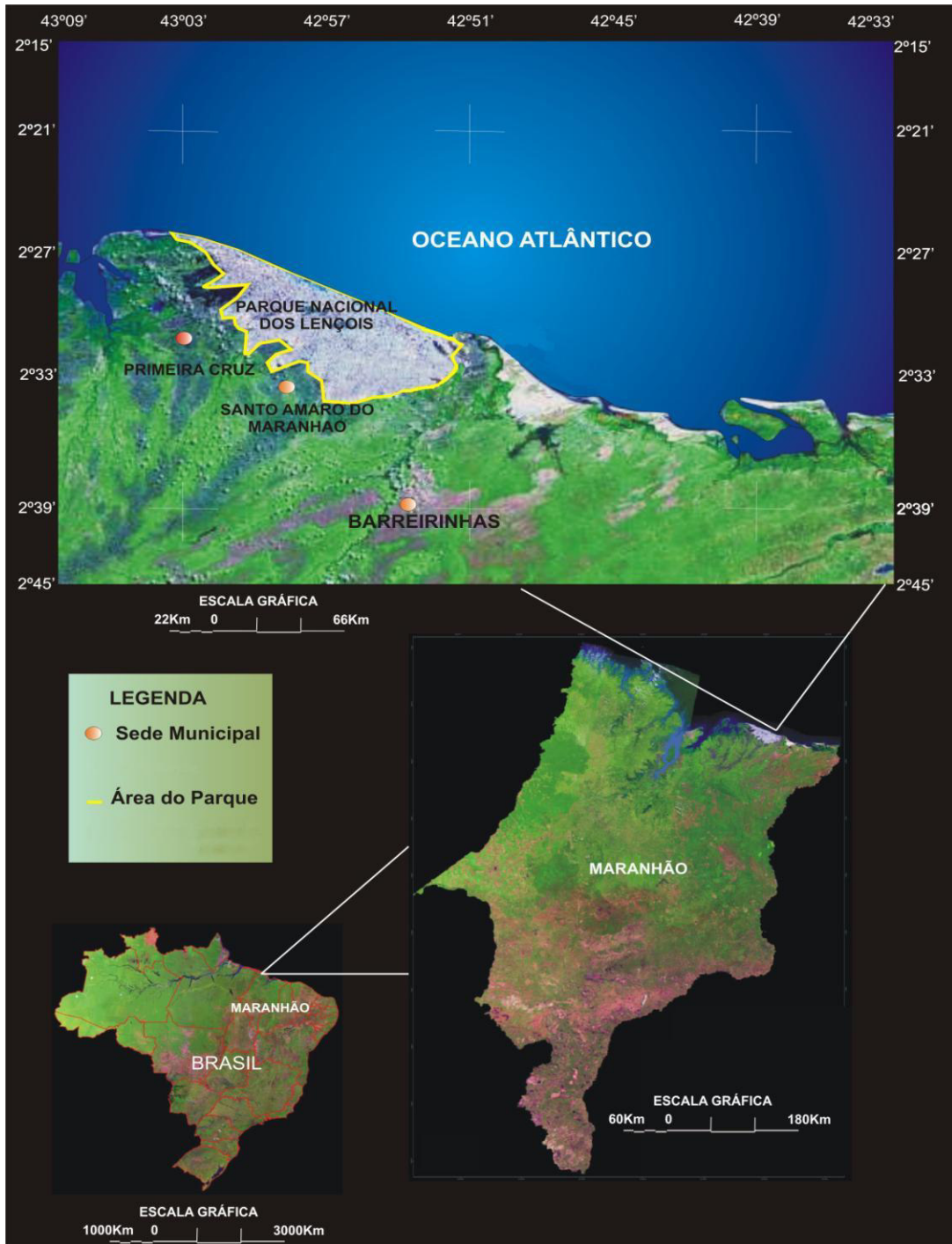


Figura 2: Localização do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses e os Municípios que o compõem. Adaptado de Ulisses Denache Vieiras (cedido pelo autor em janeiro de 2014).

O avanço do turismo se faz sentir a cada dia, principalmente, depois da abertura da estrada MA-225, no início de 2002, e do impulso na rede hoteleira (Rebêlo, 2011). Esse crescente avanço do turismo vem alterando principalmente, o ritmo de Barreirinhas, a principal porta de entrada no PNLN, além de interferir no comportamento da população, não apenas da cidade, mas também daqueles que vivem nos povoados dentro do Parque e na área do entorno (Rêbello 2011; FAPEMA, 2012). Essa atividade econômica, embora de grande importância para a região e o Estado do Maranhão, vem sendo desenvolvida de maneira predatória e sem o devido planejamento. Dessa forma a região torna-se vulnerável e fragilizada, principalmente porque políticas públicas, que dão proteção ao meio ambiente na região adjacentes do PNLN, ainda são incipientes e isoladas, resultando em diversos processos de degradação ambiental.

Os municípios da região dos Lençóis Maranhenses também não apresentam infraestrutura básica (e.g. não há rede de esgotos e aterros sanitários em qualquer dos municípios) que dêem suporte a este turismo. Mesmo assim, devido ao grande número de pessoas interessadas em visitar o local, tem ocorrido um substancial desenvolvimento de negócios (construção de hotéis, flats, restaurantes e pousadas) na região adjacente ao parque, sobretudo no município de Barreirinhas, MA (Miranda, 2007).

Essas mudanças vêm causando impacto na epidemiologia da LTA, a principal forma de leishmaniose encontrada nas áreas do entorno do PNLN, sobretudo no município de Barreirinhas, onde tem sido observado um aumento no número de casos nos últimos anos.

Galvão *et al.* (1993) relata o primeiro caso de Leishmaniose cutânea disseminada na região, causada por *Le. braziliensis* em um paciente masculino, lavrador oriundo de Barreirinhas. Isso sugere que desde o início dos primeiros casos dessa doença nessa região, a LTA apresentou caráter ocupacional acometendo lavradores expostos a

ambientes rurais.

Do período de 2000 a 2008 foram registrados 737 casos na região, distribuídos em 120 localidades, situação que põe o município em posição de destaque no cenário estadual das leishmanioses. A LTA encontra-se amplamente distribuída no município de Barreirinhas, e continuando a apresentar ligação com umas das principais atividades profissionais da região, atingindo principalmente as faixas etárias mais produtivas, como a ocupação de agricultor (Assunção-Júnior *et al.* 2009). Ressalva-se uma preocupação nesse sentido, de forma que os órgãos competentes possam tomar medidas cabíveis e aplicáveis no controle da LTA, uma vez que nos últimos quatro anos, de 2009 a 2013, esse número manteve-se em alta, totalizando 308 ocorrências (SINAN 2012).

Referencias

- Aguiar GM & Medeiros WM 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207- 255.
- Alexander JB, Young DG 1992. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 397-403.
- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 8: 1480-1485.
- ALEXANDER, B. & USMA, M. C., 1994. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88:543-549.
- Almeida PS, Minzão ER; Minzão LD, Silva SR, Ferreira AD, Faccenda O, Andrade Filho JD 2010. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(6): 723-727.
- Alvar J, Vélez DI, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M, WHO Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One* 7 (5): e35671.
- Andrade AJ, Andrade MR, Barata RA, Pinto MC, Dias ES. ; Eiras AE 2007. Quatro novos registros da fauna flebotomínica do gênero *Lutzomyia* spp. França (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) do distrito rural de Brejo do Mutambal, Varzelândia (MG), Brasil. *Neotrop Entomol* 36: 980-983.

- Andrade Filho JD, Lima MLN, Falcão AL, Brazil RP 1998. Sazonalidade dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) dos arredores da Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Entomol* 42: 93-95.
- Andrade Filho JD, Brazil RP 2009. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas state, northeast of Brazil. *Neotrop Entomol* 38: 688-690.
- Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL 2007. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 102: 481-487.
- Andrade-Filho JD, Valente MB, Andrade WA, Brazil RP, Falcão AL 2001. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 34(4) 323-329.
- Antunes PCA, Coutinho JO 1939. Notas sobre flebótomos americanos. II. Descrição de *Flebotomus whitmanin*. sp. e da armadura bucal de algumas espécies. *Bol Biológico* IV: 448-451.
- Assis TSM, Caligiorne RB, Romero GAS, Rabello A 2009. Detection of Leishmania kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103 (12): 1269-1272.
- Assunção Júnior AN, Silva O, Moraes JLP, Nascimento FRF, Oliveira-Pereira YN, Costa JML, Rebêlo JMM 2009. Foco emergente de leishmaniose tegumentar (LT) no entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Nordeste, Brasil. *Gazeta Medica da Bahia* 79(3): 103-109.
- Azevedo ACR, Costa SM, Pinto MCG, Souza JL, Cruz HC, Vidal J, Rangel EF

2008. Studies on the sandy fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 760-767.
- Barata RA, Franca-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Fiuza J, Lorosa ES, Macedo CG, Paula KM, Dias ES 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(5): 421-425.
 - Barros AJ, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol*. 2003;3:21. DOI: 10.1186/1471-2288-3-21
 - Bates P 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37: 1097-1106.
 - 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*, v. 36 (Supl.1), p. 427, 2003.
 - Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53:1-8, 2001.
 - Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT 1986. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 143–145.
 - Brasil – Ministério da Saúde 2006. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana Diagnóstico clínico e diferencial*. Editora do Ministério da Saúde,

Brasília, 136 pp.

- BRASIL – Ministério do Meio Ambiente 2013b. O SISTEMA NACIONAL DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DA NATUREZA. Disponível em:http://www.mma.gov.br/estruturas/250/publicacao/250_publicacao30082011035301.p df. Acesso em 10 de novembro de 2013.
- Brasil – Ministério da Saúde 2003. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 120 pp.
- Brasil – Ministério da Saúde 2007. *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 180 pp.
- Brasil – Ministério da Saúde 2011. *Manual de vigilância da Leishmaniose Visceral*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 78 pp.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Agravos de notificações. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php> , acesso em 13-04-2013.
- Brasil – Ministério da Saúde: Portal da Saúde 2013a. [cited 2013 Nov 14] Available from:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_coeficiente_de_teccao_lta_e_ntre_1990_e_2011.pdf. Acesso em 14 de novembro de 2013
- Brazil RP, Ryan L 1984. Nota sobre a infecção de *Lutzomyia evandroi* (Diptera: Psychodidae) por *Ascocystis chagasi* (Adler & Mayrink, 1961) no Estado do Maranhão. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 375-376.
- Brazil RP, Carneiro VL, Andrade Filho JD, Alves JCM, Falcão AL 1997. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera:Psychodidae). *An Soc Entomol Brasil* 26: 191-193.
- Brazil RP, De Almeida DC, Brazil BG, Mamede SM 1991. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parassitologia* 33 (Suppl. 1): 113–

117.

- Brazil RP, Passos WL, Fuzari AA, Falcão AL, Filho JDA 2006. The peridomiciliar sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. *J Vector Ecol* 31: 418-420.
- Brazil RP, Passos WL, Fuzari AA, Falcão AL, Filho JDA. The peridomiciliar sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. *J Vector Ecol* 31: 418-420, 2006.
- Buitrago R, Cupollilo E, Bastents B, Lê Pont F, Martinez E, Barnabé C, Breniere SF 2011. PCR – RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra- species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution* 11(3): 557 – 563.
- Camargo LMA, Basano SA 2004. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol* 7(3): 328-337.
- Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF 2002. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 299-306.
- Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cadernos de Saúde Pública* 17:1263-1267, 2001.

- Cameron, M. M.; Pessoa, F. A.; Vasconcelos, A.W. & Ward, R. D., 1995. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medicine and Veterinary Entomology*, 9:263-272.
- Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Silans LNMP 2001. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 159-62.
- Campos AM, Matavelli R, Santos dos CLC, Moraes LS, Rebêlo 2013. Ecology of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a Transitional Area between the Amazon and the Cerrado in the State of Maranhão, Brazil. *J Med Entomol* 50 (1): 52-58.
- Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF 2008. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8 (3): 413-414.
- Carvalho ML, Rebêlo JMM, Araújo JC, Barros VLL 2000. 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.
- Casanova C, Andrighetti MTM, Sampaio SMP, Marcoris MLG, Colla-Jacques FE, Prado AP 2013 Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2443.
- Castro, ACL & NM, Piorski (Orgs.) 2002. *Plano de Manejo do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses*. Fundação Sósândrade. São Luís, 496 pp.
- Cerino DA, Teodoro U, Silveira TGV 2009. Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in

- the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. *Neotrop Entomol* 38(6): 853-858.
- Chow E, RA Wirtz, TW Scott 1993. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 196-205.
 - Christensen HA, Arias JR, Vasquez AM, Freitas RA 1982. Host of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. *Annals of the Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31: 239-242.
 - Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* .L-specific kineplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 12-17.
 - Costa CH, Werneck GL, Rodrigues Jr L, Santos MV, Araujo IB, Moura LS, Moreira S, Gomes RB, Lima SS 2005. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 229-236.
 - Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34:223-228, 2001.
 - Costa JML 2005. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia* 75: 3-17.
 - Costa JML, Tada MS, Netto EM, Vale KC, Lago EL, Marsden PD 1988. Procedência de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana nas áreas endêmicas de Três Braços e Corte de Pedra – Estado da Bahia- Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 21:145-149.
 - Costa JML, Viana GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim AC,

- Burattini MN, Silva AR 1995. A Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A Evolução de uma Epidemia. *Cad Saude Publica* 11 (2): 321-324.
- Costa, C. H. N. & Pereira, H. F., 1990. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 24:361-372.
 - Costa-Simone M, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102:149-53. 2007.
 - Cruz CFR 2010. *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, 135pp.
 - D’Antona, Álvaro de Oliveira 2000. *O lugar do Parque Nacional no espaço das comunidades dos lençóis Maranhenses*, Ed. IBAMA, Brasília, 87 pp.
 - DANTAS-TORRES, Filipe; BRANDAO-FILHO, Sinval P.. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 39, n. 4, Aug. 2006 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000400007&lng=en&nrm=iso>. access on 13 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000400007>.
 - Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodrigues N 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica* 16(4):925-950.

- Deane LM 1956. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina, USP, 162 pp.
- Dedet JP 1990. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *Am J Trop Med Hyg* 43:25-28.
- Delgado, O.; Castes, M.; White Jr., A. C. & Kreutzer, R. D., 1993. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:145-147
- Desjeux P 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 239-243.
- Desjeux P 2004 *et al.* Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM 2003. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad de Saúde Pública* 19: 1373-1380.
- Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Gonçalves CM, Barata RA 2007. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 1-4.
- Dias, E. S.; França-Silva, J. C.; Silva, J.C.; Monteiro, E. M.; Paula, K. M.; Gonçalves, C. M.; Barata, R. A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um focode leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 49-52, 2007.
- Dias-Lima AG, Castellón EG, Sherlock I 2002. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de

- silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazon* 33: 303-316.
- Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, De Oliveira MC, Castro M, Rabello A 2005. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51 (3):185-190.
 - Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Camargo de Castro AC, Ales TP 2006. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 43-46.
 - Dourado, M.I.C. et al. 1989. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). *Rev. Saúde Públ., S. Paulo*, 23(1): 2-8.
 - Dweik A, Schönian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and Hae III) for the detection of leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101: 399-407.
 - FAPEMA – Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão 2012. Preservação da Vida. In: *Revista Inovação* 17: 49-50.
 - Feitosa, MAC, Castellon EG 2004. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amazon* 34: 121-127.
 - Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Pérez AA, Acardi SA, Guccione JD 2010.
 - Ferreira AL, Falqueto A, Grimaldi G, Peixoto AA, Pinto IS 2013a. Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the

National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *J Med Entomol* 50(6): 1215-1222 New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA.

- Ferro CJ, Spratt JC, Haynes WG, Webb DJ. Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels *in vivo*. *Circulation*. 1997;97:2323–2330.
- Follador I, Araújo C, Cardoso MA, Tavares Neto J, Barral A, Niranda JC, Bittencourt A, Carvalho EM 1999. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro – Bahia - Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 497-593.
- Fonteles RS 2009. Estudo do ciclo de vida, fonte alimentar e capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* no Maranhão, Brasil, Dissertação, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 69 pp.
- Fonteles RS, Vasconcelos GC, Azevedo PCB, Moraes JLP, Lorosa ES, Kuppinger O, Rebêlo JMM 2009. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(6): 647-650.
- Forattini OP 1973. *Entomologia médica*, 4th ed., EDUSP, São Paulo 658 pp.
- Freitas JS, Reinhold-Castro KR, Casanova C, Silva JP, Providelli I, Teodoro U 2009. Memória espacial e/ou olfativa em flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, sul do Brasil. *Rev Bras Med Trop* 42: 151-155.
- Galati EAB 2003. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p.23-51.
- Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Rocha HC, Garcia WB 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev*

Saude Publica 30: 115-128.

- Galvão CES, Silva ACM, Saldanha ACR, Silva CMP, Costa MRSR, Costa JML1993. Leishmaniose cutânea disseminada produzida por *Leishmania viannia brasiliensis* no estado do Maranhão – Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 26(2): 121-123.
- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanoos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ, Dujardin JC 2004. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validations of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *J Clin Microbiol* 42: 2294-2297.
- Gomes AC, Rabello EX, Galati EAB 1978. Flebotomíneos encontrados em galinheiros experimentais nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Brasil) e algumas observações ecológicas. *Rev Saude Publica* 12(3): 403-407.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349.
- Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(1): 71-80.
- Gontijo CMF 2000. Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais: Estudos Moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humano. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 158 pp.
- Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, Toma HK, Lima JH, Romanha AJ, Campbell DA 2000. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Trop* 74(1):89-92.
- Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, Ismail RB,

Le Ray D, Dujardin JC 2001. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology* 122: 25-35.

- Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6): 1054-1059.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27 (9): 403-409.
- Hunter FF, R Bayly 1991. ELISA for identification of blood meal source in black flies (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol* 28: 527-532.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013 a. [updated 2013 Dez 03: cited 2013 Dez 10] Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=211027&search=maranhao-amaro-do-maranhao>. Acesso em 03 de dezembro de 2013.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013b. [updated 2013 Dez 03: cited 2013 De 10] Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=210170&search=maranhao-barreirinhas>. Acesso em 03 de dezembro de 2013.
- ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade 2013. [updated 2013 Nov 02: cited 2013 Nov 10] Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/parnalencoismaranhenses/guia-do-visitante>. Acesso em 25 de janeiro de 2013.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol* 32: 128-144.

- IRWIN, D. M., T. D. KOCHER, AND A. C. WILSON. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128–144
- Jaouadi K, Haouas N, Chacara D, Boudabous R, Gorgii M, Kidar A, Depaquit J, Pralong F, Dedet JP, Babba H 2013. 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? *Ann Entomol Soc Am* 106: 79-85.
- Kaye P & Scott P 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* 9 (8): 604-15.
- Kent RJ, Norris DE 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *American Journal of Medical Hygiene* 73(2): 336-342. .
- Killick-Kendrick R 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4: 1-24
- Kirstein F, Gray JS 1996. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of *Lyme borreliosis* by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* 62: 4060-4065.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci* 86:6196–6200.
- Lainson R, Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811-827.

- Lainson R & Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811-27.
- Lainson R & Shaw JJ 1998. New World Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species, p. 242-266. In: Cox, F.E.G., J.P. Kreier & D. Wakelin (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology, 701p.
- Lainson R & Shaw JJ 2005. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology. 10th ed. London: Hodder Arnold ASM Press, p. 313- 49.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New World leishmaniasis: The Neotropical *Leishmania* species. In L Collier, A Baeows, M Sussman (eds), Microbiology and Microbial Infections 5: 241-266.
- Lainson R, Ready PD, Shaw JJ 1979. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian "uta", as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Science* 206 (1164): 307-318.
- Lainson R, Ryan L, & Shaw JJ 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 421-424.
- Lainson R, Shaw JJ 1968. Leishmaniasis in Brazil. I – Observations on enzootic rodent leishmaniasis – Incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 62: 385-395.

- Lainson R, Shaw JJ 1987. *Evolution, classification and geographical distribution*. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* 1: 1-120.
- Lainson R, Shaw JJ 2005. New World Leishmaniasis. In: FEG Cox, D Wakelin, SH Gillespie, DD Despommier (eds), *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Parasitology*, 10th ed., ASM Press, London, p. 313-349.
- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, (eds). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology*. 10th ed. London: Hodder Arnold ASM Press; 2005. p. 313-49.
- Lainson R. 2010. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 1: 13-32.
- Leonardo FS & Rebêlo JMM 2004. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37(3): 282-284.
- Lima AP, Minelli L, Comunello E, Teodoro U. Distribuição da Leishmaniose Cutânea Americana por imagens de sensoriamento remoto orbital, no estado do Paraná, sul do Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 77: 681-692, 2002.
- Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, Queiroz RG, Justiniano SCB, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA 2002. Molecular evolution of the *cacophony* IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol* 11(2): 117-122.
- Llanos-Cuentas, E.A., Roncal, N., Villaseca, P., Paz, L., Ogasaku, E., Pérez, J.E., Cáceres, A., Davies, ; C.R.1999. Natural infections of *Leishmania peruviana* in

- animals in the Peruvian Andes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93, 15-20.
- *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Trop* 114: 81-87.
 - Magnarelli, L. A. & Modi, G. B., 1988. Caloric determination of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medicine and Entomology*, 20:568-569.
 - van Handel, E., 1984. Metabolism of nutrients in the adult mosquito. *Mosquitoes News*, 44:573-579.
 - Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 24: 2941-2947.
 - MANGABEIRA FILHO, Octavio. Sobre duas novas especies de Flebotomus (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 1938, vol.33, n.3, pp. 349-356. ISSN 0074-0276.
 - MANGABEIRA, O. Sobre a sistemática e Biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 21:3-25, 1969.
 - Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN 2010. Phlebotominae Sand Flies (Diptera:Psychodidae) and Leishmania Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol* 47(6):1212-1219.
 - Marinho RM, Fonteles RS, Vasconcelos GC, Azevêdo PCB, Moraes JLP, Rebêlo JMM 2008. Flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. *Rev Bras Ent* 52: 112-116.

- Martin AMCB, Rebêlo JMM 2006. Dinâmica espaço-temporal de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de Santa Quitéria, área de cerrado do Estado do Maranhão, Brasil. *Iheringia Ser. Zool.* 96 (3): 283-288.
- Martins AV, Falcão AL, Silva JE 1964. Estudo sobre os flebótomos do estado de Minas Gerais. VI: Descrição de “*Lutzomyia termitophila*” sp. n. e “*Lutzomyia cipoensis*” sp. n. (Diptera: Psychodidae). *Rev Bras Biol* 24: 309-315.
- Martins LM, Rebêlo JMM, Santos MCFV, Costa JML, Silva AR, Ferreira LA 2004. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cad Saude Publica* 20(3): 735-743.
- Martins, L.M.; Rebêlo, J.M.M.; Santos, M.C.F.V.; Costa; J.M.L.; Silva, A.R.; Ferreira, L.A. Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20 (3), p. 735-743, 2004.
- Marzochi MC, Marzochi KB 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10 (Suppl 2): 359-75.
- Marzochi MCA, Marzochi KB 1994. Tegumentary and visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10: 359-375.
- Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Wanderley DM, Corrêa FMA 1998. Flebotomíneos de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana no município de Itupeva, região sudeste do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 339-345.
- McKinney RM, JT Spillane, Pholden 1972. Mosquito blood meals: identification

by a fluorescent antibody method. *Am J Trop Med Hyg* 21: 999-1003.

- Meece JK, Reynolds CE, Stockwell PJ, Jenson TA, Christensen JE, Reed KD 2005. Identification of Mosquito Bloodmeal Source by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profile Analysis of the Cytochrome B Gene. *J Med Entomol* 42(4):657-667.
- Membrive NA, Rodrigues G, Membrive U, Monteiro WM, Neitzke HC, Lonardoni MVC, Silveira TGV, Teodoro U 2004. Flebotomíneos de municípios do norte do estado do Paraná, Sul do Brasil. *Entomol Vect* 11: 673-80.
- Mendes WS, Silva AAM, Trovão JR, Silva AR, Costa JML. 2002. Expansão especial da leishmaniose visceral Americana em São Luís, Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:227-31.
- Michalsky EM, Guedes KS, Lara e Silva FO, França-Silva JC, Dias CLF, Dias ES, Barata RA 2011. Natural Infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 58-62.
- Michalsky, E.M., Fortes-Dias, C.L., Pimenta, P.F.P., Secundino, N.F.C., Dias, E.S.; 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. In experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 44, 255-9.
- Miranda JP 2007. Ecologia e conservação de herpetofauna do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Maranhão, Brasil, PhD Thesis, Universidade de Campinas, Campinas, 155 pp.

- Missawa NA, Michalsky EM, Fortes-Dias, CL, Dias, ES 2010. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. *Cad Saúde Pública* 26(12): 2414-2419.
- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Diuk-Wasser M 2008. Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, U.S.A.: Molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*. *J Med Entomol* 45: 1143-1151.
- Molina AL & PR Tobo 2004. Uso das técnicas de Biologia Molecular para diagnóstico. *Einstein* 2 (2):139-142.
- Monteiro EM, da Silva JCF, da Costa RT, Costa DC, Barata RA, de Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 147-152.
- Monteiro EM, da Silva JCF, da Costa RT, Costa DC, Barata RA, de Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 147-152, 2005.
- Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, GLL Machado - Coelho, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(2): 147-152.
- Moreno J, Alvar J 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18: 399-405.

- Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, Carneiro M, 2005. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 456–463.
- NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; J., E. Variables search technique applied to gas separation. *Química Nova*. v.25, n 2, p.327-329, 2002.
- Ngo KA, Kramer LD 2003. Identification of Mosquito Bloodmeals Using Polymerase.
- Oliveira CD, Diez-Roux A, Cesar CC, Proietti FA 2006. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999-2000. *Bol Oficina Sanit Panam* 20: 369-376.
- Oliveira EF, Silva EA, Fernandes CE, Paranhos Filho AC, Gamarra RM, Ribeiro AA, Brazil RP, Oliveira AG 2012. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(3): 396-401.
- Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcao AL, Brazil RP 2003. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad Saude Publica* 19: 933-944.
- Oliveira, C.I., Báfica, A., Oliveira, F., Favali, C.B., Correa, T., Freitas, L.A.R., Nascimento, E., Costa, J.M., Barral, A.; 2003. Clinical utility of polymerase chain reaction – based detection of *Leishmania* in the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Clinical infection diseases*. 37.
- Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF 2006.

Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmaniasp* na Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(6): 540-543.

- Oliveira-Pereira YN, Moraes JLP, Lorosa ES, Rebêlo JMM 2008. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 24(9):2183-2186.
- Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H 2006a. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. *Exp Parasitol* 114: 259-264.
- Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H, Yaaghoobi F, Mohtarami F, Noorjah N 2006b. Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Exp Parasitol* 112: 232–236.
- Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, HF, Malafronte RS 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop* 99: 252-259.
- Pereira Y.N.O.; 2004. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão. 61.
- Pereira-Filho A.A.; 2014. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Maranhão, Brasil: estudos da infecção por *Leishmania* spp. e da fonte alimentar. *Manuscrito não publicado*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra

- H 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 161-164. Perez JE, Oigusuku E, Ingá R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Earevato J, Guerra H 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 16-14.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 905-913.
 - Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF 2009. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *American Journal and Trop Med and Hygiene* 80: 593-595.
 - Quaresma PF, Carvalho GML, Ramos MCN, Andrade Filho JD 2012. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(4): 480-485.
 - Queiroz MFM, Varjao JR, Moraes SC, Salcedo GE 2012. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev Soc Bras Med Trop* 45(3): 313-317.
 - Ravasan NM, Oshaghi MA, Javadian E, Rassi Y, Sadraei J, Mohtarami F 2009.

Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *J Arthropod Borne Dis* 3(1): 8-18.

- Ready P 2013. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Rev Entomology* 58: 227-250.
- Rebêlo JMM, Assunção-Júnior AN, Silva O, Moraes JLP 2010a. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. *Cad Saúde Pública* 26(1): 195-198.
- Rebêlo JMM & Oliveira-Pereira YN 2001. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de matas de terra firme e de várzea, do município de Paragominas, estado do Pará, Brasil. *Acta Amazon* 31: 145-154.
- Rêbêlo JMM 1999. *Flebótomos vetores das leishmanioses: Manual para técnicos e profissionais da área de saúde*. UFMA/Ministério da Saúde, São Luís, 32 pp.
- Rêbêlo JMM 2011. *O vento, o mar e a areia*. Scortecci, São Paulo, 232 pp.
- Rebêlo JMM, Araujo JAC, Carvalho ML, Barros VLL, Silva FS, Oliveira ST 1999a. Flebótomos (*Lutzomyia*, Phlebotominae) da ilha de São Luís, zona do golfo maranhense, Brasil. *Rev Bras Med Trop* 32: 247-253.
- Rebêlo JMM, Carvalho J, Costa VLL 1999c. Flebótomos (*Lutzomyia*, Phlebotominae) da ilha de São Luís, zona do Golfo maranhense, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32 (3): 247-253.
- Rebêlo JMM, Leonardo FS, Costa JML, Pereira YNO, Silva FS 1999b. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose da região dos cerrados, estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública* 15: 623-630.

- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS 2000a. Flebotomíneos da Amazônia maranhense. IV. Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. *Entomol Vect* 7: 61-72.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira L A, Silva A R 2000b. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Rev Bras Med Trop* 33: 11-19.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Silva FS, Costa JML 2001. Sandflies (Diptera, Psychodidae) of the Amazonia of Maranhão. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. *Rev Bras Biol* 61(1): 101-115.
- Rebêlo JMM, Rocha RV, Moraes JLP, Alves GA, Leonardo FS 2009. Distribuição de *Lutzomyia whitmani* em fitorregiões do estado do Maranhão, Brasil. *Rev Saude Publica* 43(6): 1070-1074.
- Rebêlo JMM, Rocha RV, Moraes JLP, Silva CRM, Leonardo FS, Alves GA 2010b. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. *Rev Bras entomol* 54: 494-500.
- Rebêlo, J.M.M.; Leonardo, F.S.; Costa, J.M.L.; Pereira, Y.N.O.; Silva, F.S. Flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15 (3), p. 623-630, jul./set. 1999.
- Rebêlo, J.M.M.; Mendes, W.W.; 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*, Rio de Janeiro, v.12 (4), p. 545-549, out./dez., 1996.

- Rebêlo, J.M.M.; Oliveira, S.T.; Barros, V.L.L. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, Município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, nº 1, p.11-19, jan./fev., 2000.
- Reeves WC, WM Hammon 1944. Feeding habits of the proven and possible mosquito vectors of western equine and St. Louis Encephalitis in the Yakima Valley, Washington. *Am J Trop Med Hyg* 24: 131-134.
- Reinhold-Castro KR, Scodro RBL, Dias-Sversutti AC, Neitzke HC, Rossi RM, Kühl JB, Silveira TGV, Teodoro U 2008. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 269-76.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7(9): 581-596.
- Rogers ME, Hajmová M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, Bates PA 2008. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell Micro* 10: 1363–1372.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430:463–467.
- Sacks D, Kamhawi S 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55: 453-83.
- Sacks DL, Perkins PV 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotas. *Science* 223: 1417-1419.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1650 pp.
- Sant'Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Calvacante RR, Alexander B, Bates PA 2008. Blood meal identification and parasite infection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop* 107: 230-237.
- Sant'anna MR, Nascimento A, Alexander B, Dilger E, Cavalcante RR, Albitzer HMD, Bates PA, Dillon RJ 2010. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites & Vectors* 3: 1-11.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freita RA, Malaco MAF 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12: 315-317.
- Santos JB, Pena SDJ, Eppel JT 1993. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetic* 90: 655-656.
- Santos TV, Barata IR, Souza AAA, Silveira FT, Lainson R 2011. Primeiro registro de *Lutzomyia termitophila* Martins, Falcão e Silva (1964) e *Lutzomyia hermanlenti* Martins, Silva e Falcão (1970) (Diptera: Psychodidae) no Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2(4): 47-50.
- Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva S de O, Andrade AS, Melo MN 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8): 1033-1039.

- Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA, Souza CM, Freitas CR, Lopes CRG, Moreno EC, Melo MN 2011. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: Characterization of favores locations as determined by spatial analysis. *Acta Trop* 117: 137-145.
- Savani, ESMM.; Camargo, MCGO; Carvalho, MR; Zampieri, RA; Santos, MG; D'áuria, SRN.; Shaw, JJ; Floeter-winter, LM The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Short communication. *Veterinary Parasitology*, v.120, n.3, p.229-233, 2004.
- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:349-358.
- Schonian G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Kohler W, Presber W 2001. Genetic heterogeneity in the species *Leishmaniatropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 217–224.
- Schubach, A., Haddad, F., Neto, M.P.O., Degrave, W., Pirmez, C., Grimaldi, J.R.G., Dernandes, O.; 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 178, 911-914.
- Shaw JJ & Lainson R. Ecology and epidemiology: New World. In Peters W & Killick - Kendrick R (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; Academic Press Inc, London, 1987; v. I, p. 291-363.
- Sherlock IA 2003. A Importância dos Flebotomíneos. In. Rangel EF e Laison R 2003. *Flebotomíneos do Brasil*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 15-21.

- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigurski M, Grimaldi G 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 79: 511.
- Silva AR, Martins G, Melo JEM, Araújo JP, Mendes MG 1979. Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (Estado do Maranhão), Brasil. *Rev Inst Med Trop* 21: 43-50.
- Silva AR, Tauil PL, Cavalcante MN, Medeiros MN, Pires BN, Gonçalves EG 2008. Epidemiological situation of visceral leishmaniasis on the Island of São Luís, State of Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 358:364.
- Silva DA 2005. *Aspectos Ecológicos da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) e suas implicações na epidemiologia das leishmanioses em Cotia, Estado de São Paulo, Brasil*, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 77pp.
- Silva DF, Freitas RA, Franco AMR 2007. Diversidade e Abundância de Flebotomíneos do Gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em Áreas de Mata da Região Nordeste do Município de Manacapuru AM, Brasil. *Neotrop Entomol* 36: 138-144.
- Silva DF, Vasconcelos SD 2005. Flebotomíneos em fragmentos de Mata Atlântica na Região Metropolitana do Recife, PE. *Rev Soc Bras Med Trop*: 38, p. 264-266.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiúza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96:285-291, 2001
- Silva FS, Carvalho LP, Cardozo FP, Moraes JL, Rebêlo JM 2010. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Cerrado area of the Maranhão state, Brazil.

- Neotrop Entomol* 39(6):1032-1038. Silveira TG, Teodoro U, Arraes SM, Lonardoni MV, Dias ML, Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R 1990. Na autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Laeishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Paraná State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 475-476.
- Silva FS, Carvalho LPC, Souza JM 2012. 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.
 - Silva OS, Grunewald J 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 579-582.
 - Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MVC, Roberto ACBS 1999. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 413-423.
 - SINAN – *Sistema de Informação de Informação de Agravos de Notificação*, 2012. Secretaria Municipal de Saúde de Barreirinhas.
 - Soares MRA, Carvalho CC, Silva LA, Lima MSC, Barral AMP, Rebêlo JMM, Pereira SRF 2010. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 26 (12): 2409-2413.
 - Soares, M.R.A.; 2006. Distribuição de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e infecção natural por *Leishmania chagasi* na ilha de São Luís-MA, Brasil.

[Dissertação de Mestrado]. São Luís: Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão. 67.

- Souza CM de, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES 2004. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 99(8): 795-803.
- Srinivasan R, Panicker KN 1992. Identification of bloodmeals of phlebotomine sandflies using the agarose gel diffusion method. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 23: 486–488.
- Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH 2005. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol Res* 97: 247-54.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation* 118: 1301-1310.
- Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W 2013. Atlas didático Ciclo de vida de *Leishmania*. Fundação CECIERJ/Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, 64 pp.
- Teodoro U, Kuhl JB 1997. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no Sul do Brasil. *Rev Saude Pública* 31 (5): 512-516.
- Teodoro U, Lonardon MVC, Silveira TGV, Dias AC, Abbas M, Alberton D, Santos DR 2007. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. *Rev Saude Publica* 41: 383-388.
- Teodoro U, Salvia Filho VL, de Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Maria

- Ferreira MEMC, Lonardoni MVC 1993. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev Saude Pública* 27(4) 242-249.
- Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O, Kühl JB 2001. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 30(2): 209-224.
 - Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O, Kuhl JB, Alberton D 2003. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no Município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saude Pública* 19: 1801-1813.
 - Teodoro U. Características ecológicas de Flebotomíneos (Díptera Psychodidae) em habitats antrópicos, município de Jussara, Paraná, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29: 625-626, 1996.
 - Tormen SH, Nascimento JC 2011. Levantamento de Fauna Flebotomínica relacionado ao Surto de Leishmaniose Tegumentar Americana em Blumenau – SC. Diretoria de Vigilância Epidemiológica – DIVE, Florianópolis, set, 2006. Disponível em [on-line]: <http://www.dive.sc.gov.br>, acesso em 20/08/2011.
 - Tyler DD 1992. Mitochondrion in the cell. In: *The mitochondrion in health and disease*. VCH Publishers Inc., New York, 95-146
 - Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebelin SB 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of

Leishmania parasites. *Mol Biochem Parasitol* 51: 133-142.

- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31-37.
- Werneck GL 2010. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública* 26(4):644-645.
- WHO – World Health Organization 2010. Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization.
- Young DC, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem of Entomol Institute* 54: 881pp.

2 JUSTIFICATIVAS

Estudos anteriores demonstraram endemicidade de casos de LTA no município de Barreirinhas – MA, onde se localiza o PNLM. Sabe-se que pesquisas demonstraram que remanescentes de matas ciliares, parques ecológicos e áreas de conservação podem abrigar vetores e quando estão próximos a núcleos populacionais, como é o caso, gera grande preocupação para saúde pública pela maior probabilidade de contato homem-vetor. Além disso, a busca por lazer, atividades de educação ambiental, visitação a áreas de preservação do parque, e realização de projetos de pesquisa, tornam possível um maior contato dos vetores com a população.

Existem ainda outros fatores que demonstram a necessidade de pesquisas e estudos na região como a ocorrência de casos autóctones próximos ao parque e a presença de vetores já identificados nas proximidades das áreas a serem estudadas.

Assim observa-se a necessidade de estudos aprofundados que demonstram a interferência de fatores e características ambientais sobre a fauna de flebotomíneos na região do PNLM e as relações ambiente-homem-vetor, com o intuito de delimitar áreas de maior possibilidade de transmissão de leishmanioses na região e fornecer subsídios para o desenvolvimento de um projeto integrado com os serviços locais de saúde pública e órgãos ambientais, e gerar um mapa informativo capaz de facilitar análise das autoridades e comunidade acadêmica quanto a probabilidade de transmissão da doença, visando sempre sua prevenção.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Definir o perfil epidemiológico da LTA, a partir do i) levantamento dos casos humanos, considerando os fatores demográficos, ocupacionais e temporais das populações acometidas; ii) da identificação das espécies de flebotomíneos e das respectivas espécies de *Leishmania* parasitas e iii) dos animais que servem como fonte de alimento sanguíneo; e da iv) criação de uma ferramenta em base cartográfica para demonstrar taxa de risco e atualização de dados epidemiológicos da doença.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Analisar os casos humanos de LTA notificados, levando em consideração os fatores demográficos (faixa etária, sexo, ocupação) e temporais (anos, meses, estações) das populações acometidas;

3.2.2 Estudar a composição da fauna flebotomínica e a presença de leishmânias em fêmeas alimentadas com sangue de vertebrados.

- Determinar taxa de infecção natural de flebotomíneos por leishmânias flageladas através de técnicas moleculares;
- Estabelecer a fonte alimentar sanguínea dos flebotomíneos através de técnicas moleculares;
- Determinar a capacidade vetorial de *Lu. whitmani* para *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* através de infecção experimental.

3.2.1 Criar uma ferramenta em base cartográfica para demonstrar taxa de risco e atualização de dados epidemiológicos da LTA por povoado.

- Quantificar os números de casos e calcular a incidência de acordo com as variáveis demográficas (faixa etária, sexo, ocupação) e temporais (anos, meses, estações) das populações acometidas;
- Identificar e estabelecer o ranque de dominância das espécies de flebotomíneos vetores;
- Demonstrar através de um mapa a distribuição espaço temporal dos casos de LTA;
- Associar todos os fatores citados anteriormente em um banco de dados distribuídos espacialmente para determinação de taxa de risco para LTA.

Short Communication

Experimental Infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) With *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, Etiological Agents of American Tegumentary Leishmaniasis

Raquel S. Fonteles,^{1,2} Adalberto A. Pereira Filho,¹ Jorge L. P. Moraes,^{1,2} Oliver Kuppinger,² and José M. M. Rebêlo^{1,2,3}

¹Laboratório de Entomologia e Vetores, Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Patologia, Praça Madre Deus, 2, São Luís, Maranhão, Brasil 65025-510, (raquel_fonteles@hotmail.com; magneto_pa@hotmail.com; Moraes2entomologia@yahoo.com.br; oliver.kuppinger@gmx.de; macariorebello@uol.com.br) ²Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil 65080-805, and ³Corresponding author, e-mail: macariorebello@uol.com.br.

Received 1 July 2015; Accepted 31 August 2015

Abstract

Leishmania (*L.*) *amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972) and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Vianna, 1911) are the principal causative agents of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Brazil. *L. amazonensis* also causes diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) vectored principally by *Lutzomyia flaviscutellata* and secondarily by *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939). The latter is the most common phlebotomine in the state of Maranhão, and it is the focal species for potential ATL transmission. For this reason, we tested the ability of *L. whitmani* to become infected with *Lutzomyia* parasites. Phlebotomines were derived from a colony maintained in the laboratorial conditions. The first generation, uninfected females were offered a bloodmeal with mice infected with the strains of both parasites. We found that *L. whitmani* can become infected with both parasite species, with infection rates of 65.2% (*L. braziliensis*) and 47.4% (*L. amazonensis*). We conclude that in Maranhão, *L. whitmani* is likely an important vector in the transmission of ATL and may function as a vector of DCL. This possibility should be further investigated.

Key words: phlebotomine, *Leishmania* sp., tropical disease, protozoan parasite

Leishmaniasis is among the most important neglected tropical diseases, prevalent in five continents (Europe, Africa, Asia, America, and Oceania), being recorded in 98 developed and developing countries (Alvar et al. 2012). In the past 5 yr, one million cases of tegumentary leishmaniasis (TL) and an estimated 200–400 thousand new cases of visceral leishmaniasis (VL) were registered each year, with 90% of them registered in six countries, including Brazil (WHO, 2014). According to Lainson (2010), American tegumentary leishmaniasis (ATL) can be caused by 11 different species in the genus *Leishmania* Ross.

Reservoirs may include wild mammals such as rodents, edentates, marsupials, raccoons, canines, primates, and ungulates, or domestic mammals such as dogs and horses. The principal mechanism of transmission of leishmaniasis to mammals, including humans, is through the bite of a female *Leishmania*-infected sand fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the genus *Lutzomyia* in the New World or of *Phlebotomus* in Old World (Brasil, 2007). Among the

sand flies which belong to the genus *Lutzomyia*, *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho 1939) is widely distributed in South America. This species has developed anthropophilic habits in Brazil, commonly occurring in human dwellings and animal shelters (Costa et al. 2007). In Maranhão state, *L. whitmani* has come to infest peridomestic areas, thereby influencing patterns of peri-urban leishmaniasis transmission (Leonardo and Rebêlo 2004, Pereira et al. 2006).

This situation where *L. whitmani* has come to infest peridomestic areas occurred in the city of Axixá (2° 50'08" S and 44° 03'14" W) too, in which 445 cases of ATL were reported from 1996 to 2006, the second largest outbreak in state record. An entomological survey revealed the abundant presence of *L. whitmani* (Fonteles et al. 2009); however, circulating *Leishmania* species could not be found at that time.

For this reason, we decided to develop an experimental study to confirm the vectorial capacity of the *L. whitmani* sand fly for

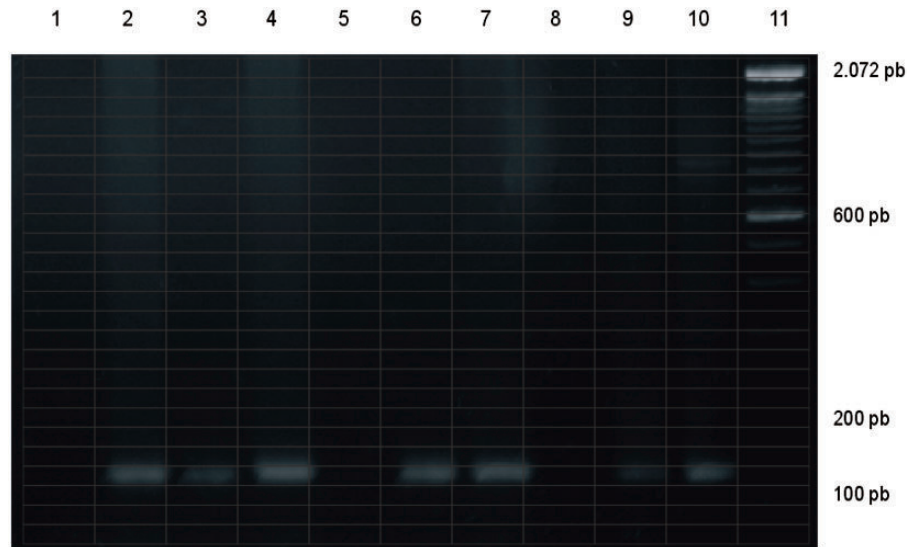


Fig. 1. Amplification products for the genus *Leishmania* performed in *L. whitmani* females fed on mice infected with *L. braziliensis*. Column 1: negative control; columns 2, 3, 4, 6, 7, and 9: positive females; columns 5 and 8: negative females; column 10: positive control; column 11: molecular weight marker.

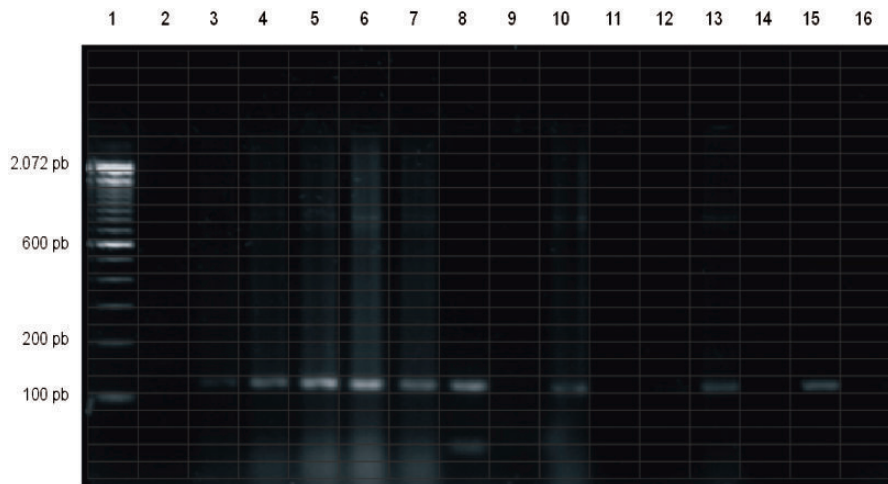


Fig. 2. Amplification products for the genus *Leishmania* performed on *L. whitmani* females fed on mice infected with *L. amazonensis*. Column 1: molecular weight marker; column 2: negative control; columns 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, and 15: positive females; columns 9, 11, 14, and 16: negative females; Column 3: positive control.

Leishmania (L.) amazonensis (Lainson & Shaw, 1972) and *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911).

Materials and Methods

For the experiment, we acquired strains of *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) and *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) from the Immunoparasitology Laboratory of FIOCRUZ, Bahia state. We ran experiments to evaluate whether the Axixá *L. whitmani* population was capable of becoming infected with these species of the genus *Leishmania*.

10 Insects and Mice

L. whitmani colony was established in the laboratory from field-collected individuals. First-generation females (uninfected) were used for vectorial capacity analysis. To access experimental infection,

females of the first generation (uninfected) were maintained under controlled conditions, according to Modi and Tesh 1983. Three hundred 2- to 3-d-old females were offered a bloodmeal at 25°C and relative humidity (RH) of 85%, using BalbC mice that were previously experimentally infected singly with *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. The research protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Maranhão, under No. 23115 010297 / 2007-04.

DNA Extraction and Molecular Detection of *Leishmania* in *L. whitmani*

Engorged females were separated, and after 7 d they were stored separately in eppendorf tubes for individual extraction of DNA and later polymerase chain reaction (PCR) analysis. Briefly, samples were heated for 10 min at 95°C in 20 µl of STE buffer (0.1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA), macerated, and added to

STE for a total volume of 50 µl. Samples were then centrifuged at 12,000 rpm for 2 min, and the supernatant containing the DNA was transferred to a new tube. PCR reactions consisted of 4 µl of genomic DNA, 1 × PCR buffer (Invitrogen, Valencia, CA), 1 µM of each primer, 1.5 µM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1U Taq DNA polymerase, and 8.8 µl sterile water.

Reactions were run on a thermocycler (MJ Research PTC-100/ Peltier Thermal Cycler) as follows: activation and initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 45 s, with a final extension at 72°C for 10 min. Water was used as a negative control, and DNA from *L. braziliensis* and *L. amazonensis* was used as positive controls. Amplified products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gel, and visualized under ultraviolet (UV) light by the addition of ethidium bromide (10 mg/ml) with a 100 bp DNA Step Ladder provided as molecular weight size standard. After electrophoresis, the gels were photographed and analyzed.

Statistics

Comparisons among the groups were performed using a chi-square test, and differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

In total, 156 females successfully fed upon mice infected with *L. amazonensis*. Of these, 74 were positive for an infection rate of 47.4%. Another 144 females fed on mice infected with *L. braziliensis* and 94 became positive (65.2%). Amplification products for both species can be seen in Figs. 1 and 2. The *L. braziliensis* infection rate was significantly higher than that of *L. amazonensis* ($P = 0.0019 / P < 0.05$).

Discussion

A study performed in other species of sand fly such as *Lutzomyia longipalpis* by Silva et al. (1990) has gotten a rate infection for *L. amazonensis* (37%) and *L. braziliensis* (9%). The authors used a microscopy-based parasite identification technique via dissection of the sand fly digestive system, which is inefficient and does not distinguish between *Leishmania* and other flagellate protozoa. In our study, we opted for a molecular-based approach (PCR) for *Leishmania* detection. The main advantages of molecular methods are their sensitivity and specificity, independent of the number, stage, and location of the parasite in the insect midgut (Perez et al. 1994).

One study conducted by Neitzke-Abreu et al. (2014) subjected 268 *L. whitmani* females to dissection and molecular analysis. None were found infected by dissection methods (microscopic detection of flagella); however, *Leishmania* DNA fragments were found by multiplex PCR in three samples, resulting in an infection rate of 1.12%. In Venezuela, Rodriguez et al. (1999) from a total of 2,700 dissected females found 65 infected by the flagellates. However, using PCR and hybridization to identify the species, only five were confirmed to harbor *L. braziliensis*, demonstrating the limitation of microscopy.

Vexenat et al. (1986a) diagnosed experimental *L. whitmani* infection in three out of nine dogs parasitized by *L. braziliensis* by detection of cutaneous lesions. The study of dissection of sand flies resulted in the following indices of infection: 8.3% (1/12), 7.1% (1/14), and 1.8% (3/160), respectively. However, of 418 desiccated *L.*

whitmani females collected in ATL transmission area, all were negative for infection (Vexenat et al. 1986b).

L. whitmani was successfully infected by *L. amazonensis* in this experiment. This result shows that *L. whitmani* may be important in areas of diffuse cutaneous leishmaniasis occurrence without *Lutzomyia flaviscutellata*, the natural vector (Gontijo and Carvalho 2003), such as in the Buriticupu municipality, Maranhão (Costa et al. 1992, Rebêlo et al. 2000), and in the current study area. *L. whitmani* may thus play an important role in the epidemiology of the disease.

Our results suggest that this sand fly species could act as a vector of both *Leishmania* species in the field. However, vectorial capacity, for sand flies, involves several parameters, including the development of *Leishmania* species in the gut and the life time of females, and should be evaluated in future experiments.

Acknowledgment

The authors thank the Foundation for Research of Maranhão (FAPEMA) for their financial support.

References Cited

- Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. Boer. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE 7: e35671.
- Costa, J.M.L., A. C. R. Saldanha, A. C. M. Silva, A. S. Neto, C. E. S. Galvão, C. M. P. Silva, and A. R. Silva. 1992. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Maranhão. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 25: 115–123.
- Costa, S. M., M. Cechinel, V. Bandeira, J. C. Zannuncio, R. Lainson, and E. F. Rangel. 2007. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102: 149–153.
- Foneteles, R. S., G.C. Vasconcelos, P.C.B. Azevedo, J. L. P. Moraes, E. S. Lorosa, O. Kuppinger, and J. M. M. Rebêlo. 2009. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 42: 647–650.
- Gontijo, B., and M. L. R. Carvalho. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36: 71–80.
- Lainson, R. 2010. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev Pan-Amaz Saude 1: 13–32.
- Leonardo, F. S., and J. M. M. Rebêlo. 2004. *Lutzomyia whitmani* periurbanization in a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37: 282–284.
- Neitzke-Abreu, H. C., K. R. Reinhold-Castro, M. S. Venazzi, R. B. L. Scodro, A. C. Dias, T. G. V. Silveira, U. Teodoro, and M. V. C. Lonardoni. 2014. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in southern Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 56: 391–395.
- Pereira, Y. N. O., J. L. P. Moraes, S. R. Pereira-Martins, and J. M. M. Rebêlo. 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39: 540–543.
- Perez, J. E., E. Ogusuku, R. Inga, M. Lopez, J. Monje, L. Paz, E. Nieto, J. Arevalo, and H. Guerra. 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88: 161–164.
- Rebêlo, J. M. M., S. T. Oliveira, V. L. L. Barros, F. S. Silva, J.M.L. Costa, L. A. A. Ferreira, and A. R. Silva. 2000. Plebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 33: 11–19.

- Rodriguez, N., C. M. Aguilar, M. A. Barrios, and D. C. Barker. 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 93: 47–49.
- 5 Silva, A. L. F. F., P. Williams, M. N. Melo, and W. Mayrink. 1990. Susceptibility of laboratory – reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *leishmania* Ross, 1903. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 453–459.
- Vexenat, J. A., A. C. Barreto, and A. C. O. C. Rosa. 1986a. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 81: 125–126.
- Vexenat J. A., A. C. Barreto, C. A. Cuba-Cuba, and P. D. Marsden. 1986b. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 293–302.

CAPITULO II

Fonteles et al.: Taxa de infecção natural
de flebotomíneos

Journal of Medical Entomology

J.M.M. Rebêlo
Laboratório de Entomologia e Vetores.
Departamento de Patologia, Universidade
Federal do Maranhão. Praça Madre Deus 2,
São Luís, MA - Brasil.
CEP 65025-560.
Fone: +55 (98) 98805-7783
E-mail: macariorebello@uol.com.br

Diagnostico molecular da taxa de infecção natural e da fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) provenientes da região do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses.

Raquel S. Fonteles^{1,2}, Antônia S.G. Silva^{1,2}, Adalberto A. Pereira Filho¹, Jorge L.P. Moraes^{1,2},
Silma R.F. Pereira^{2,3}, José M.M. Rebêlo^{1,2*}

¹Laboratório de Entomologia e Vetores, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil, 65080-805.

²Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil, 65080-805.

³Laboratório de Genética, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil, 65080-805.

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo determinar a taxa de infecção natural e a fonte alimentar sanguínea de espécies de flebotomíneos coletados durante 36 meses em diversos povoados do município de Barreirinhas/MA, como um contributo para elucidar parte do ciclo de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA e da Leishmaniose Visceral Americana - LVA, que vem ocorrendo na região. Para isso foram utilizadas técnicas de biologia molecular como a PCR com digestão pelas enzimas de restrição *HaeIII* e *MboI*, aplicadas em flebotomíneos capturados em 62 povoados. A espécie *Lu. longipalpis*, vetora de *L. infantum*, mostrou uma taxa de positividade de 3,7% para esta espécie. Enquanto espécies não consideradas vetoras deste parasita, como *Lu. lenti* e *L. whitmani* mostraram taxas de infecção de 0,6% e 0,9%, respectivamente. A taxa de infecção natural por *Le. braziliensis*, foi detectada apenas em Santa Maria e Manoelzinho, em coleta realizada no ambiente peridomiciliar. As taxas de positividade para *Lu. whitmani*, considerada vetora desta espécie de *Leishmania* foi de 0,3%. Em relação à *Le. amazonensis*, obtivemos uma taxa de infecção de 8% em *Lu. flaviscutelata*; os indivíduos infectados são provenientes do peridomicílio dos povoados de Santa Maria e Canoa e do extradomicílio de Santa Maria. Para fonte alimentar foram identificados os seguintes hospedeiros: equino (9,0%), humano (1,4%), cão (27,4%), roedor (3,3%), galinha (20,9%) e porco (37,9%). Concluindo, confirmou-se a presença de *leishmania* em flebotomíneos alimentados com sangue nos povoados positivos para leishmaniose visceral e tegumentar, sugerindo que a transmissão dessas doenças estão sendo efetivada nos locais de adoecimento dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Flebotomíneos, *Leishmania*, Infecção, Fonte alimentar.

As leishmanioses constituem doenças infecto - parasitárias cujos agentes etiológicos são 21 espécies de protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* transmitidos por flebotomíneos (Diptera, Psychodidae). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), essas antropozoonoses integram o conjunto das seis doenças tropicais mais importantes no Velho Mundo e nas Américas (Desjeux, 2004; Guerra et al., 2007).

Nos seres humanos, a leishmaniose tem um grande espectro de manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas suaves de possível auto cura à formas letais graves (Herwaldt, 1999). Essas enfermidades são classificadas clinicamente como visceral e tegumentar, dependendo da interação agente-hospedeiro e da saliva do vetor modulando a resposta deste (Sacks e Kamhawi, 2001). Na forma tegumentar, as lesões podem ocorrer na pele e/ou mucosas. As lesões de pele podem ser únicas,

múltiplas, disseminadas ou difusas. Apresentam aspecto de úlceras, com bordas elevadas e fundo granuloso, geralmente indolor. As lesões mucosas são mais frequentes no nariz, boca e garganta. Quando atingem o nariz podem ocorrer entupimentos, sangramentos, coriza e aparecimento de crostas e feridas. Na garganta, dor ao engolir, rouquidão e tosse. Podem provocar mutilações irreversíveis, caso não ocorra à medicação necessária (Gontijo e Carvalho, 2003). A forma visceral, também é conhecida como calazar, esplenomegalia tropical e febre dundun. Acomete vísceras, como o fígado e o baço, podendo ocasionar aumento de volume abdominal e pode ser fatal na ausência de tratamento (Gontijo e Melo, 2004).

No Brasil, a incidência da doença é evidente na zona rural, tornando-se crescente nas áreas urbanas do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Costa et al., 2005, Margonari et al., 2006, Neto et al., 2009). Tanto que já é comprovado que algumas espécies vetoras como *Lu. longipalpis* (Lutz e Neiva), *Lu. intermedia* (Lutz e Neiva) e *Lu. whitmani* (Antunes e Coutinho) possuem alto grau de adaptação em áreas urbanas de muitas cidades do Brasil (Margonari et al., 2004 Barata et al., 2005, Gontijo et al., 2005).

Do mesmo, algumas dessas espécies de flebotomíneos têm sido encontradas infectadas com espécies de leishmânias. Dentre elas, sabe-se que *Lu. longipalpis* é o vetor primário da *Le. i. chagasi*, inclusive essa relação espécie-específica já foi notificada no estado do Maranhão (Nascimento et al., 2013); enquanto *Lu. whitmani* tem sido encontrada infectada com *Le. shawi* na região Amazônia e com *Lu. brazilensis* no resto do Brasil. Também é de domínio público a ocorrência de *Le. amazonensis* em *Lu. flaviscutellata* nas áreas onde esta espécie ocorre.

Contudo, no Maranhão, devido à sua posição de transição geográfica e climática, entre a Amazônia úmida e o Nordeste seco, pode ocorrer sobreposição de espécies de flebotomíneos e de leishmânias comuns à ambas regiões-se e com isso detectar-se novas relações.

No Maranhão existem algumas regiões com grande incidência no número de casos de Leishmaniose, tanto no lado amazônico como no Nordeste. Dentre estas, podemos destacar a região do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses (PNLM), situada no lado nordestino do

Estado. O crescente avanço do turismo nessa região vem alterando principalmente, o ritmo dos municípios que abrangem o PNLM como Barreirinhas, a principal porta de entrada desta unidade de conservação, além de interferir no comportamento da população, não apenas da cidade, mas também daqueles que vivem nos povoados dentro do Parque e na área do entorno (Rêbello, 2011; FAPEMA, 2012). Essa atividade econômica, embora de grande importância para a região e o Estado do Maranhão, vem sendo desenvolvida de maneira predatória e sem o devido planejamento. Dessa forma a região torna-se vulnerável e fragilizada, principalmente porque políticas públicas, que dão proteção ao meio ambiente na região adjacente do PNLM, ainda são incipientes e isoladas, resultando em diversos processos de degradação ambiental que são comprovadamente as principais causas de adaptação dos insetos (Chaves et al., 2008), criando um cenário favorável a ocorrência das Leishmanioses. Existem ainda outros fatores que demonstram a necessidade de pesquisas e estudos na região como a ocorrência de casos autóctones de LTA e LVA próximos ao parque e a presença de vetores já identificados nas proximidades das áreas a serem estudadas (Assunção Jr et al., 2009 e Rebêlo et al., 2010).

Para entender melhor o ciclo epidemiológico da Leishmaniose nessa Região, este trabalho irá analisar a fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos capturados em povoados do município de Barreirinhas permitindo a identificação dos hospedeiros e indicando os potenciais reservatórios das *Leishmanias* e a taxa de infecção natural desses insetos por *Leishmania*, identificando precisamente quais espécies de *Leishmania* estão parasitando quais espécies de flebotomíneos.

Para isso, a técnica de PCR-RFLP, com digestão de produto amplificado por PCR, utilizando a enzima de restrição *HaeIII* têm sido empregada para diferenciação de *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. amazonensis* e *Le. infantum* desde a sua padronização por Schönian (2003). Esta técnica tem sido bem sucedida para identificação da espécie de *Leishmania* em amostras clínicas e também provenientes de hospedeiros e reservatórios silvestres, sinantrópicos e domésticos. Como por exemplo, para identificação de *Leishmania* em infecções caninas e detecção de infecção natural em flebotomíneos (Dweik et al., 2007; Quaresma et al., 2012). Além disso, a digestão de

amplicons de ITS1, usando enzima de restrição *HaeIII* tem demonstrado ser capaz de distinguir quase todas as espécies de *Leishmania*, e está entre os métodos moleculares atualmente mais utilizados para diagnosticar e identificar *Leishmania* (Buitrago et al., 2011).

No caso de sua aplicação em infecção por *Leishmania* em flebotomíneos, sua sensibilidade melhora o conhecimento das relações hospedeiro-parasita-vetor e presença de infecções latentes, o que é essencial para a interpretação da epidemiologia da doença (Saraiva et al. 2010).

Já a determinação da fonte alimentar sanguínea com base em técnicas de biologia molecular utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase e Polimorfismo de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), é pouco utilizada, mas muito precisa e eficiente e este pode ser considerado como um dos poucos estudos dessa natureza em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana no Maranhão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de Estudo

O estudo foi feito no município de Barreirinhas, detentor de dois terços do PNLM, localizado na Zona Litoral da Baixada Oriental Maranhense e distante 266 km da capital do Estado (**Fig. 1**). Neste município, foram selecionados povoados com base nas notificações dos casos de nos anos de 2012, 2013 e 2014 feitas pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Foi feito um esforço para se coletar em todos os povoados positivos para LTA a fim de obtermos material suficiente e consistente para os estudos de infecção natural e fonte alimentar, além de conhecer a distribuição dos flebotomíneos vetores em áreas representativas do território ao longo de todo o município.

Em cada uma das 62 localidades previamente selecionadas, foram escolhidas 10 casas que continham animais domésticos dispostos no peridomicílio. Esse critério foi considerado importante para as capturas dos flebotomíneos. Além disso, era necessário que essas casas estivessem próximas de matas ou capoeiras. Assim, em cada casa foi instalada uma armadilha luminosa tipo CDC no peridomicílio (abrigos de animais) e outra na mata adjacente, distante no máximo 50 metros da casa,

totalizando 20 armadilhas em cada localidade. O intuito era capturar exemplares de um maior número possível de espécies de flebotomíneos.

As armadilhas foram instaladas a 1,5m de altura, às 18:00 hs e recolhidas às 6:00h da manhã seguinte, uma vez em cada localidade, durante os anos de 2012-2015. Os insetos retidos nas armadilhas foram transportados para o Laboratório de Entomologia e Vetores (LEV) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e colocados em freezers a 4°C. Posteriormente, foram colocados em placa de Petri e submetidos à triagem sob Estereomicroscópio para separar os flebotomíneos de outros insetos e também os flebotomíneos fêmeas dos machos. Os flebotomíneos machos foram processados com hidróxido de potássio, ácido acético, água destilada e lactofenol e após esse procedimento montados em líquido de berlese entre a lâmina e lamínula. Todos os indivíduos machos foram identificados com auxílio de microscópio e da chave dicotômica proposta por Young e Duncan (1994). A captura dos flebotomíneos foi autorizada pelo ICMbio sob nº 46319-1.

Extração de DNA das fêmeas

As fêmeas não ingurgitadas da mesma espécie, provenientes do mesmo dia e do mesmo ponto de coleta foram processadas individualmente ou em grupo de até dez espécimes formando pools variados. As fêmeas que tínhamos convicção que estavam ingurgitadas foram analisadas individualmente, pois as chances de estarem contaminadas eram maiores e, além disso, este DNA seria utilizado na pesquisa de detecção da fonte alimentar sanguínea.

A extração do DNA foi realizada utilizando Kit de Extração de tecidos e células Genra Puregene® da QIAGEN de acordo com o protocolo do fabricante, com pequenas modificações. Dessa forma tórax e abdômen das fêmeas de flebotomíneos foram macerados utilizando um pistilo de plástico. Dispensou-se 200µL de solução de lise celular, adicionado posteriormente 1µL de proteinase K às amostras. A solução foi homogeneizada utilizando um vortex, incubando a amostra à 55°C por uma noite. Após o período de incubação, adicionou-se 1µL de RNase (para uma fêmea ou pool de até cinco espécimes) ou 1,5µL (para pool de cinco a dez fêmeas) à solução, que

foi homogeneizada por inversão e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram incubadas por 1 minuto no gelo, adicionando 100µL de solução de precipitação de proteínas a cada amostra. Os tubos foram vortexados por 20 segundos a alta rotação, seguido de centrifugação por cinco minutos a 14.000rpm, após o que o sobrenadante foi transferido para um tubo novo contendo 300µL de isopropanol o qual foi posteriormente agitado lentamente por inversão cuidadosa por 50X. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo secado invertido sobre um papel absorvente. Adicionou-se 300µL de etanol 70% aos tubos já secados e 30µL de acetato de sódio 3M invertendo-os lentamente por 15X e colocando-os no freezer a -70°C por uma hora. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente, secando o tubo invertendo-o sobre um papel absorvente, adicionando 500µL de etanol 70%, centrifugando por dez minutos a 14.000 rpm, descartando novamente o sobrenadante cuidadosamente, secando o tubo invertendo-o sobre um papel absorvente. Repetiu-se a operação anterior, deixando o tubo invertido sobre um papel absorvente até não sobrar nenhum resquício de álcool. Ao final, adicionou-se 25µL de solução de hidratação de DNA (para uma fêmea ou pool de até cinco espécimes) ou 40µL (para pool de seis a dez fêmeas), sendo os tubos estocados ao final a uma temperatura de -20°C.

Reação de PCR para avaliar a presença de DNA de flebotomíneos

Para avaliar o sucesso da extração do DNA foram realizadas PCR com os iniciadores: [5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3' 5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3'] que amplificam a região IVS6 do gene da cacofonia, constitutivo do gênero *Lutzomyia*, de acordo com protocolo estabelecido por Lins *et al.* 2002.

Para as reações de PCR utilizou-se o Kit *Pure Taq Ready To Go PCR Beads* (Amersham Biosciences), composto de reagentes sob a forma de pérolas liofilizadas, estáveis à temperatura ambiente, que contêm uma polimerase termoestável (AmpliTaq™ DNA polimerase e fragmento Stoffel), dNTPs (0,4mM de cada dNTP), albumina de soro bovino (2,5µg) e tampão (Tris 10mM contendo MgCl₂ 3mM, KCl 30mM, pH 8,3). A cada tubo contendo uma pérola foram

adicionados 32 μ L de água livre de DNase e RNase, 4 μ L de cada iniciador na concentração de 10pmoles/ μ L. Depois de homogeneizada, a mistura foi distribuída igualmente em quatro tubos (10 μ L), onde foram adicionados 2 μ L de amostra de DNA estimado em 1ng/ μ L e as reações foram submetidas ao termociclador *MJ Research Warrertown, Mass USA*.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5%, não desnaturante, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Como controles positivos e negativos, em todas as reações, foram utilizados DNA de *L. longipalpis* obtidos da colônia fechada do Departamento de Parasitologia e a reação com todos os componentes sem o DNA. Um marcador de peso molecular de 100pb foi utilizado como padrão de referência (Promega, EUA). Três microlitros do produto da PCR foram adicionados a cinco microlitros do tampão de amostra 5X (azul de bromofenol 0,5%, Xilenocianol 0,5%, Ficoll a 15 %) foram aplicados no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 80 – 100volts por cerca de 1h realizada em tampão TBE 1X (89mM de Tris base pH 8,0; 89mM de ácido bórico e 2,0 mM de EDTA).

Após a corrida, os géis foram colocados em solução fixadora (etanol absoluto a 10% e ácido acético glacial a 0,5%) durante 10min sob agitação suave. Em seguida, os géis foram transferidos para uma solução de nitrato de prata a 0,2% na qual permaneceram sob agitação suave por 10min. Depois os géis foram rapidamente lavados com água deionizada por duas vezes e mergulhados em solução reveladora (NaOH a 3% [p/v] e 0,3% de formaldeído) até a visualização das bandas. Uma vez completada a revelação, os géis foram novamente lavados com água deionizada, colocados em solução fixadora (Santos *et al.* 1993), visualizados no transluminador e fotografados para documentação e análise dos resultados.

Reação de PCR para analisar a presença de DNA de *Leishmania*

Para verificar a presença de *Leishmania spp.* nas amostras de DNA dos flebotomíneos, foram realizadas reações de PCR dirigidas ao fragmento do gene ITS1 (Internal Transcribed Spacer I -ITS I) de *Leishmania*, 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'] (Schonian *et al.* 2003). Para a reação de PCR utilizou-se o Kit *Pure Taq Ready To Go PCR Beads* (Amersham Biosciences), composto de reagentes sob a forma de pérolas liofilizadas, estáveis à temperatura ambiente, como descrito no tópico 4.4.2. Em seguida foram adicionados 2µL do DNA da amostra em 9µL da solução de reagentes que foram submetidos ao termociclador *MJ Research Warrertown, Mass USA*.

Em todas as reações foram utilizadas controles positivos de cepas de referência da Organização Mundial de Saúde de: *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *Le. naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), *Le. shawi* (MCEB/BR/1984/M84408), *Le. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *Le. infantum* (MHOM/1973/BH46) caracterizada como *Le. infantum* por várias metodologias no Laboratório de Biologia de *Leishmania*. Para este trabalho, por se tratar de um Estado com seis diferentes biomas, incluído área amazônica, incluímos em nossos controles positivos espécies presentes na região amazônica, como *L. naiffi*, *L. shawi* e *L. lainsoni*. Como controle negativo foi utilizado todos os reagentes da reação sem o acréscimo de DNA.

Três microlitros de cada produto da PCR dissolvidos em cinco microlitros do tampão de amostra foram aplicados e analisados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 5% (Sambrook *et al.* 1989), corado com nitrato de prata (Santos *et al.* 1993).

Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP) para a identificação da espécie de *Leishmania* spp.

As amostras estudadas que amplificaram um produto de 300-350pb, foram submetidas à digestão pela enzima de restrição *HaeIII*. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 10µL, contendo 0,2µL de *HaeIII* (10U/µL), 1,8µL de tampão da enzima, 3,0µL de H₂O destilada e 5,0µL de produto de 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 pela prata e comparados com os padrões obtidos pela digestão dos produtos da PCR das cepas de referência para

confirmação das espécies.

Reação em Cadeia da Polimerase para detecção da presença da fonte alimentar sanguínea dos flebotomíneos

Para avaliar a presença do DNA da fonte alimentar sanguínea das fêmeas ingurgitadas dos flebotomíneos, serão realizadas reações de PCR com os iniciadores: [CYTB1 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' e CYTB2 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'], que amplificam a região conservada do gene do citocromo *b* (*cytb*) do DNA mitocondrial de vertebrados (Steuber et al. 2005).

Para as reações de PCR será utilizado o Kit *Pure Taq Ready To go PCR Beads* (Amersham Biosciences) como descrito no tópico 4.2.6.4, e as reações serão submetidas ao termociclador *MJ Research Warrertown, Mass USA*.

Em todas as reações serão 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 (*Mesocricetus auratus*), canídeo (*Canis familiares*), ave (*Gallus domesticus*), equino (*Equus caballus*), gentilmente coletado por um médico veterinário da Escola de Veterinária da UFMA em animais presentes na área de estudo, e de marsupial (*Didelphis albiventris*) coletado de um espécime capturado na estação ecológica da UFMG com o uso da licença nº 37950-1. Como controle negativo, serão utilizados todos os reagentes da reação sem o acréscimo de DNA.

Três microlitros de cada produto da reação de PCR serão adicionados em cinco microlitros do tampão de amostra, submetidos à corrida eletroforética em géis de poliacrilamida não desnaturante a 5% corados com nitrato de prata, fotografados para documentação e análise dos resultados.

Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP) para a identificação da fonte alimentar sanguínea

As amostras positivas para o gene do citocromo *b* (*cyt b*) serão submetidas à digestão pela

enzima de restrição *HaeIII* e *MboI*. A reação de digestão será 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 será incubada por 1h a 37°C, os perfis de restrição serão analisados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 5%, corados pela prata e comparados com os perfis de banda produzidos dos controles positivos das amostras sanguíneas dos vertebrados.

RESULTADOS

O estudo resultou na coleta de 9.853 espécimes de flebotomíneos pertencentes a 18 espécies. As espécies dominantes foram *Lu. whitmani* (53,83%), *Lu. longipalpis* (25,60%), *Lu. lenti* (11,69%), *Lu. evandroi* (5,50%) e *Lu. flaviscutellata* (0,87%). As demais espécies representaram 2,51% (**Tabela 1**). A maior abundância de fêmeas (51,37%) em relação os machos (48,63%) deveu-se ao domínio de *L. whitmani*, cujas fêmeas representaram 31,2% da amostra total. Em quase todas as outras espécies houve predomínio de machos.

Das 5.061 fêmeas coletadas, 3.680 participaram do estudo de infecção natural por *Leishmania* spp. Estas fêmeas foram agrupadas em 843 amostras onde foram obedecidos critérios de separação de pools para análise de acordo com povoado de coleta, zona de coleta, espécie e se as fêmeas estavam ingurgitadas ou não.

Considerando os resultados obtidos na reação de PCR para o fragmento do gene de cacofonia, pode-se afirmar que todas as extrações de DNA foram realizadas com sucesso, dado que para todas as amostras houve amplificação do fragmento esperado de 220 pb.

Considerando a positividade das fêmeas de flebotomíneos para a presença de *Leishmania* spp., 48 amostras apresentaram-se positivas para *Leishmania*, utilizando os iniciadores que amplificam a região do ITS1.

Todas as amostras positivas para o gênero *Leishmania* foram caracterizadas individualmente ao nível de espécie pelo corte com endonuclease de restrição *HaeIII*. Da análise de cada uma das 48 amostras positivas foram encontradas 17 amostras com *Lu. longipalpis* positivas

para *Le. infantum*; 02 amostras com *Lu. lenti* positivas para *Le. infantum*; 17 amostras com *Lu. whitmani* positivas para *Le. infantum*, 05 amostras com *Lu. whitmani* positiva para *Le. braziliensis* e 07 amostras de *Lu. flaviscutellata* positivas para *Le. amazonensis*, totalizando as 48 amostras positivas. A **Fig. 2** mostra um exemplo de alguns resultados encontrados.

A **Tabela 2** mostra as taxas de positividade para *Leishmania*. As infecções naturais por *Le. infantum*, foram encontradas em fêmeas capturadas nos peridomicílios dos povoados Anibal, Engenho, Santa Maria, Barra do Sítio e Manoelzinho e no extradomicílio de Santa Maria e Barroão. A espécie *Lu. longipalpis*, vetora de *L. infantum*, mostrou uma taxa de positividade de 3,7% para esta espécie. Enquanto espécies não consideradas vetoras desta *Leishmania* como *Lu. lenti* e *Lu. whitmani* mostraram taxas de infecção de 0,6% e 0,9%, respectivamente.

A taxa de infecção natural por *Le. braziliensis*, foi detectada apenas em Santa Maria e Manoelzinho, em coleta realizada no ambiente peridomiciliar. As taxas de positividade para *Lu. whitmani*, considerada vetora desta espécie de *Leishmania* foi de 0,3%.

Para *Lu. flaviscutellata*, obtivemos uma taxa de infecção de 8% para *Le. amazonensis*. Os indivíduos infectados são provenientes do peridomicílio dos povoados Santa Maria e Canoa e do extradomicílio de Santa Maria.

Das 48 amostras positivas para qualquer uma das espécies de *Leishmania* encontrada 39 espécimes apresentavam-se ingurgitados.

Para fonte alimentar sanguínea, no total de espécimes de flebotomíneos coletados foram analisadas 297 fêmeas ingurgitadas, distribuídas entre as espécies *Lu. whitmani* (132), *Lu. longipalpis* (67), *Lu. flaviscutellata* (39), *Lu. sordellii* (28), *Lu. evandroi* (18), *Lu. lenti* (13).

Foi possível obter produto amplificado em 211 amostras, o que corresponde a 71,04%. Os perfis de restrição obtidos das fêmeas ingurgitadas foram comparados com os perfis de banda produzidos dos controles positivos das amostras sanguíneas dos vertebrados, sendo identificada a fonte sanguínea alimentar dos seguintes hospedeiros: equino (9,0%), humano (1,4%), cão (27,4%), roedor (3,3%), galinha (20,9%) e porco (37,9%).

As fêmeas de *Lu. whitmani*, *Lu. longipalpis* e *Lu. flaviscutellata*, consideradas vetoradas das leishmanioses, se alimentaram principalmente de sangue de porco e cão. Na **tabela 3**, estão detalhadas as fontes de alimentação sanguínea de cada uma das espécies analisadas.

É importante destacar que duas fêmeas de *Lu. whitmani* coletadas no peridomicílio do povoado Santa Maria estavam ingurgitadas com sangue de humano e porco.

DISCUSSÃO

As taxas de infecção encontradas nos flebotomíneos coletados nos povoados do município de Barreirinhas foram relativamente elevadas, quando comparadas com a de alguns estudos que utilizaram abordagens moleculares (Rodríguez et al. 1999, Luz et al., 2000).

Para se ter uma noção, a taxa de infecção de *Le. infantum* encontrada em *Lu. longipalpis*, na ordem de 3,7%, foi muito maior do que a de outros estudos, exceto no de Paiva et al. (2006) que observaram uma taxa de infecção de 3,9% no estado de Mato Grosso do Sul, utilizando técnicas de biologia molecular. Os demais estudos como os de Savani et al. (2009) e Soares et al (2010) observaram uma taxa de infecção de 0,25% em área de proteção localizada no Estado do Mato Grosso do Sul e 1,25%, em área endêmica para LVA na cidade de São Luís/MA, respectivamente. É importante ressaltar que esta espécie de flebotomíneos é comprovadamente o principal vetor *L. infantum* no Brasil.

Para este estudo devemos destacar, que 0,9% dos espécimes de *Lu. whitmani* estudados estavam infectados com *Le. infantum*. Alguns outros trabalhos já vêm relatando a presença desta espécie de *Leishmania* em *Lu. whitmani* que é comprovadamente vetorada de *L. brasiliensis*, causando a Leishmaniose Tegumentar. Saraiva et al. (2010) em sua pesquisa no município de Belo Horizonte/MG, obteve uma taxa de infecção natural de *Le. infantum* para *Lu. whitmani* de 3,8% e sugeriu através de seus experimentos feitos com fêmeas de *Lu. whitmani* ingurgitadas e não ingurgitadas utilizando técnicas de PCR e de reações de hibridização que *Le. infantum* pode colonizar *Lu. whitmani*. Com estes resultados, corroborando com outros trabalhos realizados, sugere-se que testes de competência vetorial sejam feitos para determinar se *Lu. whitmani* é capaz

de transmitir *L. infantum* e caso seja comprovada essa competência, é importante caracterizar o tipo da leishmaniose causada por essa interação parasita-hospedeiro, incluindo a saliva do vetor.

Analisando a taxa de infecção de *Lu. whitmani* por *Le. brasiliensis*, temos apenas 0,3% dos espécimes analisados parasitados por esta espécie de *Leishmania*. Esse resultado nos leva a pensar na probabilidade dos casos da doença ocorridos na região do PNLM serem causados também por *Le. infantum* que também infecta *Le. whitmani*. Isso é factível de ocorrer, pois Vabres et al. (2001) publicou um estudo de caso na França que provou a ocorrência de leishmaniose tegumentar causada por *Le. infantum*.

Por outro lado, considerando a ocorrência simultânea de diferentes espécies de flebotomíneos e de leishmânias, em área de transmissão de LTA, apesar da existência de interação espécie-específica na relação parasita-hospedeiro, não é difícil encontrar casos de infecção cruzada de vetores que, oportunistas, acabam se alimentando nos mesmos reservatórios de leishmânias (fontes sanguíneas). Talvez por isso, a *Le. infantum* infecte além de *Lu. longipalpis*, seu vetor natural, também *Lu. whitmani* e até mesmo *Lu. lenti*, que foi encontrada com taxa de infecção de 0,6%.

Contudo, como estabelecido por Killick-Kendrick (1990), para definir uma espécie de flebotomíneo como veteira de uma determinada espécie de *Leishmania*, é preciso que ela se enquadre nos parâmetros descritos pelo autor, que são aceitos e adotadas pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2007). Os critérios são: ser abundante no foco de leishmaniose, ser antropofílica, apresentar o desenvolvimento dos parasitos no intestino na ausência de sangue, apresentar a maior taxa de infecção natural dentre todas as espécies de flebotomíneos do local de estudo, e o parasito isolado do inseto deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos.

Por fim, encontramos ainda uma taxa de infecção de 8% em *Lu. flaviscutellata* para *L. amazonensis*. Alguns outros estudos já mostraram essa espécie de *Leishmania* parasitando *Lu. flaviscutellata*, mas a maioria deles foi feito com base em técnicas imunológicas como o de Brillante et al. (2015). A ocorrência dessa interação na região estudada é especialmente importante pelo fato *L.*

amazonensis causar uma forma de leishmaniose ocasionalmente anérgica em indivíduos com imunidade comprometida, chamada de Leishmaniose Cutânea Difusa ocorrente no Maranhão, inclusive no vizinho município de Urbano Santo (Costa et al., 1992).

Epidemiologicamente podemos refletir sobre a existência de flebotomíneos infectados com *Leishmania* spp. tanto no peridomicílio quanto no extradomicílio, o que acentua a hipótese de que os casos de LTA e LVA, na área de estudo, estão sendo transmitidos ao homem, no mesmo ambiente onde os flebotomíneos infectados com espécies de patógenos que causam ambas as formas de leishmanioses, estão presentes, isto é no peri e extra domicílios dos próprios povoados.

Quanto aos aspectos relativos às fontes de sangue para os flebotomíneos, faz-se aqui alguns comentários. O estudo do conteúdo intestinal de insetos hematófagos vetores de patógenos é de grande importância ecológica e epidemiológica, pois permite verificar o grau de relação do vetor para com o hospedeiro reservatório infectado, levando a compreensão dos vários componentes do ciclo de transmissão. Algumas espécies de flebotomíneos, por exemplo, se alimentam exclusivamente em um vertebrado específico, enquanto outros são oportunistas e se alimentam de vários hospedeiros, incluindo espécies que servem como reservatórios de *Leishmania* (Christensen et al., 1982; Meece et al., 2005; Oshaghi et al., 2006a).

No presente estudo, a presença de 37,9% dos espécimes encontrados ingurgitados com o sangue de porco, em povoados como Santa Maria e Aníbal, onde a ocorrência de casos de LTA é constante, ao longo dos anos, chamou a atenção. Isso pode inferir o porco como reservatório de espécimes de *Leishmania*. Ainda mais quando duas fêmeas de *Lu. whitmani* coletadas no peridomicílio do povoado Santa Maria estavam infectadas com sangue de humano e porco, o que evidencia o caráter oportunista da espécie, incorporando os mesmos indivíduos, o sangue do ser humano, na sua dieta, além do animal doméstico. Convém esclarecer que este animal (o porco) não tem sido comumente relatado na literatura portando infecção por *Leishmania*. No entanto, na ilha de São Luís, foram encontrados porcos infectados com leishmania na forma amastigota, em uma área de foco de LTA (Brazil et al., 1987). Na verdade neste estudo foi relatado o primeiro encontro de porco

infectado com leishmânia. Embora o porco possa atuar como boa fonte de infecção para flebotomíneos, devido ao grande número de formas amastigotas na lesão, segundo os autores, sua importância epidemiológica requer maiores estudos, pois foi observada a cicatrização espontânea da lesão 50 dias após o diagnóstico.

A presença de *Lu. whitmani* e *Lu. longipalpis* alimentados em uma grande variedade de vertebrados, mostra que estas são espécies oportunistas e as coloca em posição de destaque e relevância epidemiológica, pois podem fornecer dados que irão subsidiar a escolha, pelos órgãos competentes, dos métodos de controle da doença mais adequados à situação atual.

Como a transmissão da LTA tem aumentado no ambiente doméstico e há registros de infecção em cães, cresce a suspeita de que esses animais possam atuar como reservatórios de *Leishmania* sp. (Reithinger et al., 1999). Contudo, Vexenat et al. (1986) verificaram que *Lu. whitmani* infectava-se com *L. braziliensis* quando alimentados em áreas ulceradas, mas não quando alimentados em áreas não ulceradas da pele de cães infectados. Pirmez et al. (1988) não conseguiram isolar o parasita da pele normal de cães e Rangel et al. (1990) mostraram que flebotomíneos alimentavam-se menos frequentemente em humanos e cães do que em equídeos. Assim, o papel do cão no ciclo doméstico de transmissão da LTA permanece polêmico. Falqueto et al. (1986) observaram nítida relação entre a presença de cães infectados e a ocorrência de novos casos humanos da doença e propuseram que a doença estivesse sendo mantida pelos cães domésticos, corroborando as observações de Oliveira-Neto et al. (1988), de que os casos caninos de LTA antecedem a ocorrência dos casos humanos. A constatação da leishmaniose tegumentar canina sob as formas sintomática e subclínica em regiões onde também ocorreram casos humanos sugere que o cão pode representar algum papel na cadeia de transmissão da LTA (Santos et al., 2005), o que torna importante investigar a infecção por

Leishmania sp. em cães, bem como relacioná-la com os casos de LTA humana (Pittner et al, 2009).

Quanto aos roedores, neste estudo foram sugados por flebotomíneos nos ambientes peridomiciliares. Este é um aspecto importante, pois sabe-se que roedores se infectam com *Le. amazonensis* e *Le. braziliensis*. Existe relato de que no Brasil, *Bolomys lasiurus* e *Rattus rattus* foram encontrados infectados por *Le. braziliensis* por meio de eletroforese enzimática *multilocus*. Do mesmo modo, tem-se relato também de roedores selvagens terrestres como *Proechimys* spp., *Oryzomys* spp., *Nectomys* sp., *Neacomys* sp. e *Dasyprocta* encontrados infectados por *Le. amazonensis* (Lainson, 2010). A aproximação desses roedores para os peridomicílios poderia incrementar populações de leishmânias nesses ambientes e dessa forma aumentar a probabilidade de transmissão da LTA em humanos por meio de flebotomíneos peridomiciliados.

Diante dos resultados encontrados podemos concluir que as espécies de *Le. infantum*, *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis*, são os parasitas que estão circulando nas áreas estudadas e que provavelmente são os agentes que estão produzindo os casos de leishmanioses em humanos.

Efetivamente o que pudemos estabelecer no presente estudo foi a presença de *Le. braziliensis* parasitando *Lu. whitmani* e *Le. infantum* parasitando *Lu. longipalpis*, *Lu. lenti* e *Lu. whitmani*, as três espécies de flebotomíneos mais abundantes. E inferimos ainda a possibilidade de *Le. infantum* causar além de LVA, também a LTA, a nível local. Para esclarecer melhor este e outros aspectos do ciclo de transmissão das leishmanioses em Barreirinhas, esclarecemos ainda que porco, cão, galinha e equinos foram as fontes alimentares mais encontradas nos flebotomíneos e que dentre estes, cão, porco e equino, devem ser os principais potenciais reservatórios das espécies de *Leishmania* que circulam na

região, caracterizando a transmissão como peridomiciliar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às comunidades de Barreirinhas, ao Centro Municipal de Saúde de Barreirinhas, à Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Tabela 1: Números de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados nos povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de setembro de 2012 a agosto de 2015.

Espécies	Macho		Fêmea		Total	
	n	%	N	%	n	%
<i>Lu. whitmani</i>	2.233	46,60	3.071	60,68	5.304	53,83
<i>Lu. longipalpis</i>	1.273	26,57	1.249	24,68	2.522	25,60
<i>Lu. lenti</i>	787	16,42	365	7,21	1152	11,69
<i>Lu. evandroi</i>	315	6,57	227	4,49	542	5,50
<i>Lu. flaviscutellata</i>	35	0,73	51	1,01	86	0,87
<i>Lu. sordelli</i>	46	0,96	21	0,41	67	0,68
<i>Lu. trinidadensis</i>	26	0,54	12	0,24	38	0,39
<i>Lu. oswaldoi</i>	23	0,48	15	0,30	38	0,39
<i>Lu. infraspinosa</i>	13	0,27	12	0,24	25	0,25
<i>Lu. wellcomei</i>	13	0,27	12	0,24	25	0,25
<i>Lu. Pinotti</i>	8	0,17	15	0,30	23	0,23
<i>Lu. termitophila</i>	6	0,13	8	0,16	14	0,14
<i>Lu. richardward</i>	7	0,15	3	0,06	10	0,10
<i>Lu. goiana</i>	2	0,04	0	0,00	2	0,02
<i>Lu. monstruosa</i>	2	0,04	0	0,00	2	0,02
<i>Lu. antunesi</i>	1	0,02	0	0,00	1	0,01
<i>Lu. migonei</i>	1	0,02	0	0,00	1	0,01
<i>Lu. shannoni</i>	1	0,02	0	0,00	1	0,01
Números de indivíduos	4.792	48,63	5.061	51,37	9.853	100
Números de espécies	18		13		18	

Tabela 2: Taxa de positividade para *Leishmania* por espécie de flebotomíneos capturados, nos povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de setembro de 2012 a agosto de 2015.

Espécies	Total de fêmeas pesquisadas	N° de amostras positivas	N° de amostras por <i>sp</i> de <i>Leishmania</i>		
			<i>L. infantum</i>	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
<i>Lu. longipalpis</i>	456	17	17 (3,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Lu. lenti</i>	319	2	2 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Lu. whitmani</i>	1913	22	17 (0,9%)	5 (0,3%)	0 (0,0%)
<i>Lu. flaviscutelata</i>	88	7	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (8,0%)
TOTAL	2.776	48	36	5	7

Tabela 3: Espécies de flebotomíneos e suas respectivas fontes alimentares, como mostradas pelos perfis de restrição do fragmento amplificado do gene do *cyt b*, de sangue de diferentes animais, depois de digerido com a endonucleases *HaeIII* e/ou *MboI* Proveniente do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão. Setembro de 2012 a Agosto de 2015.

Espécies	Equino		Humano		Cão		Roedor		Galinha		Porco		
	Total	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Lu. whitmani</i>	132	12	63,2	2	66,7	27	46,6	7	100,0	23	52,3	33	41,3
<i>Lu. lenti</i>	13	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	4,5	6	7,5
<i>Lu. longipalpis</i>	67	5	26,3	0	0,0	21	36,2	0	0,0	6	13,6	19	23,8
<i>Lu. evandroi</i>	18	1	5,3	0	0,0	5	8,6	0	0,0	6	13,6	5	6,3
<i>Lu. sordelli</i>	28	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	4,5	8	10,0
<i>Lu. flaviscutellata</i>	39	1	5,3	1	33,3	5	8,6	0	0,0	5	11,4	9	11,3
Total	297	19	100,0	3	100,0	58	100,0	7	100,0	44	100,0	80	100,0

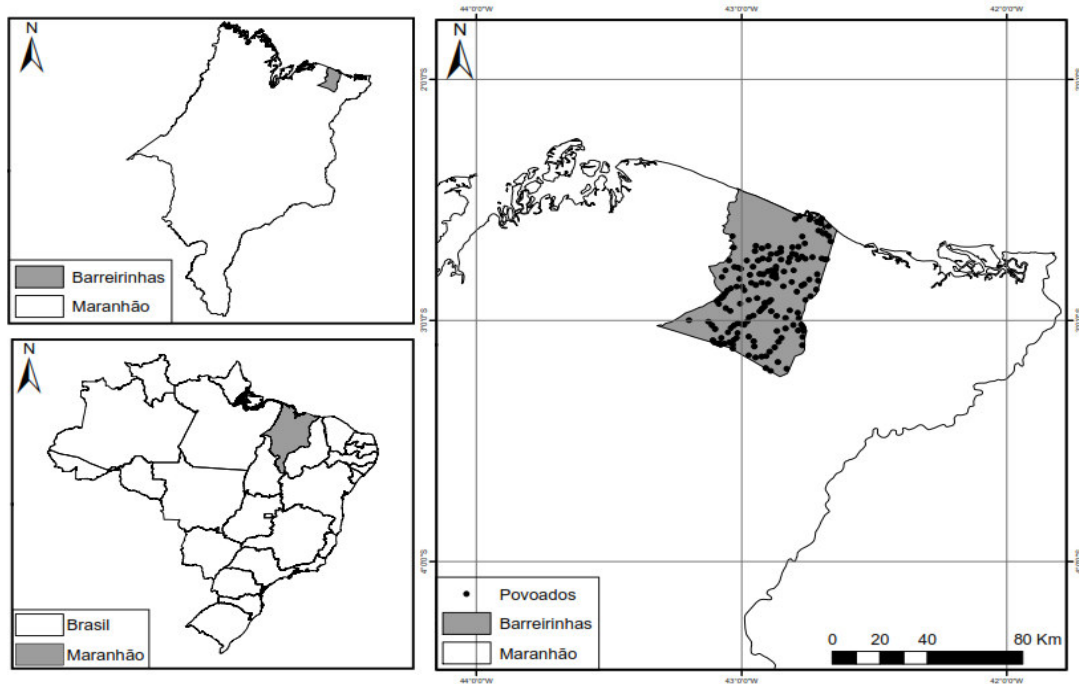


FIG. 1. Mapa do estado do Maranhão, Brasil, mostrando o município de Barreirinhas, onde realizamos o presente estudo.

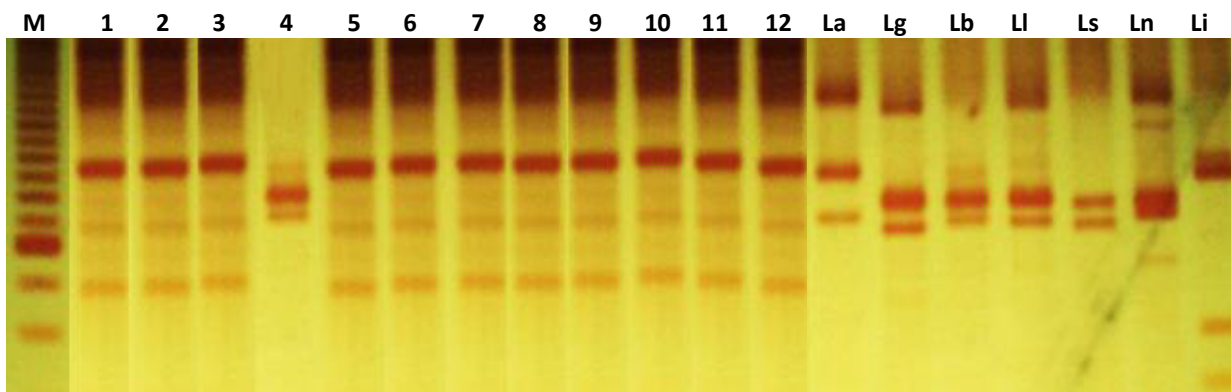


FIG. 2. Gel de poliacrilamida 5%, corado com nitrato de prata, mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *Hae*III. Canaletas: M – marcador de peso molecular (100pb); 1-12 (Fêmeas positivas de *Lutzomyia* do estudo): 1-3 – *Leishmania infantum* (*Lu. longipalpis*); 4 – *Leishmania brasiliensis* (*Lu. whitmani*); 5-6 – *Leishmania infantum* (*Lu. lentis*); 7-12 – *Leishmania infantum* (*Lu. whitmani*); La – controle positivo de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); Lg – controle positivo de *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); Lb – controle positivo de *Leishmania brasiliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); Ll – controle positivo de *Leishmania lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426); Ls – controle positivo de *Leishmania shawi* (MCEB/BR/1984/M84408); Ln – controle positivo de *Leishmania naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533); Li – controle positivo de *Leishmania infantum* (MHOM/1973/BH46).

Referencias citadas

- Aguiar GM & Medeiros WM 2003.** Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207- 255.
- Assunção Júnior AN, Silva O, Moraes JLP, Nascimento FRF, Oliveira-Pereira YN, Costa JML, Rebêlo JMM 2009.** Foco emergente de leishmaniose tegumentar (LT) no entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Nordeste, Brasil. *Gazeta Medica da Bahia* 79(3): 103-109.
- Barata RA, Franca-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Fiuza J, Lorosa ES, Macedo CG, Paula KM, Dias ES 2005.** Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(5): 421-425.
- Brasil – Ministério da Saúde 2003.** *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 120 pp.
- Brasil – Ministério da Saúde 2007.** *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 180 pp.
- Brazil, R. P.; Nascimento, M.D.S.B. and Macau, R.P. 1987.** Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por leishmania em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de São Luis, Maranhão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82:145-145.
- Brilhante, A.F., Nunes, V.L.B., Kohatsu, K.A., Galati, E.A.B., Rocca, M.E.G. & Ishikawa, E.A.Y. 2015.** Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in an area of ecotourism in Central-Western Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21, 3-3, 2015
- Buitrago R, Cupollilo E, Bastents B, Lê Pont F, Martinez E, Barnabé C, Breniere SF 2011.** PCR – RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution* 11(3): 557 – 563.
- Chaves, L. F., J. M. Cohen, M. Pascual, and M. L. Wilson. 2008.** Social exclusion modulates climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. *PloS Negl. Trop. Dis.* 2: e176.
- Desjeux P 2004 et al.** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Dweik A, Schönian G, Mosleh IM, Karanis P.** Evaluation of PCR-RFLP (based on

ITS-1 and Hae III) for the detection of leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101: 399-407.

FAPEMA – Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão 2012. Preservação da Vida. In: *Revista Inovação* 17: 49-50.

Galati EAB 2003. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p.23-51.

Gontijo, C.M.F., E. S. Silva, R. S. Pacheco, E. S. Dias, F. S. Oliveira, E. M. Michalsky, C. S. Margonari, and M. N. Melo. 2005. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Araçuaí Minas Gerais state, Brazil. *Rev. Soc. Iberoam. Inform. Cient. (SIIC)*. (<http://www.siicsalud.com/dato/dat043/05623013.htm>)

Herwaldt, B. L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199

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

Leonardo FS & Rebêlo JMM 2004. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37(3): 282-284.

Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Dedet JA, Pandey A, Thomaz-Soccol V 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, Southern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 623-631.

Margonari, C. S., C. L. Fortes-Dias, and E. S. Dias. 2004. Genetic variability of *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in four geographical Brazilian populations by RAPD-PCR. *J. Med. Entomol.* 41: 187-192.

Margonari, C. S., C. R. Freitas, R. C. Ribeiro, A.C.M. Moura, M. Timbo', A. H. Gripp, J. E. Pessanha, and E. S. Dias. 2006. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 31-38.

Meece JK, Reynolds CE, Stockwell PJ, Jenson TA, Christensen JE, Reed KD 2005. Identification of Mosquito Bloodmeal Source by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profile Analysis of the Cytochrome B Gene. *J Med Entomol* 42(4):657-667.

Membrive NA, Rodrigues G, Membrive U, Monteiro WM, Neitzke HC, Lonardoni MVC, Silveira TGV, Teodoro U 2004. Flebotomíneos de municípios do norte do estado do Paraná, Sul do Brasil. *Entomol Vect* 11: 673-80.

Molina AL & PR Tobo 2004. Uso das técnicas de Biologia Molecular para diagnóstico. *Einstein* 2 (2):139-142.

Nascimento MDSB, Silva MH, Viana GMC, Leonardo FS, Bezerra GFB, Silva ASG, Soares VCP, Pereira SRF, Rebêlo JMM, Brazil RP. 2013. Spatial dynamics of urban populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Caxias, State of Maranhão, Brazil, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.46 no.5 Uberaba Sept./Oct.

Neto, J. C., G. L. Werneck, and C.H.N. Costa. 2009. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí, state Brazil. Cad. Saúde Pública, 25: 1543-1551.

Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, Malafronte RS 2006. Detection and identification of Leishmania species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Trop 99: 252-259.

Pirmez, C.; Coutinho, S.G.; Marzochi, M.C.A. et al. 1988. Canine american cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. Am. J. Med. Hyg. 38:52-58.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Trans R Soc Trop Med Hyg 99: 905-913.

Quaresma PF, Carvalho GML, Ramos MCN, Andrade Filho JD 2012. Natural Leishmania sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 107(4): 480-485.

Rangel, E.F.; Azevedo, A.C.; Andrade, C.A. et al. Wermelinger, E.D. 1990. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.85, p.39-45.

Rêbello JMM 2011. *O vento, o mar e a areia*. Scortecci, São Paulo, 232 pp.

Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS 2000a. Flebotomíneos da Amazônia maranhense. IV. Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. Entomol Vect 7: 61-72.

Reithinger, R.; Davies, C.R. 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J. Trop. Med. Hyg., v.61, p.530-541.

Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 93: 47-49.

Sacks D, Kamhawi S 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55: 453-83.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva S de O, Andrade AS, Melo MN 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8): 1033-1039.

Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 160: 18-24.

Savani, ESMM.; Camargo, MCGO; Carvalho, MR; Zampieri, RA; Santos, MG; D'áuria, SRN.; Shaw, JJ. 2004. Floeter-winter, LM The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Short communication. *Veterinary Parasitology*, 120:229-233.

Santos, G.P.L.; Sanavria, A.; Marzochi, M.C.A. et al. 2005. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, p.161-166.

Soares, M.R.A.; 2006. Distribuição de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e infecção natural por *Leishmania chagasi* na ilha de São Luís-MA, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão. 67.

Vabres P, Marty P, Kauffmann-Lacroix C, and Larregue M. 2001. Imported cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* confirmed with immunoassay. *Ann Dermatol Venereol* 128: 1047-1050,

Vexenat, J.A.; Barreto, A.C.; Rosa, A.C. 1986. Experimental infection of *Lutzomyia whitmani* in dog infected with *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, v.81, p.125-126.

Young DC, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem of Entomol Institute* 54: 881pp.

Normas da Revista Journal of Medical Entomology

Manuscript Preparation

SUBMIT YOUR MANUSCRIPT

You may submit your manuscript using our online submission system, [ScholarOne](#).

MANUSCRIPT PREPARATION

In order to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) with regard to nomenclatural works, ALL articles, regardless of whether they include nomenclatural information, that are published in *Journal of Medical Entomology* will be immutable from October 1, 2015; this means that no changes will be allowed to any article without the publication of an erratum clearly stating the changes that have been made. Therefore, it is the responsibility of the authors to carefully check their proofs for accuracy, and to notify the publisher of any changes that are necessary prior to Advance Access publication.

You will be asked during the submission process whether your article contains a nomenclatural act. If it does, in order to comply with ICZN regulations, the Editorial Office will register your article in ZooBank on your behalf and will insert a nomenclatural statement, which includes a Life Science Identifier (LSID), into the article. Your article will also include the online publication date, and the statement “Version of Record, first published online [online publication date], with fixed content and layout in compliance with Art. 8.1.3.2 ICZN.” Following publication, the Editorial Office will update your ZooBank entry with the DOI, Volume, and Issue information.

Order of Elements

Order of Elements are as follows: title page; Abstract and key words; introduction (no heading); Materials and Methods; Results; Discussion (or Results and Discussion); Acknowledgments; References Cited; footnotes; tables; figure legends; and figures.

The introduction should clearly state the basis of your study along with the background of the problem and a statement of purpose. The Materials and Methods section should include a clear and concise description of the study design, experimental execution, materials, and method of statistical analysis. Results should be clearly differentiated from the interpretation of your findings in the Results section or within the Results and Discussion. Cite tables and figures in numerical order as they should appear in the text. Include suggestions for direction of future studies, if appropriate.

Title Page

The title page should include the name, complete address, phone number, fax number, and e-mail address of corresponding author.

Include a running head of <65 characters, including author names. *Example:* Smith and Jones: Biological Control of *C. capitata* (no period). For more than two authors, use the senior author's name followed by et al. *Example:* Smith et al.: Biological Control of *C. capitata* (no period).

Include the section of the journal.

The title should be concise and informative. Include either the ESA approved common name of the subject or its scientific name, but not both. Common names used in the title must be listed in the ESA Common Names of Insects & Related Organisms. Do not include authors of scientific names in the title. Do not capitalize the following words in the title or subheadings: a, an, and, as, at, be, by, for, in, of, on, per, to, the. Insert (Order: Family) immediately after the name of the organism.

Affiliation line includes a complete address. If appropriate, designate current addresses for all authors by numbered footnotes (superscripted numbers) placed at the bottom of the title page. *Example:*

¹Department of Entomology, University of Colorado, 345 East 7th Street, Denver, CO 78095.

Include all authors' names below the title. Footnote numbers are placed outside commas in multi-authored articles.

Abstract

On a separate page, provide an abstract of fewer than 250 words. Give scientific name and authority at first mention of the subject organism. Do not cite references, figures, tables, probability levels, or results. Refer to results only in the general sense.

Keywords

Place three to five keywords, separated by commas, on a line below the abstract. Use only singular words/nouns. Spell out scientific names (e.g., spell out *Aedes albopictus* instead of *Ae. albopictus*). Do not combine different subjects as one key word (e.g., "pesticides and grass," should be two separate keywords, "pesticide, grass." Do not use scientific names and common name at the same time as one key word [e.g., use "coffee, *Coffea Arabica*" (as 2 key words) instead of coffee (*Coffea Arabica*).

Optional foreign language abstract: All articles will have an English abstract. However, to encourage international communication, authors may include a second abstract in a language other than English. (Spanish, French, German, Russian, Portuguese, Chinese, or Japanese are accepted.) It is the author's responsibility to provide an accurate, and grammatically correct non-English version. Do not repeat the keywords.

Heading Levels

First-level headings are centered and boldfaced on their own line. Initial capital letters. Used to divide the manuscript into major sections (e.g., Materials and Methods, Results).

Second-level headings are flush left, boldface, and are also on their own line with initial capital letters. Second-level headings are rarely used except in taxonomic articles where multiple levels of headings may be necessary.)

Third-level headings are boldfaced, paragraph indented, have initial capital letters, and are followed by a period. Third-level headings are used to divide first-level sections into smaller sections.

Fourth-level headings are italicized (but not boldfaced), paragraph indented, have initial capital letters, follow immediately after a third-level heading or start a new paragraph, and are followed by a period. Fourth-level headings are used to divide third-level sections into smaller sections.

In-Text Citations

Single Author

(Smith 1993)

Two Authors

(Smith and Jones 1993)

Multiple Citations

(Smith 1996, Smith et al. 1997, Jones 1998)

Multiple Publications by Same Author(s)

(Smith et al. 1995a, 1995b, 1997; Jones 1996)

Personal Communications

(Jones 1988; L. J. Smith, personal communication). Obtain and forward (at submission) a letter of permission to use citations to personal communications (from those other than authors).

Unpublished Data

(L.J.S., unpublished data) for one author or (unpublished data) for all authors. Obtain and forward (at submission) a letter of permission to use citations to unpublished data (from those other than authors).

In Press

(Smith 1997) for in press, cite projected year of publication.

Software

(PROC GLM, SAS Institute 1999) for software user's manual.

Manufacturers

In parentheses, provide manufacturer's name and location (city, state) and model number of relevant materials and equipment. Example: (Model 3000, LI-COR, Lincoln, NE). Use generic names when possible (e.g., self-sealing plastic bags).

Reporting Requirements for Statistical Tests

All data reported (except for descriptive biology) must be subjected to statistical analysis. Descriptive biology should include information such as sample sizes and number of replications. Authors are responsible for the statistical method selected and for the accuracy of their data. Authors should be able to justify the use of a particular statistical test when requested by an editor. Results of statistical tests may be presented in the text, in tables, and in figures. Statistical methods should be described in Materials and Methods with appropriate references. Experimental designs should also be described fully in Materials and Methods. Descriptions should include information such as sample sizes and number of replications. See specific section in this style guide for suggestions on formatting statistical results. Only *t*-tests and analyses of variance require no citation. Cite the computer program user's manual in the References Cited.

Abbreviations

Sentences should not start with an abbreviation or new acronym. For example: use: "*Aedes aegypti* is a mosquito." Don't use: "*Ae. aegypti* is a mosquito." For example: use "Plaque forming units...." and not "PFU...." ESA accepted acronyms such as DNA or PCR can be used but should be discouraged.

Mosquito species abbreviations in the text or tables should always be two letters. For example: *Ae. aegypti* and not *A. aegypti*. Subject editors should ensure that the correct abbreviations are used, especially for *Aedes*. For example: *Aedes aegypti* and not *Stegomyia aegypti*. Note: Other species groups use a single

letter abbreviation; for example: *Ixodes scapularis* should be abbreviated as *I. scapularis* unless defined in the text.

Probit/logit

When presenting results of probit/logit analysis, these columns should be included in tables (in this order, left to right); n, slope + SE, LD (or LC) (95% CL), and chi-square. When a ratio of one LD versus another is given, it should be given with its 95% CI.

Statistical tests to show what model best fits data intended to estimate the 99.9986% level of effectiveness should be presented to justify use of any model, including the probit model. Thus, we do not recommend use of the Probit 9 without tests to show that the probit model fits the data.

Analysis of Variance or *t*-test

When presenting the results of analysis of variance or a *t*-test, specify *F* (or *t*) values, degrees of freedom, and *P* values. This information may be placed in parentheses in the text. Example: (*F* = 9.26; df = 4, 26; *P* < 0.001). If readability of the text is affected by the presence of repeated parenthetical statistical statements, place them in a table.

Regression

In regressions, specify the model, define all variables, and provide estimates of variances for parameters and the residual mean-square error. Italicize variables in equations and text.

Variance and sample size

Include an estimate of the variance and sample size for each mean regardless of the method chosen for unplanned multiple comparisons. The use of Duncan's Multiple Range Test (DMRT) is not acceptable as a *mean separation test* as it is no longer commonly accepted as a method for *post hoc* mean separation analysis.

Model Analysis

At the beginning of the manuscript, authors should state clearly the goals of their model construction and analysis. Evaluation by reviewers depends upon these goals and the type of model. Authors should attempt to describe the main conclusions, limitations, and sensitivity of results to assumptions. For stochastic models, describe the variability in the results.

Modeling Guidelines

The following guidelines pertain to any mathematical model calculated for purposes other than statistical analysis. Authors must adequately describe both model structure and model analysis. Authors must explain and justify original equations and computer programs or justify the selection of a published software package used in the computation of models. Model structure and steps in the analysis must be described in the Materials and Methods section. Without presenting extensive computer code, the text must permit an understanding of the model that would allow most mathematically inclined scientists to duplicate the work. Present all equations that represent the biology of the system being modeled. Unless their derivation is self-evident, show how the equations were derived and mention the underlying assumptions. Express how the equations are solved over time and space. Provide references for standard techniques (e.g., matrix manipulation, integration). Define all variables and parameters in each equation and describe their units (e.g., time, space, and mass). In the Materials and Methods or Results section, present the range of parameter values included in the model, and describe the uncertainty in or range of validity of these values.

Equations

Consult *Mathematics into Type* for correct formatting of equations and mathematical variables. Italicize all mathematical variables. Center more complex equations on a separate line.

$$R = A \text{ barrtype} + B \log 10 (f)$$

(2)

Validation or the Testing of Model Results

Authors must state why the model did not require testing (e.g., theoretical study), why it cannot be tested (e.g., lack of data), or how it was tested. Data used for testing must be independent of data used to build or calibrate the model. Describe the data and procedures in Materials and Methods. Authors should be aware that the testing of models is an important step that should be a part of most studies.

Structure of Computer Code

For models solved or simulated by computers, mention the programming language and computer used. Describe the important numerical methods used in calculating the model (e.g., integration and random number generation). Mention how the program's logic and algorithms were tested and verified. When published software is computed, provide a reference and state which procedures were used. Discuss in any section of the manuscript the limitations of the published software. Original computer programs should be made available at the request of reviewers and readers.

Gene Sequencing

Inclusion of a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and amino acid sequence data is a criterion for the acceptance of a manuscript for publication. Sequences from new species and new genes must indicate the proportion of the gene sequenced and should include data from both strands. The accession number may be included in the original manuscript or the sequence may be provided for review and an accession number provided when the manuscript is revised. A manuscript will not be accepted for publication until the accession number is provided.

GenBank may be contacted at their website at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html>. The EMBL Data Library may be contacted at their website at <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>.

Reporting Taxonomy

Follow the *International Code of Zoological Nomenclature*, 4th ed., for taxonomic style. Center the heading that indicates the name of the taxon in bold type. Center figure numbers in parentheses under the main heading; do not use bold type. Start all synonymies at the left margin with runovers indented. Include authors and date. References must appear in References Cited section. Use telegraphic style throughout descriptions.

Taxonomy Headings

Use only acceptable 3rd-level subheadings such as:

- Male
- Female
- Material Examined
- Type Material

- Distribution
- Etymology
- Biology
- Discussion

Avoid using Description as a subheading.

Dates

Use Roman numerals I through XII to designate month of collection. Use Arabic numerals 00 through 99 to designate collection years in the 20th century. Do not abbreviate other years, including the 21st century.

Express data in this format: day-month (use a Roman numeral)-year. Example: 2-V-97.

Locality Other than Principal Types

Start with the largest area followed by successively smaller areas separated by colons. Capitalize countries. Arrange data for each locality in the following order: count of specimens and sex or stage (as applicable), city or vicinity, date, collector, and depository. Example: MEXICO: Tamaulipas: 1 male, 1 female, Ciudad Mante, 15-III-97, K. Haack; 5 females, Ciudad Victoria, 3-VII-99, C. Hughes, MCZ. Arrange localities alphabetically. Use a semicolon to separate data for different localities. Define depositories in the Materials and Methods.

Type Material

Start description with the principal type in capital letters. Follow this immediately with count and sex of specimens (use male and female symbols if possible), then place additional data in the order of locality, date, additional data, and collector. Separate these items with commas. Example: HOLOTYPE: 1 male, Locust Grove, VA, 22-X-98, on *Cercis canadensis*, R. H. Foote. PARATYPES: 2 males, same data.

Voucher Specimens

Voucher specimens of arthropods serve as future reference for published names used in scientific publications. Although the deposition of voucher specimens is not required as a condition for publication, authors are encouraged to deposit specimens in an established, permanent collection and to note in the published article that the expected deposition has been made and its location. Authors should contact the curator of a voucher repository before deposition concerning the procedures required for curation to ensure that the collection will accept the voucher materials. The designation and proper labeling of voucher specimens is the author's responsibility. When available, at least three specimens should be deposited. Each specimen should have the following information provided at the time of deposition:

- Standard label data that are required for the specimens collection (i.e., locality, date of collection, collector, host, ecological data, whether the specimen is from a laboratory collection, etc.).
- An identification label that includes the identifier and date of identification.
- A label that designates the specimen as "voucher."

Acknowledgments

Place the acknowledgments after the text. Organize acknowledgments in paragraph form in the following order: persons (omit all professional titles and degrees), groups, granting institutions, grant numbers, and serial publication number.

Human and Animal Use in Research and Testing

For research articles that involved the use of humans or animals, the Entomological Society of America

requires that the following types of notification, as applicable, be included in the acknowledgement section of the article.

Humans. All human subjects work should reference approved Internal Review Board protocols or compliance with Health Insurance Portability and Accountability Act information policies for their organization, if the protocols are not available.

Animals. All studies should reference an approved Institutional Animal Care and Use Committee protocol or similar documents from their institutions. For trapping/collecting wild animals/birds, reference to collecting permits at the national or state level should be referenced.

Pathogens. Reference should be made to Biological Use Authorization approved by an institutional Environmental Health and Safety committee or similar body.

Sample notification: The collection and infection of wild birds with encephalitis viruses was done under Protocol 11184 approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of California, Davis, California Resident Scientific Collection Permit 801049-02 by the State of California Department of Fish and Game, and Federal Fish and Wildlife Permit No. MB082812-0. Use of arboviruses was approved under Biological Use Authorization #0554 by Environmental Health and Safety of the University of California, Davis, and USDA Permit #47901.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Potential conflicts of interest include any relationships of a financial or personal nature between an author or coauthor and individuals or organizations within three years of submission which, in theory, could affect or bias an author's scientific judgment, or limit an author's freedom to publish, analyze, discuss, or interpret relevant data. Sources of financial support originating outside the coauthors' home institution(s) for any aspect of a study must be indicated in the Acknowledgments section of the paper. Financial support includes not only funding, but gratis provision of materials, services, or equipment. Any additional potential conflicts of interest, not covered in the acknowledgments of financial support, must be revealed to the editor at submission, and disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments. If an author or coauthor has entered into an agreement with any entity outside that authors' home institution, including the home institution of another coauthor, giving that entity veto power over publication of the study or over presentation, analysis, discussion, or interpretation of any results of the study, whether or not such veto power was exercised, this information must be disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments. As a suggestion, such a statement could take the following form: "This manuscript is published with the concurrence of [*Institution / Company / Individual / etc. X*]." If no potential conflicts of interest exist, this must be stated in the cover letter to the editor at submission.

REFERENCES CITED

Cite only those articles published or formally accepted for publication (in press). Include all references mentioned in text. Include enough information to allow reader to obtain cited material (e.g., book and proceedings citations must include name and location [city and state or country] of publisher). Abbreviate journal titles according to the most recent issue of BIOSIS Serial Sources. For non-English titled journals that are cited in the references, the title of the journal should be spelled out, and not

abbreviated. Systematics-related articles may specify that all serial titles be spelled out for final publication. Citations and References should not be numbered.

Alphabetical order (chronological for one author or more than two authors, and alphabetical order [by surname of second author] for two authors)

Journal Articles

Evans, M. A. 2000. Article title: subtitle (begin with lowercase after colon or dash unless first word is a proper noun). J. Abbr. 00:000–000.

Evans, M. A. 2001a. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A. 2001b. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., and R. Burns. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., and A. Tyler. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., A. Tyler, and H. H. Munro. 2000. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., R. Burns, and A. A. Dunn. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

In Press

Evans, M. A. 2002. Article title. J. Econ. Entomol. (in press).

Books

Burns, R. 2001. Title (initial cap only): subtitle (no initial cap after colon). Publisher, city, state abbreviation or country.

Evans, M. A. 2001. Colorado potato beetle, 2nd ed. Publisher, city, state abbreviation or country.

Tyler, A. 2001. Western corn rootworm, vol. 2. Publisher, city, state abbreviation or country.

Article/Chapter in Book

Tyler, A. 2001. Article or chapter title, pp. 000–000. *In* T.A.J. Royer and R. B. Burns (eds.), Book title. Publisher, city, state abbreviation or country.

Tyler, A., R.S.T. Smith, and H. Brown. 2001. Onion thrips control, pp. 178–195. *In* R. S. Green and P. W. White (eds.), Book title, vol. 13. Entomological Society of America, Lanham, MD.

No Author Given

(USDA) U.S. Department of Agriculture. 2001. Title. USDA, Beltsville, MD.

(IRRI) International Rice Research Institute. 2001. Title. IRRI, City, State or Country.

Patents

Harred, J. F., A. R. Knight, and J. S. McIntyre, inventors; Dow Chemical Company, assignee. 1972 Apr 4. Epoxidation process. U.S. patent 3,654,317.

Proceedings

Martin, P. D., J. Kuhlman, and S. Moore. 2001. Yield effects of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) feeding, pp. 345–356. *In* Proceedings, 19th Illinois Cooperative Extension Service Spray School, 24–27 June 1985, Chicago, IL. Publisher, City, State.

Rossignol, P. A. 2001. Parasite modification of mosquito probing behavior, pp. 25–28. *In* T. W. Scott and J. Grumstrup-Scott (eds.), Proceedings, Symposium: the Role of Vector-Host Interactions in Disease Transmission. National Conference of the Entomological Society of America, 10 December 1985, Hollywood, FL. Miscellaneous Publication 68. Entomological Society of America, Lanham, MD.

Theses/Dissertations

James, H. 2001. Thesis or dissertation title. M.S. thesis or Ph.D. dissertation, University of Pennsylvania, Philadelphia.

Software

SAS Institute. 2001. PROC user's manual, version 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.

Online Citations

Reisen, W. 2001. Title. Complete URL (protocol://host.name/path/file.name) and/or DOI (Digital Object Identifier)

Tables

Place tables after the References Cited section. Double-space and number all tables. Boldface table title. Do not repeat data already presented in text. If a table continues on more than one page, repeat column headings on subsequent page(s).

Title

Title should be short and descriptive. Boldface table number and title only. Include "means + SEM" in title if applicable. Do not footnote title; use the unlettered first footnote to include general information necessary to understand the title (e.g., define terms, abbreviations, and statistical tests).

Lines

Use horizontal lines to separate title from column headings, column headings from data field, and data field from footnotes. Do not use vertical lines to separate columns. All columns must have headings.

Abbreviations

Use approved abbreviations. Use abbreviations already defined in the text and define others in the general footnote. Use the following abbreviations in the body or column headings of tables only: amt (amount), avg (average), concn (concentration), diam (diameter), exp (experiment), ht (height), max (maximum), min. (minimum), no. (number), prepn (preparation), temp (temperature), vs (versus), vol (volume), wt (weight). Use the following abbreviations for months: Jan., Feb., Mar., April, May, June, July, Aug., Sept., Oct., Nov., and Dec.

Operational Signs

Repeat operational signs throughout data field. Insert a space on either side of sign (1.42 ± 1.36).

Spacing

Leave no space between lowercase letters and their preceding values (e.g., 731.2ab).

Footnotes to Tables

Use footnotes to define or clarify column headings or specific datum within the data field. Do not footnote the title; use the unlettered first footnote to include general information necessary to understand the table (e.g., define terms, abbreviations, and statistical tests). The use of asterisks is reserved for statistical significance only.

Example:

Means within a column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$; Student *t*-test [Abbott 1925]). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; NS, not significant).

Use lowercase italicized superscripted letters to indicate footnotes. Footnote letters should appear in the table in consecutive order, from left to right across the table then down the page.

Figures

For review purposes, it is acceptable to include figures, whether in black and white or color, as part of the manuscript file, with each figure on a separate page. Figures should be inserted in the manuscript file in one of the following formats:

- Tagged Image File Format (.tif)* (please check settings when exporting to TIFF from the original application).
- Encapsulated PostScript (.eps)*
- Rich Text Format (.rtf)
- Editable Microsoft Word (.doc/.docx) (image files embedded into Word are often not good quality)
- Editable Microsoft PowerPoint (.ppt/.pptx) (image files embedded into PowerPoint are often not good quality).
- Microsoft Excel (.xls/.xlsx)
- Editable Portable Document Format (PDF)
- Postscript (.ps)
- Photoshop (.psd)
- Adobe Illustrator (.ai)
- Graphics Interchange Format (.gif)
- Portable Network Graphics (.png)

GIF formats, such as from websites, are not acceptable and produce poor quality printouts because of low resolution, even for peer review purposes. Charts from Excel and SigmaPlot should not be inserted unless they are in one of the above formats.

Maximum figure sizes are as follows:

- Maximum height: 240 mm (9 inches)
- Maximum width (2-column figure): 171 mm (6 inches)
- Maximum width (1-column figure): 82 mm (3 inches)

When authors are asked to submit revisions, they are also asked to provide all figures as separate, high-quality image files to allow papers to move quickly and efficiently into production upon acceptance.

For more information on preparing figures, see OUP's Author Resource Centre on [figures](#).

Abbreviations and Symbols

Abbreviations and symbols in figures should match those in the text or be defined in legends.

Figure Captions

Type all captions double-spaced on a separate page. All captions should be in paragraph form as shown by the example below.

Fig. 1. Relationship between percentage of defoliation of oak trees and gypsy moth population density. (A) Defoliation and egg mass density. (B) Defoliation of egg density.

Letter locants on figures composed of more than one element should match those in the text (either upper- or lowercase). Do not use equal signs to define abbreviations; use commas (e.g., Ap, barometric pressure).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Material may be submitted in the form of one or more (8 maximum) files to accompany the online version of an article. Such material often consists of large tables, data sets, or videos which normally are not possible or convenient to present in print media. Supplemental Material represents substantive information to be posted on the ESA journal website that enhances and enriches the information presented in the main body of a paper. However, the paper must stand on its own without the need for the reader to access the supplemental information to understand and judge the merits of the paper. Any files containing Supplemental Material must be provided at the time of manuscript submission, and will be distributed to reviewers as part of the normal peer-review process. Authors should alert the editor to the presence of Supplementary Material in their cover letter at submission. Once a paper is published, the content of accompanying Supplemental Material files cannot be altered. Although the content of any submitted Supplementary Material is subject to normal peer-review and any changes required by the editor, no copy editing will be performed by the journal's production staff. Therefore, the authors are responsible for suitable format and final appearance of Supplemental Material after acceptance of the paper.

Supplemental Material should be referenced in the body of the main paper (e.g., Supp. Table S1; Supp. Video S1), where a link will take the online reader to the file. Each supplemental file must be labeled with an appropriate title and prefaced by a short (50 words maximum) summary description of the contents. Within each file, any tables, figures, videos, or other material must be accompanied by an appropriate caption. Citations for any literature referenced within a Supplemental Material file should be listed in a References Cited section at the end of the file, even when a citation is duplicated in the main body of the paper. Videos should be brief (< 5 min) and kept to a reasonable size to facilitate downloading by readers.

NOTES ON TERMINOLOGY

Scientific Names

Scientific names and authorities must be spelled out (except for Fabricius and Linnaeus, which are abbreviated as F. and L., respectively) the first time a species is mentioned in the abstract and again in the main body of text.

Common Names

Use only those common names cited in the current *ESA Common Names of Insects & Related Organisms* online database, or those names approved by the ESA Common Names Committee. Do not use any other common name. Do not abbreviate common names (e.g., CPB for Colorado potato beetle). Give scientific name and authority at first mention of each organism (including plants) in the abstract and again in the text.

Use of "Stadium," "Stage," and "Instar"

Manuscripts received for publication in ESA periodicals refer to arthropods and the periods of time in their development in various ways. These designations should be used consistently.

Stadium (Plural: Stadia): The period of time between two successive molts.

Stage: One of the successive principal divisions in the life cycle of an arthropod (e.g., egg, nymph, larva, prepupa, pupa, subimago, and adult).

Instar: The arthropod itself between two successive molts. For the purposes of the definition, hatching is considered a molt.

Examples of Usage:

Nymphs feed on the underside of leaves during the first stadium.

Larvae of some dermestids go through an indefinite number of stadia (or have an indefinite number of instars).

The nymphs were reared through the fifth stadium. Immature stages (e.g., eggs, larvae, and pupae; eggs and nymphs) are illustrated.

First instar of cerambycids make galleries in wood.

Some 200 first-instar spiderlings were collected. The predators fed readily on early instars of the face fly.

NOTES ON FORMATTING

Capitalization

Do not capitalize the following words in titles or subheadings: a, an, and, as, at, be, by, for, in, of, on, per, to, the.

Abbreviations

Use standard abbreviations as listed in the Council of Science Editors' *Scientific Style and Format, The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 8th ed., or those listed in this guide. Avoid nonstandard abbreviations.

Abbreviations for Time

Use the following abbreviations for time: h (hour), min (minute), s (second), yr (year), mo (month), wk (week), d (day). Do not add "s" to create plurals (e.g., wks).

Fig./Figs.

Use "Fig." if singular and "Figs." if plural (e.g., Fig. 1; Figs. 2 and 3).

Dates

When citing dates in the text (not in tables or taxonomic reports), do not abbreviate month, and use this format: 26 January 1997.

Metric Units

Use metric units. English units may follow within parentheses only if they are of direct practical purpose.

Liter

Do not abbreviate "liter" by itself or when accompanied by a numeral.

% versus percentage

Use "%" only with numerals and in tables and figures. Close up space to numerals (e.g., 50%). Otherwise, use the word percentage (e.g., percentage of defoliation).

Per versus slash

Use "per" rather than a slash unless reporting measurements in unit to unit (e.g., insects per branch, not insects/branch; but g/cm², not g per cm²).

Numbers

Spell out numbers at the beginning of a sentence. Spell out the numbers one through nine (10 and up are always used as numerals), unless they are used as units of measure (e.g., eight children, three dogs, 8 g, 3 ft, 0600 hours; NOT 8 children, 3 dogs, eight grams, three feet, or six o'clock am). This includes spelling out the ordinals first through ninth, along with twofold, one-way ANOVA, and one-half. Ordinals from 10 and higher are numerals, such as 10th or 51st. In some cases, such as where there is a long list of items (e.g., 8 flies, 6 mosquitoes, 4 butterflies, and 10 bees), exceptions can be made if the editor concurs. The editorial staff will have flexibility in interpreting the rule.

Zeros with P values

All numbers <1 must be preceded by a zero (e.g., $P < 0.05$).

Commas

When a number is >1,000, use a comma to separate hundreds from thousands.

Semicolon

Use a semicolon to separate different types of citations (Fig. 4; Table 2).

Repeating symbols

It is not necessary to repeat symbols or units of measure in a series (e.g., 30, 40, and 60%, respectively).

Footnotes to the Text

Avoid footnotes in the text. Use unnumbered footnotes only for disclaimers and animal use information. Place all footnotes on a separate page after References Cited. Examples of footnotes are:

This article reports the results of research only. Mention of a proprietary product does not constitute an endorsement or a recommendation by the USDA for its use.

In conducting the research described in this report, the investigators adhered to the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals," as promulgated by the Committee on Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council. The facilities are fully accredited by the American Association of Laboratory Animal Care.

Crossref Funding Data Registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please click [here](#).

THIRD-PARTY CONTENT IN OPEN ACCESS PAPERS

If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you **do not** have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content

Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]

This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

Language Editing

Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers is optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please click [here](#).

Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these.

Authors are liable for all costs associated with such services.

CAPITULO III

Estudo epidemiológico e banco de dados espacial para análise de risco da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses

Autores: Raquel Silva Fonteles^a, Antônia Suely Guimarães Silva^a, Adalberto Alves Pereira Filho^b, Jorge Luiz Pinto Moraes^b, Bruno Leite^b, Jonas Jansen Mendes^c, José Manuel Macário Rebêlo^{b,*}.

^a. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA.

^b. Laboratório de Entomologia e Vetores, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA.

^c. Laboratório de Geoprocessamento, Curso de Engenharia Ambiental, Universidade CEUMA, São Luís - MA.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil epidemiológico da LTA, levando em consideração os fatores demográficos (faixa etária e sexo), ocupacionais e temporais das populações acometidas (casos notificados); demonstrar através de um mapa a distribuição espaço temporal dos casos de LTA; elaborar um inquérito entomológico da fauna flebotomínica da região estudada, estabelecendo fatores como riqueza, diversidade, dominância e abundância das espécies de acordo com a localidade e ambientes de coleta e por fim, fizemos a associação de variáveis ligadas ao ciclo de transmissão da LTA, criando um banco de dados para determinar a taxa de risco para LTA em base geográfica distribuída espacialmente. Para isso foram realizadas coletas de dados referentes aos casos humanos nos arquivos do Centro Municipal de Saúde (CMS) de Barreirinhas e no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN e foram feitas coletas de flebotomíneos em povoados selecionados no município de Barreirinhas durante 36 meses e em seguida os dados adquiridos foram compilados em um software SIG na qual estabelecemos espacialmente as localidades de maior e menor risco de aquisição de LTA em Barreirinhas. Como resultados mostramos 458 casos positivos de LTA entre os anos de 2007 e 2013 sendo que os homens provenientes da zona rural e lavradores foram os mais acometidos. De acordo com a distribuição espaço temporal a maioria dos casos estão concentrado na região centro-sul do município ao longo dos anos. A maior riqueza de espécies foi no extradomicílio e o povoado de Anibal foi o que apresentou maior riqueza. Foram coletados no total 9.853 espécimes de flebotomíneos provalecendo *Lu. whitmani* (53,83%), *Lu. longipalpis* (25,60%), *Lu. lenti* (11,69%), *Lu. evandroi* (5,50%) e *Lu. flaviscutellata*. Quanto a taxa de risco, os povoados de Barra do Sitio, Engenho e Manoelzinho foram os que apresentaram positividade para todas as variáveis estudadas.

Palavras-chave: epidemiologia, LTA, taxa de risco, Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses

***Endereço para correspondência:**

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo. Laboratório de Entomologia e Vetores. Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão. Praça Madre Deus 2, São Luís, MA - Brasil. CEP 65025-560. e-mail: macariorebelo@uol.com.br

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa de elevada prevalência em áreas tropicais e subtropicais do mundo. É causada por várias espécies do protozoário do gênero *Leishmania* e é transmitida pela picada de diferentes espécies de flebotomíneos.

No Brasil, a partir da década de 1980, verificou-se um crescimento tanto no número de casos de LTA registrados quanto na sua expansão geográfica e, a partir de 2003, foram confirmados casos de LTA em todos os estados brasileiros (Ministério da Saúde, 2007). A epidemiologia da leishmaniose segue dois padrões: primeiro, os de surtos epidêmicos associados ao desmatamento para construção de estradas e exploração de recursos para a expansão da agricultura; segundo, os de casos em áreas de colonização antiga relacionados à urbanização da periferia de centros urbanos (Ministério da Saúde, 2000).

No município de Barreirinhas, que abrange 2/3 do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses - PNLM possui atualmente um dos maiores coeficientes de detecção de LTA do Estado do Maranhão e apesar disso, suas características epidemiológicas ainda não foram adequadamente estudadas.

O PNLM é de grande importância por tratar-se de uma unidade de conservação brasileira de proteção integral à natureza, ou seja, são áreas protegidas por lei e dedicadas à proteção da biodiversidade (Brasil, 2013b). É formado pela sucessão de dunas de areia que encerram inúmeras lagoas distribuídas em 155 mil hectares de área do litoral nordeste do Estado (D'Antona, 2000).

Por tratar-se de um local de muitas belezas naturais, o avanço do turismo se faz sentir a cada dia, principalmente, depois da abertura da estrada MA-225, no início de 2002, e do impulso na rede hoteleira (Rebêlo, 2011). Esse crescente avanço do turismo vem alterando principalmente, o ritmo de Barreirinhas, a principal porta de entrada no PNLM, além de interferir no comportamento da população, não apenas da cidade, mas também daqueles que vivem nos povoados dentro do Parque e na área do entorno (Rêbello 2011; FAPEMA, 2012). Essa atividade econômica, embora de grande importância para a região e o Estado do Maranhão, vem sendo desenvolvida de maneira predatória e sem o devido planejamento. Dessa forma a região torna-se vulnerável e fragilizada, principalmente porque políticas públicas, que dão proteção ao meio ambiente na região adjacentes do PNLM, ainda são incipientes e isoladas, resultando em diversos processos de degradação ambiental.

Os municípios que compõem a região dos Lençóis Maranhenses, incluindo Barreirinhas, também não apresentam infraestrutura básica (e.g. não há rede de esgotos e aterros sanitários em qualquer dos municípios) que dêem suporte a este turismo. Assim, essas mudanças vêm causando impacto na epidemiologia da LTA, a principal forma de leishmaniose encontrada nas áreas do entorno do PNLM, sobretudo no município de Barreirinhas, onde tem sido observado um aumento no número de casos nos últimos anos.

Do período de 2000 a 2008 foram registrados 737 casos na região, distribuídos em 120 localidades, situação que põe o município em posição de destaque no cenário estadual das leishmanioses.

Estudos anteriores demonstraram endemicidade de casos de LTA no município de Barreirinhas – MA, onde se localiza o PNLM. Sabe-se que pesquisas demonstraram que remanescentes de matas ciliares, parques ecológicos e áreas de conservação podem abrigar vetores e quando estão próximos a núcleos populacionais, como é o caso, gera grande preocupação para saúde pública pela maior probabilidade de contato homem-vetor. Além

disso, a busca por lazer, atividades de educação ambiental, visitação a áreas de preservação do parque, e realização de projetos de pesquisa, tornam possível um maior contato dos vetores com a população.

Existem ainda outros fatores que demonstram a necessidade de pesquisas e estudos na região como a ocorrência de casos autóctones próximos ao parque e a presença de vetores já identificados nas proximidades das áreas a serem estudadas.

Assim observa-se a necessidade de estudos aprofundados que demonstram a interferência de fatores e características ambientais sobre a fauna de flebotômíneos na região do PNLM e as relações ambiente-homem-vetor, com o intuito de delimitar áreas de maior possibilidade de transmissão de leishmanioses na região e fornecer subsídios para o desenvolvimento de um projeto integrado com os serviços locais de saúde pública e órgãos ambientais, e gerar um mapa informativo capaz de facilitar análise por parte das autoridades quanto à probabilidade de transmissão da doença, visando sempre sua prevenção.

Diante do que foi exposto estudou-se as características epidemiológicas da LTA em Barreirinhas e criamos uma ferramenta em base cartográfica para demonstrar a taxa de risco da doença por localidade. Além disso, determinou-se o perfil epidemiológico da LTA, levando em consideração os fatores demográficos (faixa etária e sexo), ocupacionais e temporais das populações acometidas (casos notificados); demonstramos através de um mapa a distribuição espaço temporal dos casos de LTA; elaboramos um inquérito entomológico da fauna flebotomínica da região estudada, estabelecendo fatores como riqueza, diversidade, dominância e abundância das espécies de acordo com a localidade e ambientes de coleta; por fim, fizemos a associação de variáveis ligadas ao ciclo de transmissão da LTA, criando um banco de dados para determinar a taxa de risco para LTA em base geográfica distribuída espacialmente.

2 MATERIAIS E METODOS

Área de Estudo. O estudo foi feito no município de Barreirinhas (Figura 1), detentor de dois terços do PNLM, localizado na Zona Litoral da Baixada Oriental Maranhense distante 266 km da capital do Estado, interligando-se a São Luís por meio de rodovia asfaltada, a MA 402. Tem seu ponto central localizado à 2° 45' S e 42° 5' W e é regionalizado pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) como pertencente à mesorregião do Norte Maranhense, microrregião dos Lençóis Maranhenses. Apresenta uma área territorial de 3.111 km² e uma população de 39.669 habitantes, sendo 13.209 habitantes na zona urbana e 26.460 na zona rural (IBGE, 2004).

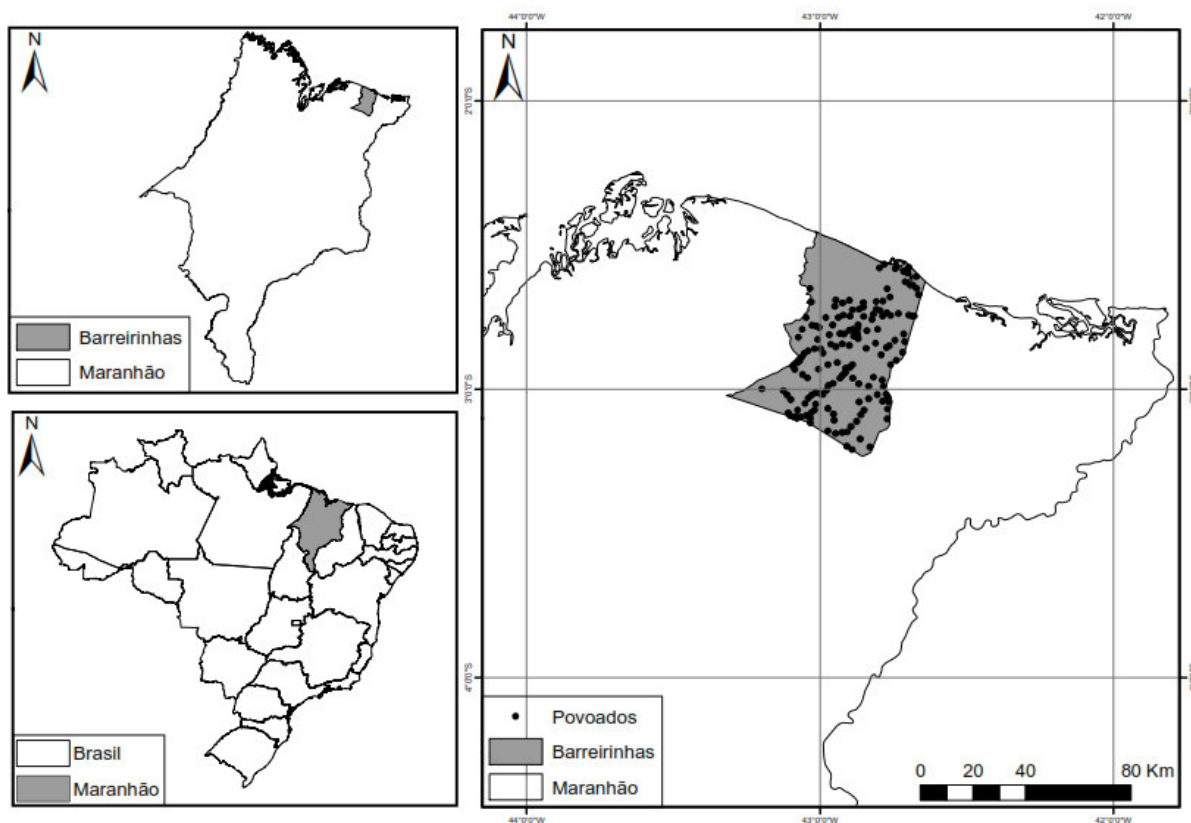


Figura 1. Mapa do estado do Maranhão, Brasil, mostrando o município de Barreirinhas, onde realizamos o presente estudo.

Levantamento amostral de casos humanos por localidade e caracterização do perfil epidemiológico da LTA. Para o levantamento amostral de casos humanos por localidade e determinação do perfil epidemiológico em função de variáveis demográficas (sexo e faixa etária), ocupacional (ocupação) e temporais (mês, ano e estações) foram realizadas coletas desses dados nos arquivos do Centro Municipal de Saúde (CMS) de Barreirinhas e no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Em seguidas essas informações foram tabuladas e analisadas estatisticamente.

Análise retrospectiva, distribuição espaço temporal e elaboração do mapa para casos de LTA. As análises retrospectivas e distribuição espaço temporal dos casos de LTA nos povoados de Barreirinhas foram estabelecidas a partir do banco de dados existente nos arquivos do Centro Municipal de Saúde (CMS) de Barreirinhas e no SINAN. A partir desses dados foi elaborado um mapa que demonstra a evolução da doença em função do ano e localidade. Esse mapa foi feito a partir de uma ferramenta de representação cartográfica da evolução de casos por ano. Utilizou-se um software SIG (Sistema de Informação Geográfica), para a realização de Interpolação Espacial, um conjunto de técnicas que visam à criação de uma superfície contínua a partir das amostras pontuais, sendo estas, a quantidade de casos por cada ano. O método de interpolação utilizado foi o inverso ponderado da distância, onde calcula-se a média ponderada pela distância entre o ponto a ser interpolado e os pontos ao seu entorno. O método possui uma tendência de formar contornos concêntricos ao redor dos

pontos de amostragem. Segundo Souza (2011) essa tendência é explicada também pelo caráter estatístico do método, de forma que a influência de cada ponto tende a ter um raio de ação definido de forma igual em todas as direções o que possibilita a formação de círculos.

Seleção das localidades positivas para LTA para a coleta de flebotomíneos. A seleção dos povoados foi estabelecida com base nas notificações dos casos de LTA em Barreirinhas nos anos de 2012, 2013 e 2014 feitas pelo SINAN. Foi feito um esforço para se coletar em todos os povoados positivos para obtermos material suficiente e consistente para as análises necessárias, além de conhecer a distribuição dos flebotomíneos vetores em áreas representativas do território ao longo de todo o município. Contudo, foi possível estudar apenas 62 localidades, as quais foram georreferenciadas, sendo as coordenadas obtidas com o auxílio de um aparelho de GPS, no ponto central da localidade escolhida para coleta desses dados.

Inquérito entomológico para obtenção de dados sobre as espécies de flebotomíneos. Em cada uma das localidades previamente selecionadas foram selecionadas 10 casas que continham abrigos de animais domésticos. Em cada casa foram instaladas duas armadilhas luminosas tipo CDC., sendo uma no peridomicílio (abrigo de animais doméstico) e a outra no extradomicílio (capoeira adjacente), distante cerca de 50 m. No total, foram instaladas 20 armadilhas em cada povoado. O intuito era capturar exemplares de um maior número possível de espécies de flebotomíneos. As armadilhas foram instaladas a 1,5m de altura, às 18:00 hs e recolhidas às 6:00h da manhã seguinte, uma vez em cada localidade. Os insetos retidos nas armadilhas foram transportados para o Laboratório de Entomologia e Vetores (LEV) do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e colocados em freezers a -4°C. Posteriormente, foram colocados em placa de Petri e submetidos à triagem sob estereomicroscópio para separar os flebotomíneos de outros insetos e também as fêmeas dos machos. Os flebotomíneos machos foram processados com hidróxido de potássio, ácido acético, água destilada e lactofenol e após esse procedimento montados em líquido de berlese entre a lâmina e lamínula. Todos os indivíduos machos foram identificados com auxílio de microscópio e da chave dicotômica proposta por Young e Duncan (1994). As fêmeas foram dissecadas para isolamento da espermateca para efeito de identificação e utilizadas para análises moleculares.

Abundância e diversidade de espécimes de flebotomíneos. Essas variáveis foram obtidas a partir de coletas realizadas nos povoados. Para a análise da abundância relativa das populações de flebotomíneos e seus limites de confiança, foi utilizado o método de Kato (1952), onde as espécies foram consideradas dominantes quando seu limite de confiança inferior foi maior que o limite superior para espécies ausentes. O índice de diversidade foi calculado pela fórmula de Margalef (1949), conforme Service (1993).

Taxa de risco para LTA em base geográfica distribuída espacialmente. Para elaboração da ferramenta em base cartográfica, com o intuito de demonstrar taxa de risco de LTA por povoado em Barreirinhas, foi feito inicialmente um banco de dados com variáveis importantes no ciclo de transmissão da LTA. Entre as variáveis cita-se: espécies de flebotomíneos encontrados; espécies de *Leishmania* infectando vetores; e fonte alimentar dos transmissores obtidos nesta mesma pesquisa realizada em Barreirinhas, mas objeto de outros artigos. A cada variável estabelecida como componente do banco de dados, foi aplicada uma valoração de acordo com seu grau de importância na transmissão da LTA: Presença de flebotomíneos (1); Presença de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas (2); Presença de flebotomíneos considerados vetores (3); Presença de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas

com sangue de potenciais reservatórios de *Leishmania* (3); Presença de flebotomíneos parasitados com *Leishmania* (5); A partir daí, os dados de cada povoado com suas respectivas valorações foram enviados ao software SIG denominado ArcGis e em seguida foi realizado o método de Interpolação Espacial, estabelecendo espacialmente as localidades de maior e menor risco de aquisição de LTA.

Análises Estatísticas. Para as análises estatísticas foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição binomial negativa, utilizando o pacote estatístico MASS (Venables & Ripley, 2002) do ambiente computacional R (R Core Team, 2016).

3. RESULTADOS

Perfil Epidemiológico da LTA no município de Barreirinhas. No Município de Barreirinhas, foram registrados 458 casos positivos de LTA entre os anos de 2007 e 2013 (Tabela 1). Observou-se maior número em 2012 (90 casos) e menor número de casos em 2009 (39 casos). A análise da distribuição do número de casos por sexo, resultou em um maior número de casos entre os homens do que nas mulheres. A análise estatística (GLM com distribuição binomial negativa) dessa distribuição mostrou que sexo masculino teve significativamente maior número de casos ($p < 0,001$) e que este gênero possui 2.03 vezes mais chances de adquirir LTA que o sexo feminino.

Quando analisamos a ocorrência da doença em relação à faixa etária, observamos que a maioria dos casos ocorreu em indivíduos adultos e que estatisticamente (GLM com distribuição binomial negativa) essa diferença foi significativa ($p < 0,05$) e mostrou que as crianças tem 2 vezes menos chances de adquirir a doença quando comparado com as chances do adulto e que os idosos tem 2,2 vezes menos chances também quando comparados aos adultos.

Para o cruzamento dos casos de LTA com a ocupação dos indivíduos acometidos com esta doença entre os anos de 2007 e 2013, observamos que a ocupação de lavrador foi à única que teve o número de casos significativamente maior que as demais ($p < 0,001$) e sua correlação estatística mostrou e as chances de um(a) lavrador(a) adquirir LTA é 5,1 vezes maior que um agente comunitário por exemplo. Não houve aumento ou diminuição significativo dos números de casos por ocupação, quando comparados os anos, sendo que a variação foi sempre proporcional ao número de casos notificados durante o ano. Foram consideradas também outras ocupações como estudante, aposentado, comerciante, professor, agente comunitário de saúde, encanador, motorista e zelador.

O ambiente em cada paciente vive, também foi analisado e mostrou que na zona rural obteve-se o maior número de casos e quando aplicamos os testes estatísticos, essa maioria na área rural foi significativa em relação às zonas urbana e periurbana ($p < 0,001$), sendo que quem vive na zona rural tem 2,5 vezes mais chances de se infectar pelo protozoário da *Leishmania* que quem vive na zona periurbana.

Quando correlacionamos os dados das variáveis estudadas para análise da significância de suas interações, obtivemos que houve interação significativa positiva entre o sexo masculino e a ocupação de lavrador ($p < 0,001$) e que as chances de um indivíduo do sexo masculino e lavrador adquirir LTA é 4,7 vezes maior que de uma agente comunitária feminina, por exemplo. Outra interação significativa, foi quando correlacionamos a faixa etária com o sexo, obtivemos que os indivíduos do sexo masculinos e idosos têm 2,2 vezes

menos chances de adquirir LTA que os indivíduos do sexo feminino e adultas e que os indivíduos do sexo masculino e adultos tem 2,2 vezes mais chances de serem acometidos com a doença que as mulheres adultas.

Tabela 1. Correlação dos números de casos de LTA, de acordo com os gêneros, faixas-etárias, ocupações e localidades de procedência dos indivíduos acometidos, no município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de 2007 a 2013 de acordo com fatores analisados.

Femenino				Masculino			
Idade	Ocupação	Localidade	Nº de casos	Idade	Ocupação	Localidade	Nº de casos
Adulto	Lavrador	Rural	24	Adulto	Lavrador	Rural	178
Adulto	Lavrador	Urbano	3	Adulto	Lavrador	Urbano	6
Adulto	Lavrador	Periurbano	2	Adulto	Lavrador	Periurbano	14
Adulto	Ag. Comunitário	Rural	3	Adulto	Ag. Comunitário	Rural	3
Adulto	Ag.e Comunitário	Urbano	7	Adulto	Ag. Comunitário	Urbano	7
Adulto	Ag. Comunitário	Periurbano	1	Adulto	Ag. Comunitário	Periurbano	1
Adulto	Comerciante	Rural	1	Adulto	Comerciante	Rural	0
Adulto	Comerciante	Urbano	8	Adulto	Comerciante	Urbano	12
Adulto	Comerciante	Periurbano	4	Adulto	Comerciante	Periurbano	3
Adulto	Doméstica	Rural	12	Adulto	Doméstico	Rural	1
Adulto	Doméstica	Urbano	19	Adulto	Doméstico	Urbano	2
Adulto	Doméstica	Periurbano	4	Adulto	Doméstico	Periurbano	0
Adulto	Encanador	Urbano	0	Adulto	Encanador	Urbano	3
Adulto	Mecanico	Urbano	0	Adulto	Mecanico	Urbano	2
Adulto	Morotista	Urbano	0	Adulto	Morotista	Urbano	4
Adulto	Professora	Rural	4	Adulto	Professor	Rural	6
Adulto	Professora	Urbano	5	Adulto	Professor	Urbano	4
Adulto	Professora	Periurbano	2	Adulto	Professor	Periurbano	3
Adulto	Zelador	Rural	3	Adulto	Zelador	Urbano	1
Adulto	Zelador	Periurbano	2	Adulto	Zelador	Periurbano	1
Criança	Estudante	Rural	12	Criança	Estudante	Rural	16
Idoso	Aposentado	Rural	11	Idoso	Aposentado	Rural	15
Idoso	Aposentado	Urbano	3	Idoso	Aposentado	Urbano	2
Idoso	Aposentado	Periurbano	3	Idoso	Aposentado	Periurbano	1
Jovem	Estudante	Rural	16	Jovem	Estudante	Rural	24

Assim podemos determinar que os indivíduos adultos, do sexo masculino, de ocupação lavrador e moradores da zona rural foram os mais acometidos pela LTA de 2007 a 2013 em Barreirinhas, mostrando que padrão de transmissão da doença ainda é em sua maior parte rural e que a transmissão pode está ocorrendo na intra ou peridomicílio, de indivíduos que moram na zona rural ou no extradomicílio, no momento em que os lavradores estão no campo realizando suas atividades. É importante ressaltar ainda, que as demais variáveis também

devem ser levadas em consideração, pois contribuíram juntas significativamente para compor os casos de LTA em Barreirinhas ao longo desses 7 anos.

Apesar da maior parte dos indivíduos acometidos com LTA serem adultos do sexo masculino e com ocupação de lavrador, podemos observar que a transmissão está ocorrendo também nas zonas urbanas e periurbanas indicando a urbanização do vetor e a presença de reservatórios nestes ambientes.

Na figura 2 observa-se que houve uma distribuição da LTA durante todos os meses do período estudado, com casuística elevada em janeiro, outubro, novembro e dezembro, coincidindo com o período de estiagem e transição deste com o chuvoso. Da mesma forma, observou-se a menor concentração da doença no período de maiores índices pluviométricos.

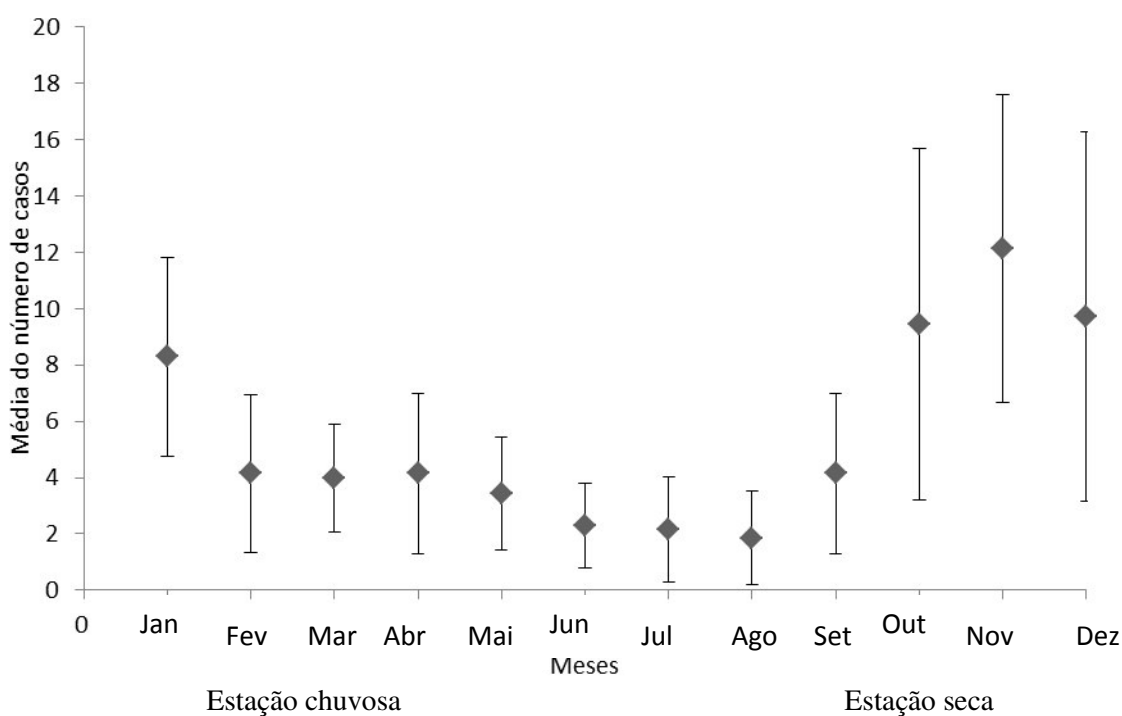


Figura 2. Média e desvio padrão do número de casos de LTA por mês no município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de 2007 a 2013.

Na figura 3, estamos correlacionando a distribuição mensal de cada ano com o número de casos de lavradores acometidos com a LTA e observamos que o padrão se manteve igual a média anual para todos os casos demonstrado na figura 2, ou seja, as notificações de registro da LTA feitas pelos lavradores se deu em sua maioria nos meses de outubro a janeiro como mostra os picos na figura 3, na qual, podemos inferir que a contaminação se deu alguns meses antes no período da estiagem onde normalmente os lavradores realizam as colheitas e em seguida preparam a terra para novo plantio e como LTA é uma doença de evolução lenta, as notificações só foram feitas meses depois.

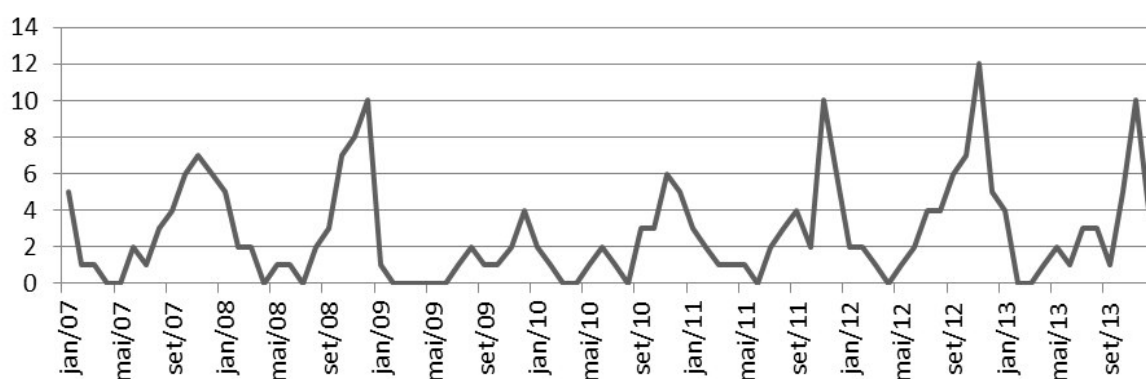


Figura 3. Número de casos de LTA em lavradores por mês no município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de 2007 a 2013.

Distribuição dos casos de acordo com os fatores espaço-temporais. No período estudado, foram identificados casos positivos de LTA em 122 povoados. Quase todos esses povoados são de características rurais com precárias condições de higiene e saneamento básico. Pela análise da figura 4 observa-se que a ocorrência de casos de LTA está concentrada na região centro-sul do município com uma estabilidade ao longo de todos os anos estudados e focos de estado crítico (maiores incidências) pontuais dentro desta região. No ano de 2012, podemos observar um deslocamento dos casos, no espaço físico do município, para a região norte, com a maioria dos povoados em estado crítico se localizando nesta região. O mesmo padrão não acontece no ano seguinte (2013) que volta a manter a maioria dos casos notificados na região centro-sul de Barreirinhas.

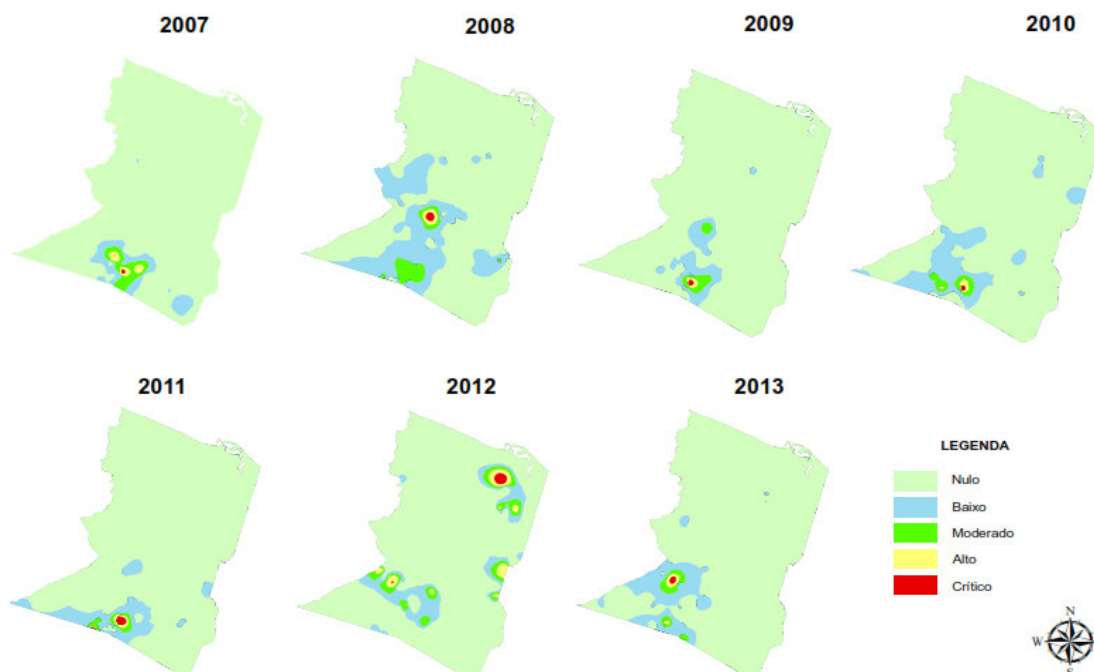


Figura 4. Distribuição e evolução dos casos de LTA no espaço geográfico do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão de 2007 a 2013.

Riqueza, diversidade, abundância e dominância das espécies de flebotomíneos. Foram encontradas 18 espécies pertencentes ao gênero *Lutzomyia* França, 1924, sendo elas:

- L. antunesi* (Coutinho, 1939)
- L. evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936)
- L. flaviscutellata* (Mangabeira Fo, 1942)
- L. goiana* (Martins, Falcão & Silva, 1964)
- L. infraspinosa* (Mangabeira Fo, 1941)
- L. lenti* (Mangabeira Fo, 1938)
- L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)
- L. migonei* (Antunes & Coutinho, 1939)
- L. monstruosa* (Mangabeira, 1940)
- L. oswaldoi* (Mangabeira, 1940)
- L. pinotti* (Antunes, 1939)
- L. richardward* (Ready et al. 1986)
- L. shannoni* (Newstead, 1922)
- L. sordelli* (Shannon & Del Ponte, 1927)
- L. termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964)
- L. trinidadensis* (Newstead, 1922)
- L. wellcomei* (Costa Lima & Antunes, 1936)
- L. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939)

A riqueza de espécies no ambiente do extradomicílio foi maior que no peridomicílio, sendo que no primeiro foram identificadas 18 espécies contra 12 espécies encontradas no peridomicílio. Relacionando a riqueza de espécies aos 62 povoados estudados observamos que o maior número de espécies foram encontradas nos povoados de Anibal (13 espécies), seguidos de Santa Maria com a identificação de 11 espécies e Piquizeiro com 9 espécies identificadas (Figura 5).

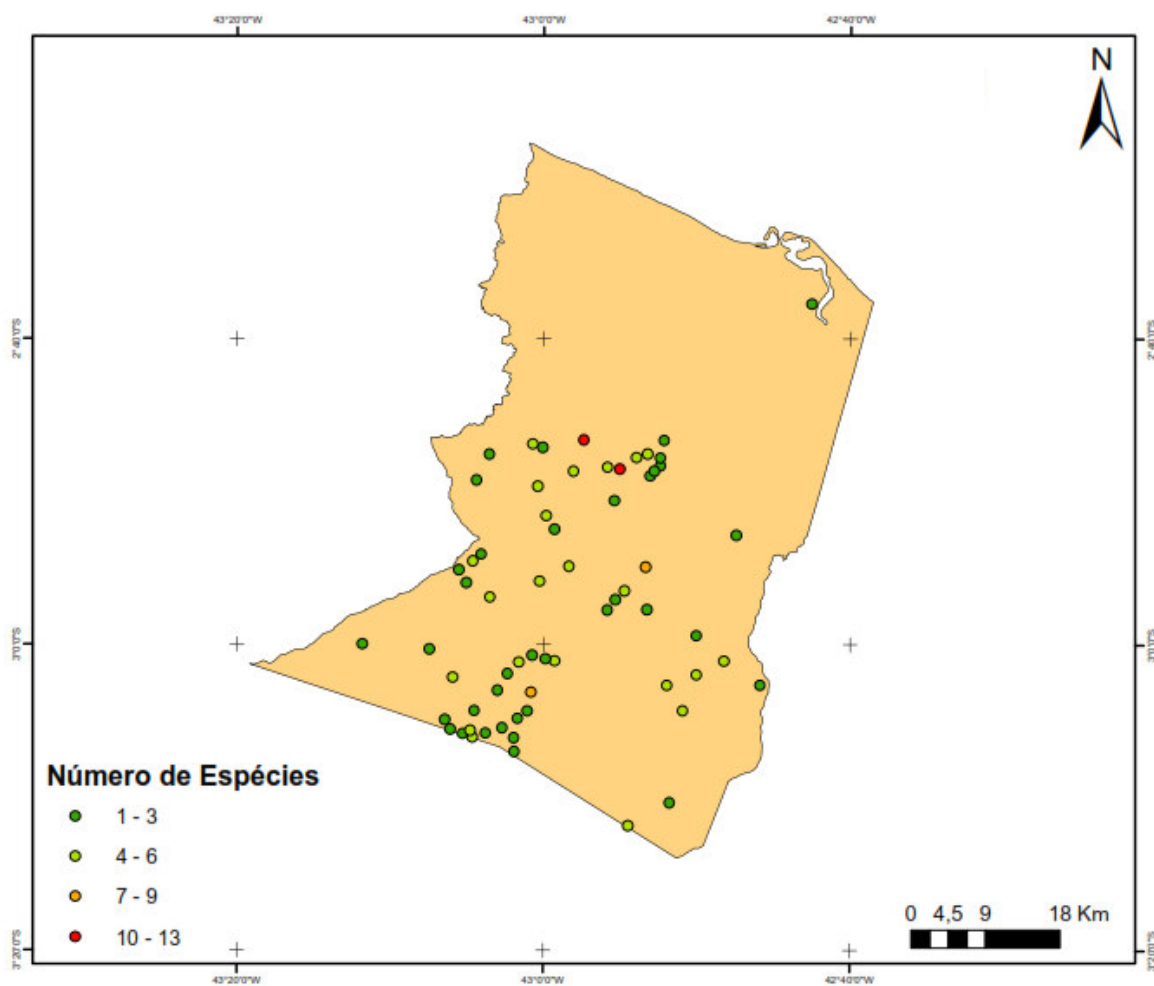


Figura 5. Riqueza e distribuição das espécies de flebotomíneos encontradas por povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, Brasil, de setembro de 2012 a agosto de 2015.

O estudo resultou na coleta de 9.853 espécimes de flebotomíneos. As espécies dominantes foram *Lu. whitmani* (53,83%), *Lu. longipalpis* (25,60%), *Lu. lenti* (11,69%), *Lu. evandroi* (5,50%) e *Lu. flaviscutellata* (0,87%). As demais espécies representaram 2,51% (Tabela 2). De um modo geral, as fêmeas (51,37%) predominaram sobre os machos (48,63%). Tal resultado foi influenciado principalmente, pelo padrão de abundância das fêmeas e machos das espécies de *Lu. whitmani* e *Lu. longipalpis* que contribuíram com 31,1%, 12,6% (fêmeas), 22,6% e 12,9% (machos) dos espécimes coletados, respectivamente.

Tabela 2: Números de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados nos povoados do município de Barreirinhas, Estado do Maranhão, de setembro de 2012 a agosto de 2015.

Espécies	Macho		Fêmea		Peri		Extra		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>L. whitmani</i>	2.233	46,60	3.071	60,7	2.954	53,4	2.350	54,4	5.304	53,83
<i>L. longipalpis</i>	1.273	26,57	1.249	24,7	745	13,5	407	9,4	2.522	25,60
<i>L. lenti</i>	787	16,42	365	7,2	1.245	22,5	1.277	29,6	1152	11,69
<i>L. evandroi</i>	315	6,57	227	4,5	398	7,2	144	3,3	542	5,50
<i>L. flaviscutellata</i>	35	0,73	51	1,01	34	0,6	33	0,8	86	0,87
<i>L. sordelli</i>	46	0,96	21	0,4	67	1,2	19	0,4	67	0,68
<i>L. trinidadensis</i>	26	0,54	12	0,2	19	0,3	19	0,4	38	0,39
<i>L. oswaldoi</i>	23	0,48	15	0,3	17	0,3	8	0,2	38	0,39
<i>L. infraspinosa</i>	13	0,27	12	0,2	29	0,5	9	0,2	25	0,25
<i>L. wellcomei</i>	13	0,27	12	0,2	15	0,3	10	0,2	25	0,25
<i>L. pinotti</i>	8	0,17	15	0,3	9	0,2	14	0,3	23	0,23
<i>L. termitophila</i>	6	0,13	8	0,2	1	0,02	13	0,3	14	0,14
<i>L. richardward</i>	7	0,15	3	0,1	0	0	10	0,2	10	0,10
<i>L. goiana</i>	2	0,04	0	0	0	0	2	0,05	2	0,02
<i>L. monstruosa</i>	2	0,04	0	0	0	0	2	0,05	2	0,02
<i>L. antunesi</i>	1	0,02	0	0	0	0	1	0,02	1	0,01
<i>L. migonei</i>	1	0,02	0	0	0	0	1	0,02	1	0,01
<i>L. shannoni</i>	1	0,02	0	0	0	0	1	0,02	1	0,01
Números de indivíduos	4.792	48,6	5.061	51,4	5.533	56,2	4.320	43,8	9.853	100
Números de espécies	18		13		12		18		18	

A densidade de espécimes foi maior no peridomicílio (n = 5.533) comparado com o extradomicílio (n = 4.320). Nos dois ambientes as quatro espécies mais abundantes foram as mesmas, mantendo o mesmo ranque de dominância. Dentre os 62 povoados estudados, os que apresentaram maior abundância de flebotomíneos foram Aníbal, Santa Maria e Engenho que obtiverem 30,0%, 21,7% e 8,6% do total de espécimes coletados, sendo que os demais povoados somaram 39,7% do total.

Taxa de risco para LTA em base geográfica distribuída espacialmente. De acordo com a metodologia aplicada para estabelecer a taxa de risco de aquisição de LTA, os povoados de Barra do Sitio, Engenho e Manoelzinho foram os que apresentaram positividade para todas as variáveis estudadas. Já os povoados de Quebra, Santa Rosa e Fumaça, são os que oferecem menor risco, uma vez que, quase todas as variáveis estudadas deram negativas para essas localidades. As taxas de risco das outras localidades estudadas estão demonstradas espacialmente na figura 6.

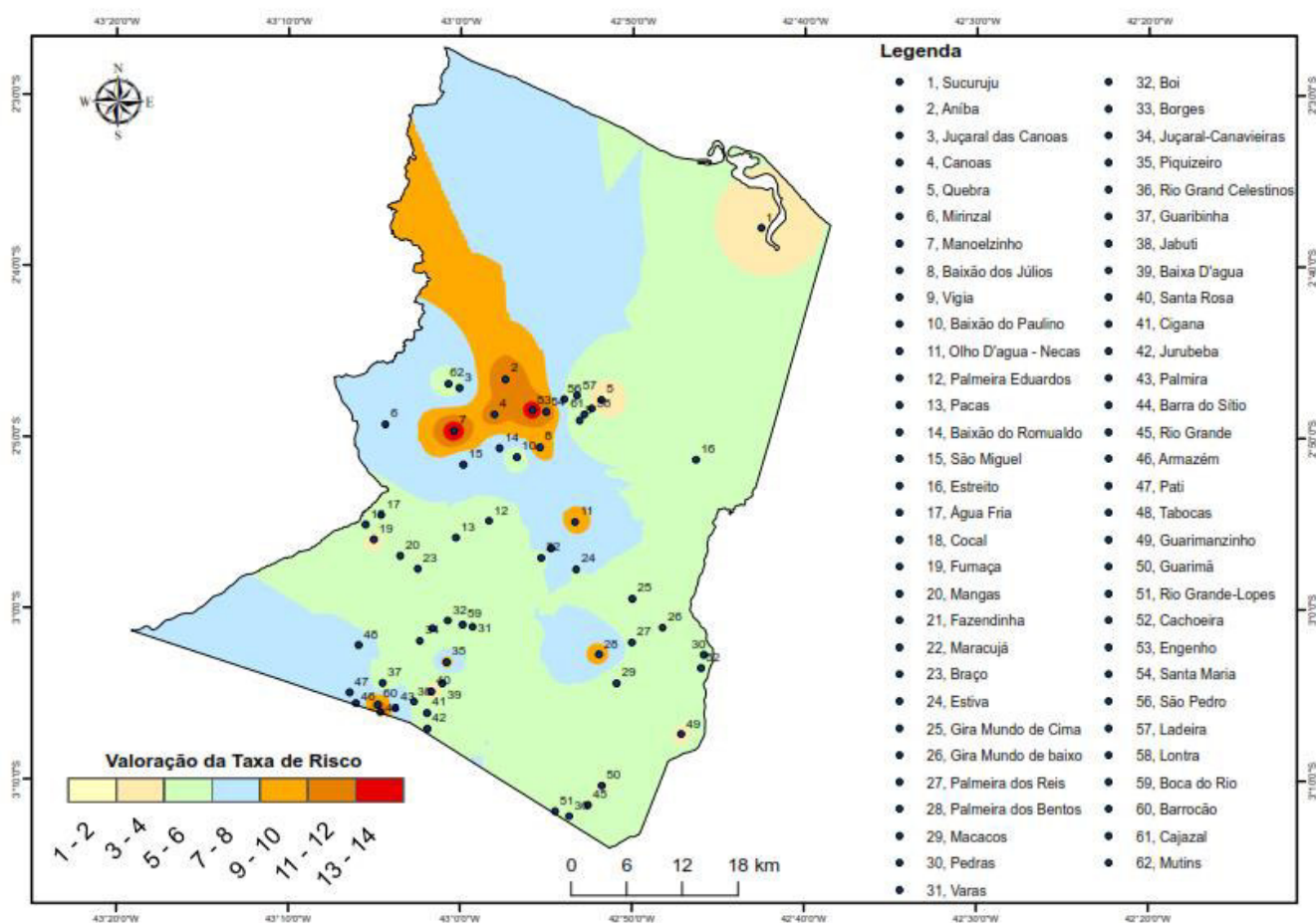


Figura 6. Mapa do município de Barreirinhas mostrando as taxas de risco de Leishmaniose Tegumentar Americana no período de 2012 a 2015.

5. DISCUSSÃO

Perfil epidemiológico da doença. De acordo com dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) os casos de LTA em Barreirinhas tiveram um crescimento a partir de 2009, quando foi registrado o menor índice dos últimos sete anos. Até 2012 a curva de crescimento do número de casos notificados foi ascendente e observou-se uma pequena queda em 2013. Considerando que não houve nenhuma mudança nas ações do programa de controle, nesse período, essa diminuição, pode ter ocorrido em função de fenômenos naturais (variação climática) ou por um déficit nas notificações, muito provável, feitos pelos agentes de saúde do município através de busca ativa ou por pacientes que buscam ajuda no posto de saúde municipal. Pois esse período coincide com transição na administração municipal.

Quanto à distribuição da doença por gênero, tem-se a comentar que, a exemplo do que ocorre em praticamente todas as localidades maranhenses onde foram feitos estudos

epidemiológicos (Martins *et al.* 2004) bem como em outros estados brasileiros (Castro *et al.* 2002; Guerra *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2002), a doença continua predominando no sexo masculino. Em relação à faixa-etária, os dados desse estudo mostram claramente que a doença vem atingindo pessoas de todas as idades. Porém, conforme observado em vários trabalhos, continua o predomínio em adultos (Lima *et al.*, 2002; Castro *et al.* 2002) sem deixar de destacar o acometimento em jovens, crianças e idosos. Isso mostra que apesar da maior parte dos casos ocorrerem em adultos ligados a atividades ocupacionais que necessitam de permanência maior em ambientes de mata como os lavradores, o ciclo de transmissão deve está ocorrendo também no peridomicílio e intradomicílio, uma vez que as crianças, jovens e possuem perfis relacionados à permanência na maior parte do tempo em casa.

A ocorrência mais prevalente em homens e na idade produtiva (adultos) deve ter algumas implicações. A princípio pode-se interpretar que as pessoas dessas classes estariam mais expostas ao risco de contraírem a infecção e adoecerem. Isso remonta às décadas anteriores, quando a doença era transmitida principalmente nas áreas marginais (lavouras) e silvestres (florestas), quando a interferência do homem no ambiente natural não tinha atingido proporções tão devastadoras (Dourado *et al.* 1989). Em várias áreas as florestas eram relativamente bem conservadas. Contudo, com as mudanças ocorridas no meio natural, pelo avanço da urbanização, malha rodoferroviária, sistema agropecuário, o perfil epidemiológico da doença vem mudando (Teodoro *et al.* 1993; Feitosa & Castellon 2004; Almeida *et al.* 2010; Ferreira *et al.* 2013a).

Dourado *et al.* (1989) estabeleceram em seu trabalho um padrão para transmissão da LTA no município de Lençóis na Bahia. Este padrão foi caracterizado como peridomiciliar e domiciliar considerando: a presença de homens e mulheres com a mesma taxa de infecção; a existência de doentes de todas as faixas etárias inclusive crianças de 1 a 2 anos; a proximidade física maior das habitações da área em relação à mata; a não diferenciação das taxas de infecção de lavradores e garimpeiros em relação às demais ocupações e a presença de flebotomíneos, inclusive no interior de uma residência. Se compararmos esses padrões aos nossos dados epidemiológicos para LTA em Barreirinhas, podemos inferir que o padrão de transmissão da LTA pode ser tanto peridomiciliar quanto extradomiciliar, uma vez que observamos grande quantidade de flebotomíneos vetores nos dois ambientes, dentre os indivíduos acometidos a maioria eram lavradores, entretanto tivemos vários casos em domésticas e aposentados e a doença acometeu todas as idades. O encontro de espécies de leishmanias dermatópicas infectando flebotomíneos nos ambientes peridomiciliares na área do presente estudo é uma evidência dessa suspeita (dados não publicados).

Distribuição dos casos de acordo com os fatores espaço-temporais. O estudo da distribuição geográfica, seja ele analítico ou essencialmente descritivo, tem sido uma ferramenta largamente utilizada em estudos epidemiológicos, inclusive, relacionados às Leishmanioses (Bevilacqua *et al.* 2001; Camargo-Neves, 2001). Esses estudos, notadamente quando são aplicadas técnicas de análise espacial, permitem identificar padrões espaciais de morbidade e/ou mortalidade e possíveis fatores associados, bem como descrever o processo de difusão das doenças, gerando informações sobre a gênese dos agravos que acometem determinadas populações, objetivando sua predição, prevenção e controle (Dantas-Torres, 2006).

Neste relato, os registros envolvem não apenas as localidades rurais, onde predominam os casos, mas também a periferia urbana, conforme têm sido descrito em outros

municípios do Estado do Maranhão, como Buriticupu e Dom Pedro (Martins *et al.* 2004). Esse padrão é conhecido também em outros estados brasileiros (Castro *et al.* 2002).

No presente estudo demonstramos que a doença geograficamente encontra-se principalmente na região centro-sul do município de Barreirinhas. Considerando a regular notificação dos casos pelos profissionais de saúde, pelo menos, na maior parte do período deste estudo, assume-se que houve certa expansão geográfica da doença entre os anos registrados (2007 e 2013). Além do surgimento de novos focos, foi observada a persistência das antigas áreas de ocorrência da doença. Isso demonstra, no mínimo, que as atuais medidas de controle estão sendo insuficientes, seja para controlar a leishmaniose nos focos de endemismo, seja para prevenir a ativação, ou reativação, de focos em áreas até então consideradas ílesas. Podemos supor que essa expansão se deu pelo investimento nas atividades do turismo, sendo que muitas localidades foram afetadas. Aumentou a incidência de desmatamento, expansão dos núcleos urbanos, sobretudo, onde houve os maiores registros de casos. Provavelmente foi o que aconteceu em 2012, quando houve deslocamento dos casos para o extremo nordeste do município, em função dos investimentos do turismo nesta região a partir de 2011, possivelmente com mudanças ambientais locais. Também existem as atividades agrícolas de subsistência, mantidas pelas associações rurais. Tudo isso vem contribuindo para mudar a natureza do lugar, restringindo os habitats naturais da infecção, favorecendo a sua transposição para os núcleos rurais e periurbanos. A prevalência das espécies de flebotomíneos nos peridomicílios das localidades rurais de Barreirinhas confirma essa suposição.

Riqueza, diversidade, dominância e abundância de espécies de flebotomíneos.

Devido à abrangência do presente estudo, a riqueza de espécies de flebotomíneos mostrou-se superior a observada em outros trabalhos realizados em Barreirinhas e em outros municípios do Maranhão, com menor esforço de captura. Assunção-Júnior *et al.* (2009), em um levantamento feito em alguns povoados do município de Barreirinhas, encontraram 10 espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* se assemelhando aos resultados obtidos por Martin & Rebêlo (2006) que encontraram no município de Santa Quitéria, 11 espécies para um esforço de captura de 432 horas. Já no trabalho de Oliveira-Pereira (2006), na Amazônia maranhense, município de Buriticupu, foram demonstradas a presença de 17 espécies para o mesmo esforço de captura do trabalho citado anteriormente, o que se equipara aos resultados obtidos neste trabalho. Entretanto, devemos considerar que o esforço amostral aplicado a este estudo foi muito superior quando comparado aos trabalhos acima citados, onde obtivemos um esforço amostral superior a 5.000 horas. Caso os trabalhos anteriores tivessem sido realizados com um esforço amostral maior, provavelmente, espécies acessórias e acidentais (Rebêlo *et al.* 2000) contribuiriam para o aumento desta riqueza.

Outros trabalhos realizados na zona climática semi-úmida do Maranhão como em Paço do Lumiar (10 espécies), Raposa (11 espécies) e São José de Ribamar (13 espécies), e em municípios da zona semi-árida como Codó, obtiveram uma riqueza de 10, 11, 13 e 10 espécies respectivamente (Araújo *et al.* 2000; Barros *et al.* 2000; Carvalho *et al.* 2000; Rebêlo *et al.* 1999b), contrapondo com o trabalho realizado por Campos *et al.* (2013) em uma área de transição entre a Amazônia e o Cerrado (30 espécies) e com os trabalhos realizados por Rebêlo *et al.* (2000b), Rebêlo & Oliveira-Pereira (2001); Dias-Lima *et al.* (2002), Silva *et al.* (2007), Azevedo *et al.* (2008) em regiões de florestas úmidas da bacia amazônica do Maranhão, que apresentaram uma média de 32-52 espécies de flebotomíneos encontrados em estudos entomológicos.

A riqueza de espécies foi maior no extradomicílio do que no peridomicílio corroborando com outros trabalhos realizados em outras áreas do Estado (Martin & Rebêlo, 2006; Silva *et al.* 2010), onde também a diversidade de espécies foi maior no extradomicílio, entretanto o número de espécimes coletados foi maior no peridomicílio, determinando maior abundância neste ambiente que, como vimos, pode estar relacionado às alterações ambientais realizadas nas áreas verdes, como resultado do impacto das alterações ambientais (Cerino *et al.* 2009) e da flexibilidade genética das espécies em se adaptarem ao ambiente antrópico (Teodoro *et al.* 2001).

De todos os povoados até o momento estudados, 2 se destacaram quanto à riqueza de espécies, Anibal e Santa Maria com 13 e 11 espécies identificadas respectivamente. Estes povoados são caracterizados por apresentarem condições ambientais semelhantes como a presença de abrigos de animais, capoeiras próximas e a implantação de atividades de impacto como o plantio de pequenas lavouras (roças) o que tornou possível estabelecermos um padrão ambiental para a riqueza de espécies.

Assunção-Júnior *et al.* (2009) e Rebêlo *et al.* (2010a), em trabalhos realizados em Barreirinhas demonstraram que as espécies mais abundantes foram *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani*. Em nosso trabalho, devemos destacar que além destas espécies que também foram encontradas em grande quantidade, *Lu. Lenti* e *Lu. evandroi* apareceram entre as 4 mais abundantes com 11,6% e 5,5% do total de espécies encontradas. Esses dados nos fazem deduzir que estas espécies estão adaptadas às características ambientais das regiões semi-rurais, rurais e de mata do município de Barreirinhas e que seu desenvolvimento pode ser um fator preocupante no que diz respeito à transmissão da Leishmaniose, uma vez que, estas espécies foram encontradas infectadas com leishmânias, no período desse estudo (dados não publicados), e devem participar do ciclo de transmissão e na difusão das Leishmanioses. Todas essas espécies têm aparecido em todos os levantamentos realizados nos municípios do nordeste do Estado (Rebêlo *et al.* 1999; Leonardo & Rebêlo, 2004; Martin & Rebêlo, 2006).

Já a abundância de *Lu. whitmani* e *Lu. longipalpis* (53,8% e 25,6% do total de espécies encontradas) é um motivo real de alerta para a ocorrência de grandes surtos de leishmaniose tegumentar e visceral no município, além de explicar os casos já existentes. Estas espécies apresentam ampla distribuição geográfica representando grande adaptação aos diferentes nichos ecológicos (Andrade-Filho *et al.* 2001). Sua ocorrência no peridomicílio mostra que estas espécies são altamente adaptadas às modificações do homem no meio ambiente, fato já observado em outras regiões, e no próprio Estado do Maranhão (Rebêlo *et al.* 2000a,b; Leonardo & Rebêlo, 2004, Silva *et al.* 2010), na região Norte no estado de Tocantins (Andrade-Filho *et al.* 2001) e na região sudeste (Andrade-Filho *et al.* 1998; Mayo *et al.* 1998). Segundo Martins *et al.* (2004), as alterações do ambiente, devido à ação antrópica têm levado a peridomicialização de estas espécies em áreas rurais com baixo desenvolvimento econômico-social.

As demais espécies, no entanto, foram pobremente representadas. Essas desigualdades na proporção de indivíduos podem representar diferentes graus de adaptação das espécies aos ambientes peri e extradomiciliares estudados, onde respondem à presença de fontes alimentares sanguíneas, criadouros e abrigos. Nesse caso, tal padrão de abundância estaria refletindo a própria estrutura da comunidade local de flebotomíneos (Martin & Rebêlo, 2006). Se essa hipótese for verdade, assume-se que as espécies são naturalmente abundantes, mas aquelas pobremente capturadas poderiam ter seus criadouros e ou abrigos distantes dos pontos de coleta e deste modo escaparam das armadilhas. Assim, a execução de novos

inquéritos entomológicos em diferentes pontos de captura, poderia obter diferentes resultados ou diferentes proporções de espécimes capturados.

Neste estudo observou-se certo predomínio de fêmeas em relação aos machos, fato este fortemente influenciado pelo alto número de espécimes fêmeas de *Lu. whitmani*. Este predomínio não foi observado em outros trabalhos com *Lu. whitmani* (Rebêlo *et al.* 2009; Silva *et al.* 2012), onde foram encontrados a predominância de machos. A maior quantidade de fêmeas de *Lu. whitmani*, principalmente no peridomicílio, pode estar associada à atração das mesmas a uma determinada fonte alimentar sanguínea, uma vez que, as armadilhas eram sempre instaladas próximas a abrigos de animais.

Neste estudo também foi possível observar que nos três povoados com maior número de espécies (Anibal, Engenho e Santa Maria), a presença significativa, de ambos os sexos de *Lu. longipalpis*, *Lu. lenti*, *Lu. whitmani*, e *Lu. evandroi* tanto no peridomicílio quanto no extradomicílio contribuiu muito para a grande abundância total encontrada nestas localidades. Isso pode significar também que os criadouros dessas espécies, no mínimo, estão nesses povoados e nas proximidades dos locais de coleta. Isso é plausível de ocorrer por três motivos principais: primeiro, ao longo de sua vida, os flebotomíneos não voam muito longe de seus sítios de criação, podendo variar em poucas centenas de metros (Alexander & Young, 1992). Então, é natural que grande quantidade de indivíduos ocorra próximo aos seus criadouros e/ou abrigos. Assim, as espécies encontradas em maior abundância junto às habitações humanas, neste estudo, devem ter uma área de criação que não está necessariamente relacionada com habitats naturais; segundo: as localidades rurais estudadas apresentam características favoráveis para o estabelecimento de criadouros. São exemplos, solos arenosos e ricos em matéria orgânica, peridomicílios arborizados, com presença de abrigos de animais domésticos e ambiente com vegetação natural muito próximo. Assim, os criadouros podem ser os ecótopos úmidos nos arredores das habitações, como galinheiros, chiqueiros, estábulo, plantações e sob materiais diversos acumulados nos quintais etc. Em terceiro lugar, estudos recentes indicam que em flebotomíneos é possível a existência de memória espacial, olfativa e/ou a fidelidade ao hospedeiro e que isto possa orientar os flebotomíneos no reconhecimento dos locais onde há disponibilidade de fontes de sangue (Freitas *et al.* 2009). Dessa forma eles tenderiam a permanecer nas proximidades dos abrigos de animais.

Distribuição espacial da taxa de risco para LTA. No mapa fica claro que o setor centro-oeste a noroeste, os que apresentaram os maiores fatores de risco, estão numa rota ativa do turismo, porém recente. Os três principais povoados envolvidos, apesar de antigos e de porte pequeno, sofreram rápida expansão, por conta de investimentos em alguns setores favorecidos pelas atividades diretas e indiretas do turismo. No entanto, acresce informar que a vegetação de capoeira baixa ainda cobre boa parte dessa região, e as características físicas dos povoados são tipicamente rurais, tendo o fundo do quintal, contato com a capoeira adjacente e as casas, invariavelmente, possuem abrigos de animais, especialmente galinheiros. Isso explica o fato dos referidos povoados apresentarem positividade para todas as variáveis estudadas, como importantes fatores de risco para a transmissão da LTA: presença de flebotomíneos; presença de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas; presença de flebotomíneos considerados vetores; presença de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas com sangue de potenciais reservatórios de *Leishmania*; Presença de flebotomíneos parasitados com *Leishmania*. Os demais povoados também notificaram casos de LTA, no entanto, apresentaram diferentes combinações desses fatores de risco.

6 CONCLUSÃO

No período do presente estudo, as notificações dos casos de LTA em Barreirinhas tiveram um crescimento a partir de 2009 até 2012, com uma pequena queda em 2013, atribuída ao déficit nas notificações pelos agentes de saúde, por coincidir com o período de transição da gestão de saúde municipal, visto que não houve alteração na política de controle. A doença continua incidindo em lavradores, masculino, na idade produtiva e na zona rural. A fauna de flebotomíneos, por sua vez, foi considerada rica tendo sido acrescida de 4 espécies que ainda não haviam sido detectadas em Barreirinhas. Os ambientes peridomiciliar e extradomiciliar apresentaram a mesma riqueza de espécies, porém o extradomicílio mostrou-se mais diverso e o peridomicílio maior abundância. As espécies *L. lenti*, *L. evandroi*, *L. longipalpis* e *L. whitmani*, foram as mais abundantes sendo as duas últimas importantes vetoras de LVA e LTA, respectivamente. O noroeste e o centro do município de Barreirinhas oferecem maior risco de transmissão de LTA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às comunidades de Barreirinhas, ao Centro Municipal de Saúde de Barreirinhas, à Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia-CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alexander JB, Young DG 1992. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 397-403.
- Almeida PS, Minzão ER; Minzão LD, Silva SR, Ferreira AD, Faccenda O, Andrade Filho JD 2010. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(6): 723-727.
- Andrade-Filho JD, Valente MB, Andrade WA, Brazil RP, Falcão AL 2001. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 34(4) 323-329.
- Araújo JC, Rebêlo JMM, Carvalho ML, Barros VLL 2000. Composição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município da Raposa – MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. *Entomol Vect* 7(1): 33-47.
- Assunção Júnior AN, Silva O, Moraes JLP, Nascimento FRF, Oliveira-Pereira YN, Costa JML, Rebêlo JMM 2009. Foco emergente de leishmaniose tegumentar (LT) no entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Nordeste, Brasil. *Gazeta Medica da Bahia* 79(3): 103-109.
- Azevedo ACR, Costa SM, Pinto MCG, Souza JL, Cruz HC, Vidal J, Rangel EF 2008. Studies on the sandy fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from

transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 760-767.

- Barros VLL, Rebêlo JMM; Silva FS 2000. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do Município do Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área de transmissão de leishmaniose. *Entomologia y Vectores* 16(1): 265-270.
- Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53:1-8, 2001.
- Brasil – Ministério da Saúde 2003. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 120 pp.
- Brasil – Ministério da Saúde 2007. *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 180 pp.
- Brasil – Ministério do Meio Ambiente 2013b. O sistema nacional de unidades de conservação da natureza. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/250/_publicacao/250_publicacao30082011035301.p df. Acesso em 10 de novembro de 2013.
- Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cadernos de Saúde Pública* 17:1263-1267, 2001.
- Campos AM, Matavelli R, Santos dos CLC, Moraes LS, Rebêlo 2013. Ecology of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a Transitional Area between the Amazon and the Cerrado in the State of Maranhão, Brazil. *J Med Entomol* 50 (1): 52-58.
- Carvalho ML, Rebêlo JMM, Araújo JC, Barros VLL 2000. 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.
- Castro, ACL & NM, Piorski (Orgs.) 2002. *Plano de Manejo do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses*. Fundação Sousem. São Luís, 496 pp.
- Cerino DA, Teodoro U, Silveira TGV 2009. Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. *Neotrop Entomol* 38(6): 853-858.
- D'Antona, Álvaro de Oliveira 2000. *O lugar do Parque Nacional no espaço das comunidades dos lençóis Maranhenses*, Ed. IBAMA, Brasília, 87 pp.
- DANTAS-TORRES, Filipe; BRANDAO-FILHO, Sinval P.. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 39, n. 4, Aug. 2006 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000400007&lng=en&nrm=iso>. access on 13 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000400007>.
- Dias-Lima AG, Castellón EG, Sherlock I 2002. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazon* 33: 303-316.
- Dourado, M.I.C. et al. 1989. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). *Rev. Saúde Públ.*, S. Paulo, 23(1): 2-8.

- FAPEMA – Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão 2012. Preservação da Vida. In: *Revista Inovação 17*: 49-50.
- Feitosa, MAC, Castellon EG 2004. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amazon 34*: 121-127.
- Ferreira AL, Falqueto A, Grimaldi G, Peixoto AA, Pinto IS 2013a. Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *J Med Entomol 50*(6): 1215-1223
- Freitas JS, Reinhold-Castro KR, Casanova C, Silva JP, Providelli I, Teodoro U 2009. Memória espacial e/ou olfativa em flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, sul do Brasil. *Rev Bras Med Trop 42*: 151-155.
- GUERRA, Jorge Augusto de Oliveira et al . Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 22, n. 11, p. 2319-2327, Nov. 2006 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2006001100006&lng=en&nrm=iso>. access on 25 May 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006001100006>.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013 a. [uptaded 2013 Dez 03: cited 2013 Dez 10] Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=211027&search=maranhasto-amaro-do-maranhao>. Acesso em 03 de dezembro de 2013.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013b. [uptaded 2013 Dez 03: cited 2013 De 10] Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=210170&search=maranhao-barreirinhas>. Acesso em 03 de dezembro de 2013.
- Leonardo FS & Rebêlo JMM 2004. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop 37*(3): 282-284.
- Lima AP, Minelli L, Teodoro U, Comunello E 2002. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 77(7):681-692, nov./dez.
- Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Wanderley DM, Corrêa FMA 1998. Flebotomíneos de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana no município de Itupeva, região sudeste do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop 31*: 339-345.
- Martin AMCB, Rebêlo JMM 2006. Dinâmica espaço-temporal de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de Santa Quitéria, área de cerrado do Estado do Maranhão, Brasil. *Iheringia Ser. Zool.* 96 (3): 283-288.
- Martins LM, Rebêlo JMM, Santos MCFV, Costa JML, Silva AR, Ferreira LA 2004. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cad Saude Publica 20*(3): 735-743.
- Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF 2006.

- Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmaniasp* na Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(6): 540-543.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
 - Rebêlo JMM, Assunção-Júnior AN, Silva O, Moraes JLP 2010a. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. *Cad Saúde Pública* 26(1): 195-198.
 - Rebêlo JMM & Oliveira-Pereira YN 2001. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de matas de terra firme e de várzea, do município de Paragominas, estado do Pará, Brasil. *Acta Amazon* 31: 145-154.
 - Rêbêlo JMM 2011. *O vento, o mar e a areia*. Scortecci, São Paulo, 232 pp.
 - Rebêlo JMM, Leonardo FS, Costa JML, Pereira YNO, Silva FS 1999b. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose da região dos cerrados, estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública* 15: 623-630.
 - Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS 2000a. Flebotomíneos da Amazônia maranhense. IV. Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. *Entomol Vect* 7: 61-72.
 - Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira L A, Silva A R 2000b. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Rev Bras Med Trop* 33: 11-19.
 - Silva DF, Freitas RA, Franco AMR 2007. Diversidade e Abundância de Flebotomíneos do Gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em Áreas de Mata da Região Nordeste do Município de Manacapuru AM, Brasil. *Neotrop Entomol* 36: 138-144.
 - Silva FS, Carvalho LP, Cardozo FP, Moraes JL, Rebêlo JM 2010. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Cerrado area of the Maranhão state, Brazil. *Neotrop Entomol* 39(6):1032-1038. Silveira TG, Teodoro U, Arraes SM, Lonardoni MV, Dias ML, Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R 1990. Na autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Laeishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Paraná State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 475-476.
 - Teodoro U, Salvia Filho VL, de Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Maria Ferreira MEMC, Lonardoni MVC 1993. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev Saude Pública* 27(4) 242-
 - Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O, Kühl JB 2001. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 30(2): 209-224.
 - Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0



TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.2
●	Impact Factor	p.2
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0001-706X

DESCRIPTION

Acta Tropica, is an international journal on infectious diseases that covers public health sciences and biomedical research with particular emphasis on topics relevant to human and animal health in the tropics and the subtropics.

Its scope includes the biology of pathogens and vectors, host-parasite relationships, mechanisms of pathogenicity, clinical disease and treatment, and we welcome contributions in basic or applied research in disciplines such as epidemiology, disease ecology, diagnostics, interventions and control, mathematical modeling, public health and social sciences, climate change, parasite and vector taxonomy, host and parasite genomics, biochemistry and immunology and vaccine testing.

Contributions may be in the form of original papers, review articles or short communications.

Only manuscripts of high scientific significance and innovation will be considered for publication. Manuscripts of minimal international relevance, case reports, and control strategies at very early inconclusive laboratory stages of development will not be considered for publication. **Important Guidelines for Acceptance**

Editors and the Editorial Board of *Acta Tropica* provide the following guidelines to help authors prepare manuscripts of high quality that can be considered for publication. Maximize your chances of acceptance by making sure your manuscript:

Matches the scientific scope of the journal, Presents results that significantly advance science including innovative new approaches, Meets quality standards of presentation and literature citation, Demonstrates potential health or biomedical impact.

The above points are critical for publication of original papers. Be aware Editors carefully evaluate initial manuscript submissions and only those meeting the above criteria will be forwarded to review. If reviewed favorably and the authors seriously address all concerns, than chances of acceptance are increased. Review papers, in addition, are expected to carefully synthesize the literature and make recommendations to advance respective scientific fields.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

All clinicians and researchers dealing with tropical diseases, including parasitologists, microbiologists, immunologists and epidemiologists

IMPACT FACTOR

2014: 2.270 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
BIOSIS
Chemical Abstracts
Current Contents
MEDLINE®
EMBASE
Ecological Abstracts
Helminthological Abstracts
Science Citation Index
Tropical Diseases Bulletin
Veterinary Bulletin
CAB Abstracts
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

J. Beier, Division of Environment & Public Health Department, Public Health Sciences University, University of Miami, Miller School of Medicine, Clinical Research Building, 1120 NW 14th Street, Miami, 33136, USA, Fax: +1 305 256 1306

K. Berzins, Dept. of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholms Universitet, The Arrhenius Laboratories F5, SE-10691, Stockholm, Sweden, Fax: +46 8 166488

N.W. Brattig, Tropical Medicine Section, Bernhard Nocht Inst., Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359, Hamburg, Germany, Fax: +49 40 42818 400

F. Guhl, Fac. de Ciencias, Depto. de Ciencias Biologicas, Calle 18A CRA. 1E Of. A-202, Universidad de Los Andes, Apartado Aereo 4976, Bogotá, Colombia, Fax: 57 1 2841890

Reviews Editor

J. Beier, Division of Environment & Public Health Department, Public Health Sciences University, University of Miami, Miller School of Medicine, 1120 NW 14th Street, Miami, 33136, Florida, USA, Fax: +1 305 256 1306

Editorial Board

D. Campbell, Los Angeles, USA

D. Chadee, St. Augustine, Trinidad and Tobago

J.M. Cordovez, Bogota, Colombia

A. Flisser-Steinbruch, Mexico City, Mexico

R. Gürtler, Buenos Aires, Argentina

J. Hargrove, Stellenbosch, South Africa

A. Hassanali, Nairobi, Kenya

C. Hatz, Basel, Switzerland

N. Kabatereine, Kampala, Uganda

C. H. King, Cleveland, OH, USA

I. Krantz, Skövde, Sweden

A. Kumar, Goa, India

A.G. Lescano, New Orleans, LA, USA

S. Manguin, Montpellier, France

S. Mas-Coma, Valencia, Spain
D.P. McManus, Brisbane, Queensland, Australia
G. Muller, Jerusalem, Israel
F. Ntoumi, Brazzaville, Congo
P.V. Perkins, Orrington, Maine, USA
K.D. Ramaiah, Pondicherry, India
C.T.D. Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazil
L. Rombo, Eskilstuna, Sweden
N. Saravia, Cali, Colombia
S. Sayasone, Basel, Switzerland
G. Schaub, Bochum, Germany
P. Steinmann, Basel, Switzerland
S.R. Telford, North Grafton, Massachusetts, USA
J. Utzinger, Basel, Switzerland
G. Vallejo, Ibague, Colombia
J. Vontas, Heraklion, Crete, Greece
M. Wahlgren, Solna, Sweden
J. Waikagul, Bangkok, Thailand
M. Walker, London, UK
M.L. Wilson, Ann Arbor, Michigan, USA
R.-D. Xue, St. Augustine, Florida, USA
S. Zakeri, Tehran, Iran
B. Zhan, Houston, TX, USA
E. Zhioua, Tuni, Tunisia
X.-N. Zhou, Shanghai, China
B. Zingales, Sao Paulo - SP, Brazil

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Acta Tropica publishes original research papers, short communications and review articles. Original papers **should normally not exceed 10 printed pages** including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2150**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription

articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/acta-tropica>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. [More information.](#)

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions.](#)

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our [Support Center](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

[Track your submitted article](#)

[Track your accepted article](#)

You are also welcome to contact the [Elsevier Contact Center](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou da forma mais abrangente possível elucidar as características epidemiológicas da LTA em Barreirinhas, bem como seu ciclo de transmissão determinando as principais espécies de hospedeiro, vetor e parasita envolvidos.

Primeiramente, através de infecções experimentais conseguimos provar que *Lu. whitmani*, espécie de flebotomíneo mais abundante na região, pode se infectar, não só com *L. braziliensis*, mas também com *L. amazonenses*, o que mostra que este vetor precisa ser cada vez mais estudado e monitorado, pois pode estar transmitindo vários tipos de espécies de *Leishmania*, incluindo *L. amazonenses*, causadora da Leishmaniose Cutânea Difusa.

Em seguida, análises moleculares para determinação de infecção natural de flebotomíneos por espécies de *Leishmania* determinaram que as espécies *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, são os parasitas que estão circulando nas áreas estudadas e que provavelmente são os agentes que estão produzindo os casos de leishmanioses em humanos. Estabelecemos ainda a presença de *L. braziliensis* parasitando *Lu. whitmani* e *L. infantum* parasitando *Lu. longipalpis*, *Lu. lenti* e *Lu. whitmani*, as três espécies mais abundantes e inferimos a possibilidade de *L. infantum* causar além de LVA, também a LTA, a nível local. Para esclarecer melhor este e outros aspectos do ciclo de transmissão da Leishmaniose em Barreirinhas, esclarecemos ainda que porco, cão, galinha e equinos foram as fontes alimentares mais encontradas nos flebotomíneos e que dentre estes, cão, porco e equino, devem ser os principais potenciais reservatórios das espécies de *Leishmania* que circulam na região, caracterizando a transmissão como peridomiciliar.

A fauna de flebotomíneos do presente estudo foi considerada rica tendo sido acrescida de 4 espécies que ainda não haviam sido detectadas em Barreirinhas. Os

ambientes peridomiciliar e extradomiciliar apresentaram a mesma riqueza de espécies, porém o extradomicílio mostrou-se mais diverso do que o peridomicílio e o Peri maior abundância. As espécies *Lu. lenti*, *Lu. evandroi*, *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani*, foram as mais abundantes sendo as duas últimas importantes vetoras de LVA e LTA respectivamente. Os povoados de Barra do Sítio, Engenho e Manoelzinho são os que possuem maior risco para transmissão de LTA em Barreirinhas. Os povoados de Quebra, Santa Rosa e Fumaça são os que oferecem menor risco para transmissão de LTA em Barreirinhas. O noroeste e o centro do município de Barreirinhas oferecem maior risco de transmissão de LTA.