

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

### **Estudo da Fauna e Avaliação Diagnóstica de Infecção Natural por *Leishmania* spp. de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) do Município de Rio Branco (Acre, Brasil) Empregando Ensaio Molecular.**

Thais de Araújo Pereira

#### **Orientadores**

DRA. CONSTANÇA FELICIA DE PAOLI DE CARVALHO BRITTO

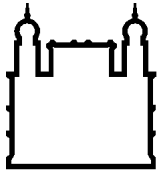
DR. REGINALDO PEÇANHA BRAZIL

**LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E DOENÇAS ENDÊMICAS**

**LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA DE INSETOS**

Rio de Janeiro

2013



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária  
Área de Concentração: Ecologia e Epidemiologia

THAIS DE ARAUJO PEREIRA

**Estudo da Fauna e Avaliação Diagnóstica de Infecção Natural por *Leishmania* spp. de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) do Município de Rio Branco (Acre, Brasil) Empregando Ensaio Moleculares.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz /FIOCRUZ como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária, na área de Ecologia e Epidemiologia.

**Orientadores:** Dra. Constança Felicia De Paoli De Carvalho Britto

Dr . Reginaldo Peçanha Brazil

Rio de Janeiro

2013

*A meus pais, Oscar (em memória) e  
Maria Luiza, e minha irmã Nathali.*

"Não haveria criatividade sem a curiosidade que nos move e que nos põe pacientemente impacientes diante do mundo que não fizemos, acrescentando a ele algo que fazemos."

**Paulo Freire, Pedagogia da autonomia 1996.**

## AGRADECIMENTOS

Á Deus que me dá sabedoria para descobrir o correto, forças para não desanimar diante das dificuldades e seguir em frente;

A meus pais Oscar (em memória) e Maria Luiza por todos os esforços, e por fazerem de mim a pessoa feliz e vitoriosa que sou. A estrada da vida é longa e muitas vezes árdua, mas a viagem está sendo maravilhosa e graças a vocês;

A minha irmã Nathali e meu cunhado Daniel por todo apoio, e pelas vezes que ‘madrugaram’ para me levar no aeroporto nas minhas idas ao Acre;

Ao meu namorado Vítor pelo apoio, compreensão, e carinho.

Ao Dr. Mauricio Vilela e a Dra. Elizabeth Rangel por terem apostado em mim, e me apresentado a Dra. Daniela e a Dra. Constança;

A Dra. Constança Britto e ao Dr. Reginaldo Brazil pela orientação e ensinamentos ministrados;

A Dra. Daniela Pita-Pereira por ser minha mãezinha científica desde quando entrei no laboratório como aluna PIBIC;

Ao Curso de Pós Graduação em Biologia Parasitária IOC/Fiocruz, pelo conhecimento transmitido;

A Coordenação Curso de Pós Graduação em Biologia Parasitária IOC/Fiocruz, por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio financeiro aos trabalhos de campo;

A Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Acre, na figura da Sra. Maria Carmelinda Gonçalves, coordenadora de Leishmanioses e do Sr. Claudio Rodrigues de Souza, responsável pelo Laboratório de Entomologia;

Aos técnicos da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Acre, Janis Lunier de Souza (e sua família), ao Henrique, e ao motorista, pelo apoio logístico e pelo auxílio operacional na condução dos trabalhos de campo;

Aos moradores da área de estudo, a família do Sr. Vítor, do Sr. Rachid, da D. Lurdes e do Sr. Mário, o agradecimento pela solidariedade prestada durante o desenvolvimento dos trabalhos, tornando a realização da pesquisa mais eficiente;

Aos responsáveis pelo Parque Ambiental Chico Mendes – Rio Branco – Ac;

Ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, IOC/ Fiocruz/ RJ pela colaboração com o projeto. Especialmente a Andressa Fussari e ao Dr. Reginaldo pela ajuda com os ensinamentos de montagem das lâminas e identificação taxonômica dos insetos, pelo grande apoio e conseqüentemente pela colaboração na minha formação profissional;

Ao chefe do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED), IOC/ Fiocruz/RJ, Dr. Adeilton pela colaboração cedendo o espaço para os experimentos de clonagem, a todos os colegas do laboratório que de alguma forma me ajudaram, especialmente a Myllena Alheiros, Tainah Galdino, e o Franklin por me ajudarem de forma direta com os conhecimentos para a realização desses experimentos;

Ao Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática pela ajuda com a análise das sequências e construção da árvore filogenética.

Ao Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos do Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte.

A todos os amigos do laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas por toda a ajuda que diretamente ou indiretamente contribuíram, e também pelos momentos de descontração;

A Coleção de *Leishmania* do IOC por conceder as diferentes espécies necessárias ao estudo;

A Plataforma de Sequenciamento PDTIS/IOC/Fiocruz da Fundação Oswaldo Cruz;

Aos colegas de Mestrado pela amizade;

Ao IOC que financiou minha bolsa de estudos no primeiro ano e a FAPERJ que me contemplou com a bolsa Nota 10 no segundo ano;

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho;

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

Casos de leishmaniose tegumentar americana vêm aumentando nos últimos anos no Estado do Acre, com a identificação de espécies distintas de *Leishmania* isoladas de lesões cutâneas de pacientes. Entretanto, ainda não há registros de leishmaniose visceral, e pesquisas sobre a fauna de flebotomíneos no Estado ainda são limitadas. O presente estudo teve como principal objetivo ampliar o conhecimento sobre a fauna flebotomínica no município de Rio Branco (Acre) e avaliar a taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. nos insetos capturados. Foram realizadas coletas com o apoio da Secretaria Municipal de Vigilância e Saúde do município, no período de Abril 2011/Abril 2012, utilizando armadilhas luminosas dispostas em seis áreas - cinco residenciais e uma área de laser. Após identificação taxonômica segundo metodologia proposta por Galati, as fêmeas de flebotomíneos foram avaliadas individualmente para infecção natural por *Leishmania* spp. através de ensaios de PCR-multiplex associados à hibridização com sondas específicas (subgênero *Viannia* e *Leishmania infantum*) e revelação enzimática. Foram utilizados dois conjuntos de iniciadores por reação, sendo um desenhado para a região conservada dos minicírculos do kDNA gênero *Leishmania*, e outro para um gene constitutivo específico de flebotomos (*cacophony*) gênero *Lutzomyia*. Na tentativa de identificar a espécie de *Leishmania* encontrada nos flebotomíneos, foram realizados ensaios de PCR-RFLP, clonagem e sequenciamento do fragmento de 120 pb correspondente ao produto amplificado contendo a região conservada dos minicírculos de kDNA. Foram coletados 455 espécimes de flebotomíneos, sendo 256 fêmeas e 199 machos; 173 fêmeas foram destinadas à análise molecular diagnóstica. A identificação taxonômica dos insetos possibilitou a caracterização de 20 espécies, e sete sendo identificadas apenas até gênero. Os espécimes classificados no gênero *Trichophoromyia* spp. foram os mais abundantes com 146 indivíduos, seguido da espécie *Trichophoromyia auraensis* com 96, e *Nyssomyia whitmani* com 74 exemplares coletados. Os gêneros *Trichophoromyia* spp. e *Nyssomyia* spp. foram os mais abundantes, tanto nas áreas de mata como no peridomicílio. A análise diagnóstica detectou 12 fêmeas positivas para infecção por *Leishmania* spp., correspondendo à 6,9% (12/173). Destas, 5,2% corresponderam à *Trichophoromyia* spp. (9/173), 1,1% à *Evandromyia saulensis* (2/173) e 0,6% *Pressatia* spp. (1/173). O sequenciamento do produto amplificado de *Leishmania* spp. das 12 amostras positivas, possibilitou a construção de uma árvore filogenética, a qual revelou

similaridades entre clones das amostras-teste e amostras referência de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, subgênero *Viannia*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* e gênero *Sauroleishmania*. Devido à complexidade dos dados, maiores estudos ainda se fazem necessários para a identificação precisa das espécies de *Leishmania* detectadas no presente trabalho.



## ABSTRACT

Notifications concerning american tegumentary leishmaniasis have increased in the recent years in the State of Acre, with the identification of distinct *Leishmania* species isolated from cutaneous lesions, and without records of visceral leishmaniasis in the state. However, studies on the sandfly fauna in Acre are still limited. The main objective of the present investigation was to bring more knowledge about the sandfly fauna in the municipality of Rio Branco (Acre) and to evaluate natural infection index by *Leishmania* spp. in the captured sand flies. Insects were collected with the support of the Municipal Surveillance and Health board, from April 2011 until April 2012, using HP light traps distributed in six areas: five residential areas and one recreation area. Sand flies collected in these different environments were identified according to the methodology proposed by Galati. Phlebotomine females were individually analyzed for the detection of natural infection by *Leishmania* spp. through the use of multiplex PCR assays coupled to non-radioactive hybridization with specific probes (*Viannia* subgenus and *Leishmania infantum*). For the multiplex PCR two primer pairs were used, one specific for the conserved region of kDNA minicircles from *Leishmania* genus and a second pair that amplifies a specific constitutive gene of sand flies (*cacophony*) from the *Lutzomyia* genus. In order to identify the *Leishmania* spp. infecting sand flies, PCR-RFLP experiments, cloning and sequencing of the 120 bp fragment corresponding to amplified products containing the conserved region of kDNA minicircles, were performed. A total of 455 phlebotomine specimens was collected being 256 females and 199 males; 173 females were individually submitted to molecular diagnosis. The taxonomic identification revealed 20 phlebotomine species identified, where seven of were possible to be characterized only to the genus level. The specimens classified as *Trichophoromyia* spp. genus were the most abundant with 146 individuals, followed by the species *Trichophoromyia auraensis* with 96, and *Nyssomyia whitmani* with 74 specimens collected. *Trichophoromyia* spp. and *Nyssomyia* spp. genus were the most prevalent in the florest areas, as well as in the peridomiciliary environment. The diagnostic analyzes detected 12 female phlebotomines positive for *Leishmania* spp. infection, corresponding to 6.9% (12/173). From these, 5.2% were related to *Trichophoromyia* spp. (9/173), 1.1% to *Evandromyia saulensis* (2/173) and 0,6% to *Pressatia* spp. (1/173). Following sequencing the *Leishmania* spp. amplified product derived from the 12 positive phlebotomine samples, a phylogenetic tree was constructed

revealing similarities between clones from the samples-test and reference samples from *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *Viannia* subgenus, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* and *Sauroleishmania* genus. Due to the complexity of the generated data, more studies are still needed for the precise identification of *Leishmania* parasites detected in the present work.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Taxonomia de <i>Leishmania</i> .....	6
<b>Figura 1.2:</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	11
<b>Figura 1.3:</b> Mapa da origem andina de LTA.....	18
<b>Figura 1.4:</b> Modelo da expansão amazônica da LTA pela <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	19
<b>Figura 4.5:</b> Foto de satélite da área de estudo.....	32
<b>Figura 4.6:</b> Foto de satélite do Parque Ambiental Chico Mendes.....	33
<b>Figura 4.7:</b> Foto do Centro de visitantes do Parque Ambiental Chico Mendes.....	33
<b>Figura 4.8:</b> Foto da entrada do Parque Ambiental Chico Mendes.....	33
<b>Figura 4.9</b> - Fotos de satélite dos pontos de Coleta na Rua Custório Freire.....	34
<b>Figura 4.10:</b> Residência do Ponto de coleta 4 Estrada Transacreana.....	34
<b>Figura 4.11:</b> Residência do Ponto de coleta 5 Estrada Transacreana .....	34
<b>Figura 4.12:</b> Armadilha luminosa HP.....	35
<b>Figura 4.13:</b> Captura com a Armadilha de Shannon.....	36
<b>Figura 4.14:</b> Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> sp.....	40
<b>Figura 5.16:</b> Exemplo de eletroforese em gel de agarose 2%.....	53
<b>Figura 5.17:</b> Exemplo de hibridização.....	53
<b>Figura 5.18:</b> Exemplo de dois experimentos de PCR-RFLP.....	54
<b>Figura 5.19 A e B:</b> Árvore de máxima verossimilhança, não enraizada.....	57

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Vetores de <i>Leishmania spp.</i> responsáveis pela transmissão de leishmaniose cutânea nas Américas.....	17
<b>Tabela 1.2:</b> Distribuição do número de casos e da prevalência de LTA.....	24
<b>Tabela 5.3:</b> Número de espécimes de flebotomíneos coletados.....	48
<b>Tabela 5.4:</b> Consolidado de flebotomíneos capturados.....	50
<b>Tabela 5.5:</b> Correlação entre espécimes de flebotomíneos e identificação de <i>Leishmania spp.</i> segundo a árvore filogenética.....	59

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.1:</b> Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana – Acre.....	25
<b>Gráfico 1.2:</b> Coeficiente de detecção de Leishmaniose Tegumentar Americana – AC...25	
<b>Gráfico 1.3 :</b> Leishmaniose Tegumentar Americana/ Rio Branco (AC).....	25
<b>Gráfico 1.4:</b> Comparativo do número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por forma clínica no município de Rio Branco, 2009 e 2010.....	26
<b>Gráfico 5.5:</b> Percentual distribuído por gêneros de flebotomíneos coletados nas áreas de mata.....	51
<b>Gráfico 5.6:</b> Percentual distribuído por gêneros de flebotomíneos coletados nas áreas de peridomicílio.....	51

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**BLOTTO** - *Bovine lacto transfer technique optimizer*

**CSBs** - blocos conservados de seqüência

**cm** - centímetros

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**rDNA**- ácido desoxirribonucleico ribossomico

**dNTPs** - desoxirribonucleotideo trifosfatos

**DVE** - Departamento de Vigilância Epidemiológica

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetracético

**FUNASA**- Fundação Nacional de Saúde

**GIPLs** - fosfolipídeos de glicosil-inositol

**gp 63**- glicoproteína de 63 Kilo Daltons que ocorre na superfície de *Leishmania* spp.

**h** - horas

**HIV** - vírus da imunodeficiência adquirida

**Hsp 70** (70 kilodalton heat shock proteins) - Proteína de choque térmico de 70 kilo Daltons

**IFN- $\gamma$**  - interferon-gama

**ITS** (Internal transcribed spacer ) - espaço interno transcrito

**kb** – Quilobase

**kDNA** - ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto

**Km<sup>2</sup>** - Quilometros quadrados

**LC** - Leishmaniose cutâneo-simples

**LCD** - Leishmaniose cutâneo-difusa

**LMC** - Leishmaniose mucocutânea

**LPG** - lipofosfoglicano

**LPK** - Leishmaniose dérmica pós calazar

**LTA** - Leishmaniose Tegumentar Americana

**LVA** - Leishmaniose Visceral Americana

**LV** - Leishmaniose Visceral

**m** - metros

**min** - minuto

**mL** - mililitro

**mm** - milímetros

**mM** - milimolar

**M** - molar

**MP** - matriz peritrófica

**MPI** – manose fosfato isomerase

**MS** - Ministério da Saúde

**ng** - nanogramas

**nm** - nanômetro

**NADH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NCBI** (National Center for Biotechnology Information) - Centro Nacional para Informação Biotecnológica

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**ON** - óxido nítrico

**pb** - pares de bases

**PBS**- Phosphate buffered saline

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**pmol** - picomol

**RFLP** - Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição

**RNA** - ácido ribonucleico

**rpm** - rotações por minuto

**SSC** - Solução de citrato de sódio

**SDS** - Sodium dodecyl sulfate

**seg** - segundo

**SFM** - Sistema Fagocítico Mononuclear

**SINAN** - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**SL** - splice leader

**sp** - espécie

**spp** - espécies

**SSU rRNA** - espaçadores internos do gene ribossômico sub-unidade menor

**SVS**- Secretaria de Vigilância em Saúde

**TBE** - Tris Borato/EDTA

**TE** - Tris/EDTA

**U** - unidade

**UV**- Ultravioleta

**v** - volume

**V** - Volts

**WHO** – World Health Organization

**µg** - micrograma

**µL** - microlitro

**µm** - micrômetro

**6PGD** – Fosfogluconato de hidrogenase



## Sumário

1.0. Introdução.....	1
1.1. Considerações Gerais.....	1
1.2. O Parasito do gênero <i>Leishmania</i> .....	4
1.3. O DNA do parasito e sua diversidade genética .....	7
1.4. O Ciclo Biológico do Parasito.....	9
1.5. Hospedeiros Vertebrados dos parasitos causadores das leishmanioses. .	12
1.6. Hospedeiros Invertebrados - Subfamília Phlebotominae.....	14
1.7. A Leishmaniose no Brasil .....	17
1.7.1. Leishmaniose Tegumentar Americana .....	17
1.7.2. Leishmaniose Visceral .....	21
1.8. A Leishmaniose no Município de Rio Branco (Acre). .....	22
1.9. Diagnóstico da infecção de flebotomos por <i>Leishmania</i> spp. ....	27
2. Justificativa.....	30
3. Objetivos .....	31
3.1. Objetivo Geral .....	31
3.2. Objetivos Específicos .....	31
4.0. Materiais e Métodos.....	32
4.1. Área de Estudo .....	32
4.2. Estudo da fauna de flebotomíneos.....	35
4.2.1. Métodos de captura.....	35
4.2.2. Preparação e montagem dos flebotomíneos.....	37
4.2.3. Identificação Taxonômica dos flebotomíneos.....	37
4.3. Diagnóstico Molecular .....	38
4.3.1. Obtenção do Extrato total dos flebotomíneos.....	38

4.3.2. Extração de DNA.....	38
4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase – <i>Hot-start PCR multiplex</i> . ....	39
4.3.4. Visualização dos produtos da PCR.....	40
4.3.5. Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição - RFLP .....	42
4.4. Clonagem .....	43
4.4 -1 Preparo de células competentes.....	44
4.4. 2 Clonagem .....	44
4.4. 3 PCR de Colônia .....	45
4.4. 4 Sequenciamento.....	46
4.4.5 Análise das Sequências .....	46
5.0. Resultados .....	48
5.1. Estudo da fauna flebotomínica do município de Rio Branco (Acre).....	48
5.2. Avaliação de Infecção Natural. ....	52
6.0. Discussão .....	59
6.2. Avaliação de Infecção Natural por <i>Leishmania</i> spp. ....	61
7.0. Conclusões.....	68

## 1.0. Introdução

### 1.1. Considerações Gerais

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. Possuem ampla distribuição geográfica e diversidade de manifestações clínicas agrupadas em duas categorias: Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral, as quais constituem um importante problema de saúde pública. As Leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de pessoas em 98 países, 3 territórios, e 5 continentes são reportados como de transmissão endêmica de leishmaniose. No total, a contagem de casos oficiais totalizou mais de 58.000 casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 220.000 notificações de leishmaniose tegumentar (LT) por ano mundialmente (ALVAR et al., 2012). Estima-se que 12 milhões de pessoas são consideradas atualmente infectadas, com cerca de 1-2 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano (WHO, 2011). Várias espécies de *Leishmania* levam a uma expressão clínica específica, que pode ser cutânea, mucocutânea ou visceral, e de gravidade variável. A Leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum, com uma estimativa de 1,5 milhões de novos casos por ano, podendo ser causada por *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. braziliensis* e outras espécies (WHO, 2012).

A importância das leishmanioses reside não somente na alta incidência e extensa distribuição geográfica, mas também na possibilidade da doença assumir distintas manifestações clínico-patológicas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes. A forma tegumentar da doença possui grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo, ou até mesmo levar a morte, no caso da forma visceral (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Do ponto de vista clínico, as leishmanioses se dividem em dois grandes grupos: forma tegumentar e forma visceral. Em ambos os grupos, depois de estabelecida a infecção e de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, assim como a resposta imune do hospedeiro infectado, os eventos subsequentes ocorrerão de forma variada (PERSON & SOUSA, 1996).

Várias formas clínicas da doença são induzidas por diferentes espécies de *Leishmania* e, em particular as espécies variam na patogenicidade em diferentes populações humanas. É geralmente aceito que o controle da *Leishmania* dentro do

hospedeiro é mediado por resposta imune inata e respostas imunes adaptativas. A interação da *Leishmania* spp. e a resposta imune do hospedeiro é evidente, não só em termos da evolução clínica ou sub-clínica de infecção, mas também a taxa de cura espontânea e doença recorrente. (WHO, 2010)

De uma maneira geral o quadro de lesões pode variar de lesões únicas ulceradas ou nodulares, muitas vezes de evolução benigna (leishmaniose cutâneo-simples, LC), a casos de numerosas lesões disseminadas por todo o corpo do indivíduo ou lesões difusas levando à quadros graves (leishmaniose cutâneo-difusa, LCD), de difícil cura, ou ainda, a lesões mutilantes provocadas pelo parasitismo de mucosas (leishmaniose mucocutânea, LMC). Em relação à Leishmaniose Visceral (LV), os parasitos multiplicam-se preliminarmente em macrófagos da pele, alcançando depois as células SFM dos órgãos internos, principalmente baço, fígado e medula óssea, provocando quadros cuja severidade depende normalmente do tempo de evolução clínica, gerando quadros assintomáticos que podem evoluir a moderados e graves, onde, observa-se hepato-esplenomegalia com comprometimentos generalizados, acarretando em casos fatais, quando não tratados (WHO, 1998). No Brasil o Ministério da Saúde (MS) disponibiliza para o tratamento de pacientes com as leishmanioses visceral e tegumentar americana medicamentos como o antimonial pentavalente como droga de primeira escolha e, a depender da indicação, o isotionato de pentamidina, anfotericina B desoxicolato e anfotericina B lipossomal, sendo que esta última está indicada apenas para pacientes com LV uma vez que não possui registro para o tratamento de pacientes com LTA. A anfotericina B desoxicolato é considerada como droga de primeira escolha no tratamento de gestantes com as leishmanioses e coinfectados com *Leishmania* / HIV e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso. (SIPAR, 2011)

A distribuição geográfica das leishmanioses está associada à presença do inseto vetor, fêmeas hematófagas de dípteros da sub-família Phlebotominae encontradas mundialmente. Soma-se a isto uma série de características biológicas inerentes ao próprio vetor que certamente influencia em sua capacidade vetorial, podendo então exercer um impacto relativo na disseminação da doença, devido ao papel que os vetores flebotomíneos desempenham na dispersão do parasito (DESJEUX et al., 1999).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem ampla distribuição no Continente Americano com registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresentam diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007).

A Leishmaniose Visceral corresponde à forma mais severa da doença, e é fatal se não for tratada. Sua prevalência é de 500 000 casos por ano, com mais de 90% destes na Índia, Bangladesh, Brasil, Nepal e Sudão (WHO, 2010).

A Leishmaniose Visceral, devido a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Possui ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar neo-tropical (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2006).

No Brasil, ambas LTA e LVA se encontram em processo de expansão em quase todos os estados, com tendência à urbanização e registros ocasionais de surtos, constituindo um quadro endêmico com características próprias das nossas questões de saúde pública (LIMA et al., 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil foi notificado, no período de 2001 – 2010, um total de 33.473 casos de Leishmaniose Visceral, onde a maior parte dos casos se concentra na região Nordeste com 17.969 casos confirmados no mesmo período (SINAN/SVS/MS 2011). Em relação à LTA, foram notificados, neste período (2001 – 2010), um total de 134.286 casos humanos no país. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, somente no ano de 2010 foram notificados 21.981 casos, dos quais 8.911 foram registrados nos estados que fazem parte da Amazônia brasileira, mantendo-se valores semelhantes aos anos anteriores (SINAN/SVS/MS 2011). Mais de uma espécie de *Leishmania*, de ambos os subgêneros: *Viannia* – que inclui espécies do complexo *braziliensis*, e *Leishmania* - composto por aquelas que compreendem o complexo *mexicana* (THOMAZ-SOCCOL et al., 1993; LAINSON & SHAW, 1998), podem causar as formas tegumentares no

Brasil. Se tratando da forma Visceral da doença, até o momento no Brasil o único agente etiológico é a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*.

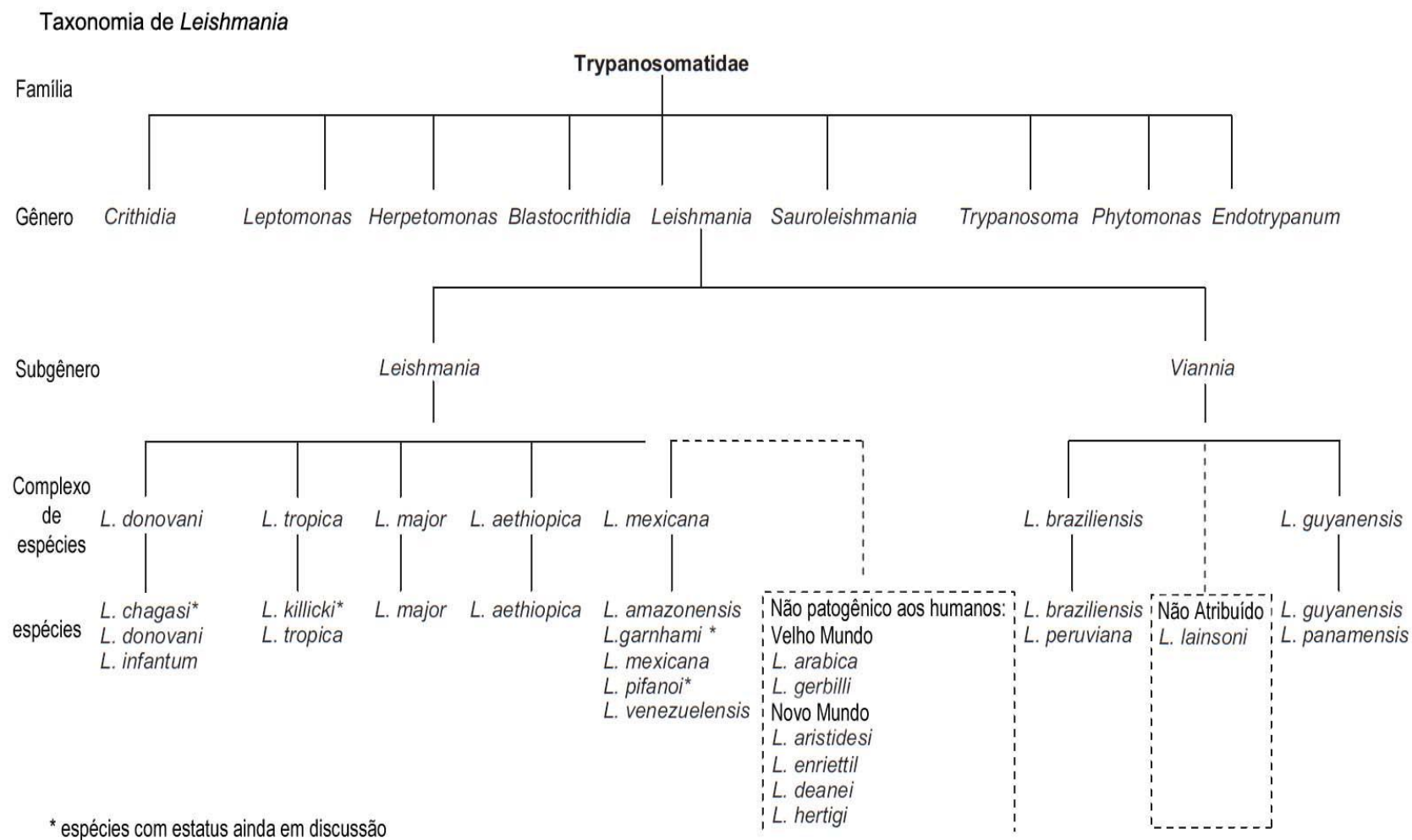
## 1.2. O Parasito do gênero *Leishmania*

Os agentes etiológicos das Leishmanioses são protozoários parasitos morfológicamente similares do gênero *Leishmania* ROSS, 1903 que pertencem ao sub-reino *Protozoa*, filo *Sarcomastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, todos com graus variáveis de especificidade pelo hospedeiro invertebrado (CHANCE, 1985). São organismos unicelulares, digenéticos, heteroxênicos, contendo uma organela especializada denominada cinetoplasto. Este protozoário apresenta duas formas morfológicas distintas durante seu ciclo: amastigota e promastigota. A forma amastigota localiza-se no fagossoma das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados (homem, animais selvagens e animais domésticos). Os amastigotas possuem formas ovaladas ou arredondadas, com cerca de 2 a 6 µm de diâmetro, contendo um núcleo deslocado para a porção anterior acima do cinetoplasto, próximo ao qual se encontra um flagelo interno inaparente. A forma promastigota habita o aparelho digestório do vetor e possui forma alongada, com dimensões de 15 a 30 µm de comprimento por 2 a 3 µm de diâmetro, apresenta um núcleo central, um cinetoplasto anterior ao núcleo e um flagelo longo e livre emergindo da bolsa flagelar na extremidade anterior (LAINSON & SHAW, 1972, 1987; MOLYNEUX & KILLICK-KENDRICK, 1987; PEARSON & SOUZA, 1996).

Atualmente são conhecidas cerca de trinta espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, agrupadas e classificadas em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania (sensu stricto)* e *Viannia* (ver Figura 1.1) (LAINSON & SHAW, 1987, WHO 2010.). De acordo com esta classificação, as espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* desenvolvem-se de forma exclusiva na porção média e anterior do intestino (seção Suprapilaria), enquanto as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se nas partes anterior e média, como também no intestino posterior na região do piloro (seção Peripilaria) dos flebotomíneos (LAINSON & SHAW, 1979). Esta classificação se mantém e é corroborada pela análise de caracteres intrínsecos como isoenzimas (RIOUX et al., 1990), análise da seqüência do gene de mini-exon (FERNANDES et al., 1994), análise dos perfis de restrição (RFLP) dos espaçadores internos do gene ribossômico sub-unidade menor (SSU rRNA) (NOYES et al., 1997; CUPOLILLO et al.,

2000), e mais recentemente, através da análise de curvas de dissociação térmica por PCR em tempo real, utilizando como alvo a região conservada dos minicírculos de kDNA (PITA-PEREIRA et al., 2012). Os parasitos de répteis foram agrupados em um novo gênero: *Sauroleishmania* (RANQUE, 1973; KILLICK-KENDRICK et al., 1986).

Estudos baseados em aspectos bioquímicos e moleculares apontam claras relações filogenéticas entre tripanosomatídeos do gênero *Endotrypanum* (que parasitam hemácias de preguiças (Bradypodidae ou Megalonychidae) na forma tripomastigota ou epimastigota, mas desenvolvem-se nos flebótomos e em culturas *in vitro* como promastigotas), e algumas espécies de *Leishmanias* que tinham classificação incerta. O que sugeriu a criação de duas linhagens genéticas distintas, as “Seções” *Euleishmania* e *Paraleishmania*. A primeira compreende os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*; a segunda abriga o gênero *Endotrypanum* e *L. herreri*, *L. deanei*, *L. hertigi*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis* (CUPOLILLO et al., 2000; 2001; SCHÖNIAN, 2010).



**Figura 1.1:** Taxonomia do gênero *Leishmania* (WHO, 2010) – Adaptado para o Idioma Português.



### 1.3. O DNA do parasito e sua diversidade genética

A ordem Kinetoplastida é constituída por protozoários que apresentam uma organela denominada cinetoplasto, que é uma região especializada da mitocôndria, constituída por moléculas de DNA circulares e concatenadas formando a rede de DNA do cinetoplasto ou kDNA. O genoma destes parasitos consiste de dois tipos de ácido desoxirribonucleico de replicação autônoma: DNA nuclear e DNA mitocondrial referido como kDNA.

O kDNA representa a informação genética mitocondrial dos kinetoplastídeos e corresponde a 10 - 20% do DNA total da célula. Consiste em uma rede compacta, formada por dezenas de milhares de moléculas de DNA circular menores, chamadas de minicírculos que encontram-se concatenadas entre si, com tamanhos aproximados de 800 pares de base (pb), localizadas na matriz mitocondrial ou cinetoplasto (SIMPSON,1987; RYAN 1988; RAY, 1989).

Os maxicírculos estão presentes em menor número na rede de kDNA, com cerca de 50 cópias, com tamanhos variando de 20 a 37 kb, dependendo da espécie. Equivalem, geneticamente, ao DNA mitocondrial em outros eucariotos, e codificam para genes mitocondriais estruturais como citocromo B, subunidades de citocromo oxidase, subunidades de NADH desidrogenase, todos envolvidos no processo de obtenção de energia celular. Os maxicírculos codificam também os genes de RNAs ribossomais da mitocôndria, 9S e 12S, além de outras fases abertas de leitura (SIMPSON & SIMPSON, 1978; DE LA CRUZ et al., 1984; SHAPIRO & ENGLUND, 1995).

Os minicírculos, na maioria das espécies de tripanosomatídeos, perfazem aproximadamente 90 - 95% da massa do kDNA (ENGLUND, 1982). A função genética crucial dos minicírculos é codificar pequenos RNAs guias que possuem aproximadamente 70 nucleotídeos, que têm como função governar a edição do RNA mitocondrial (STURM & SIMPSON, 1990). Apesar da heterogeneidade existente entre as seqüências primárias dos minicírculos, algumas características de organização de seqüências são comuns a todos eles. Essas moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pb, razoavelmente homogênea entre representantes do mesmo gênero (SIMPSON, 1987). RAY (1989), comparando as regiões conservadas dos minicírculos de oito espécies de tripanosomatídeos, demonstrou a existência de três

blocos conservados de seqüência (CSBs), os quais já tinham sido descritos em *Trypanosoma cruzi* por DEGRAVE et al., (1988). O CSB-3, por exemplo, possui 12 pb (5'- GGGGTTGGTGTA- 3') e foi denominado de seqüência universal ou canônica, correspondendo à origem de replicação de uma das fitas de DNA dos minicírculos de tripanosomatídeos.

No gênero *Leishmania*, os minicírculos do kDNA possuem tamanhos em torno de 800 pb e estão representados por uma única região conservada de aproximadamente 120 pb seguida de uma região de seqüência altamente variável (650 pb) , cujo grau de heterogeneidade parece refletir o número de classes de RNAs necessário para edição dos transcritos mitocondriais (SIMPSON & SHAW, 1989; SHAPIRO & ENGLUND, 1995). Existe um consenso entre os pesquisadores de que essas moléculas de minicírculos representam bons marcadores moleculares para diagnóstico, pois estão representadas em grande número de cópias no cinetoplasto, em cerca de 10.000 - 15.000 cópias por rede de kDNA (DEGRAVE et al., 1994; CRUZ E TOSI, 1996; RODRIGUES, 2000). Ressalta-se que mínimas variações encontradas na região conservada dos minicírculos de *Leishmania* puderam ser exploradas para diferenciar entre os principais agentes etiológicos das leishmanioses cutânea e visceral no Brasil (PITA-PEREIRA et al., 2012).

A análise de seqüências repetitivas do genoma nuclear e mitocondrial tem mostrado grande heterogeneidade dentro do gênero *Leishmania*, caracterizando-as como alvos específicos para tipagem molecular e identificação precisa de organismos distintos (BARKER, 1987; SIMPSON, 1987). O gene de mini-exon representa uma dessas seqüências repetitivas presentes no núcleo, que tem permitido a distinção entre gêneros e espécies de Kinetoplastida (FERNANDES et al., 1994). Outro gene que se encontra em múltiplas cópias no genoma das leishmanias, e que tem sido útil em ensaios de tipagem, é o gene codificante para RNA ribossômico. CUPOLILLO et al. (1995) relataram o potencial das regiões espaçadoras transcritas deste gene, em experimentos de caracterização molecular, conseguindo definir as distintas espécies do subgênero *Viannia*. Diferentes metodologias de PCR baseadas em alvos como microsatélites, DNA do cinetoplasto (kDNA), seqüências teloméricas, gp63, hsp70, miniexon e b-tubulina, têm sido propostas para detecção e tipagem de parasitos (TAVARES et al., 2003). Mais recentemente, com a técnica de PCR em tempo real, amostras podem ser processadas

em menos de uma hora, sendo possível diferenciar rapidamente até mesmo uma simples mutação de nucleotídeo dentro de uma sequência de DNA alvo (BEN ABDA et al., 2010, CASTILHO et al., 2008, NICOLAS et al., 2002, QUISPE-TINTAYA et al., 2005, SCHULZ et al., 2003, TALMI-FRANK et al., 2010, WORTMANN et al., 2005, 2007). Estes ensaios são capazes de distinguir entre grupos de *Leishmania*, permitindo a diferenciação entre parasitos do complexo *L (L.) donovani* e aqueles pertencentes ao subgênero (*Viannia*), além de outras espécies do subgênero *Leishmania* (SCHULZ et al., 2003, WORTMANN et al., 2005). Com o uso de sondas TaqMan direcionadas para o locus glicose- 6- fosfatodesidrogenase, foi possível diferenciar *L (V.) braziliensis* de outras espécies do subgênero *Viannia* e daquelas do subgênero *Leishmania* (CASTILHO et al., 2008).

#### **1.4. O Ciclo Biológico do Parasito**

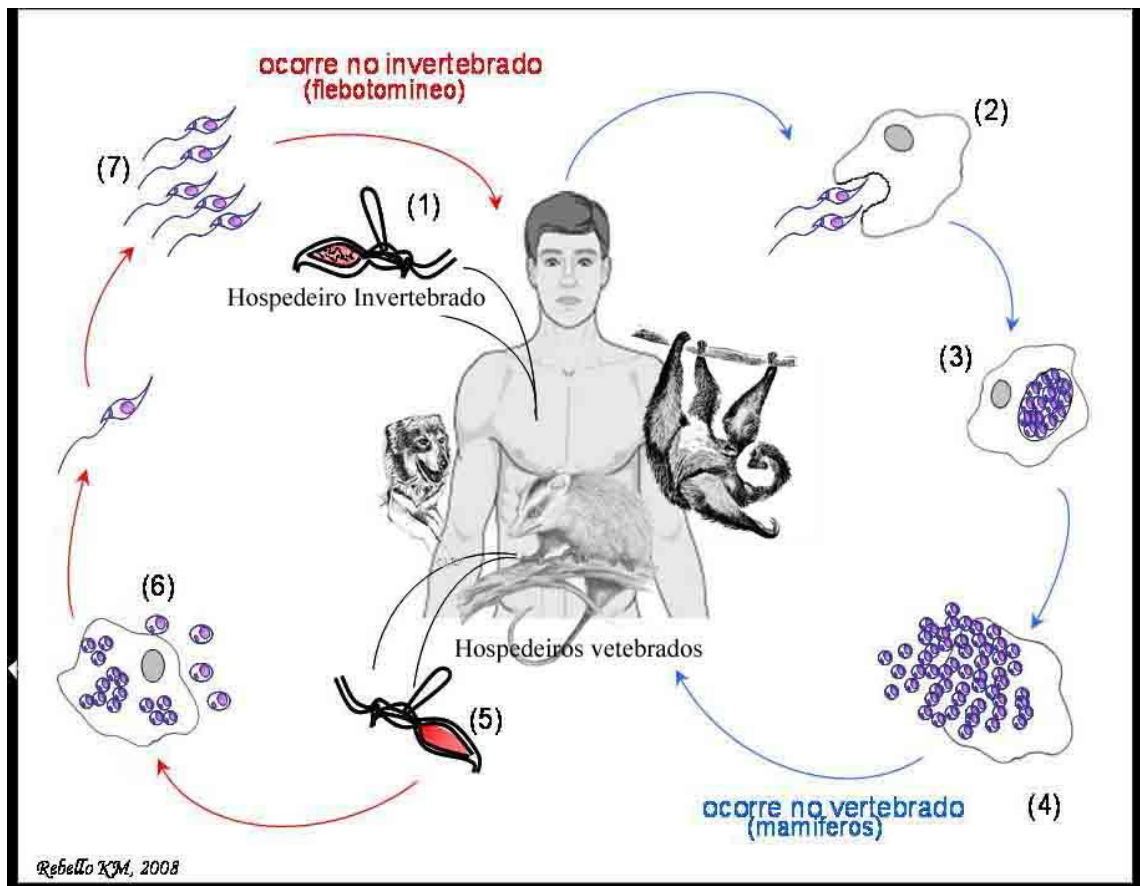
Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) têm sugerido mudanças no padrão de transmissão, onde inicialmente era considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas. Observa-se a existência de três perfis epidemiológicos: a) Silvestre - onde a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); b) Ocupacional ou lazer – no qual a transmissão está relacionada à exploração desordenada da floresta e derrubada de madeira para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo (antropozoonose); c) Rural ou periurbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose) (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007).

A LVA também tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), São Luiz (MA), Natal (RN), Fortaleza (CE), entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007).

No ciclo epidemiológico das Leishmanioses o inseto flebotomíneo representa o elo entre os reservatórios e o homem (Figura 1.2), o qual se comporta como hospedeiro acidental de *Leishmania* spp, não parecendo assumir papel relevante na transmissão da doença (MINISTERIO DA SAUDE/ SVS/DVE, 2006).

As formas promastigotas metacíclicas são as formas infectantes (KAMHAWI, 2006). Estas formas são depositadas juntamente com a saliva do vetor infectado no momento da alimentação sanguínea, na pele do novo hospedeiro mamífero (BATES, 2007; DANTAS-TORRES et al., 2006). Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas, inicialmente por neutrófilos e eosinófilos e depois por macrófagos e células dendríticas (POLI et al., 2002; BANETH, 2008).

Os parasitos são interiorizados por macrófagos e encerrados num vacúolo – fagossoma (BRAZIL,1984). Os fagossomas fundem-se com vesículas transportadoras de enzimas lisossomais originando os fagolisossomas (vacúolos parasitóforos), que são organelas com *pH* ácido, ricas em enzimas hidrolíticas e também possuem toda maquinaria bioquímica para síntese de agentes microbicidas, como espécies ativas do oxigênio e óxido nítrico (ON) (ANTOINE et al., 1990). As leishmanias sobrevivem nestas condições devido, por exemplo, ao lipofosfoglicano (LPG) que neutraliza os radicais livres e inibe a explosão respiratória pelo macrófago, interferindo assim na cascata de ativação da proteína quinase C e na formação de 1,4,5 inositoltrifosfato pelo macrófago infectado. Um outro exemplo que confere resistência aos parasitos no interior dos fagolisossomos é a presença dos fosfolipídeos de glicosil-inositol (GIPLs), cuja ação se faz sobre a inibição da explosão oxidativa e da síntese de ON, o que favorece a redução da atividade leishmanicida de macrófagos infectados (MAUEL, 1996). Estas macromoléculas (GIPLs) recobrem toda a superfície dos parasitos e são sintetizadas em grande quantidade, tanto por amastigotas quanto por promastigotas (SCHNEIDER et al., 1990).



**Figura 1.2: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.** (Fonte : Imagem cedida por Karina Mastropasqua Rebello/Instituto Oswaldo Cruz- Adaptada por Thais de Araújo Pereira). No ciclo urbano e peri-urbano, as fêmeas infectadas por *Leishmania* podem transmitir as formas metacíclicas ao homem e a animais domésticos (1). As formas promastigotas infectam células do sistema fagocítico mononuclear (2), e dentro dessas células sofrem metaciclo-gênese, transformando-se em amastigotas (3). As formas amastigotas se multiplicam intensamente causando o rompimento das células infectadas (4), ficando livres na corrente sanguínea para infectar novas células. Assim, quando um flebotomíneo faz o repasto sanguíneo no vertebrado infectado (5), ele ingere, juntamente com o sangue, células contendo as formas amastigotas do parasito (6) que irão se multiplicar e se diferenciar em promastigotas no trato digestório do díptero (7), migrando posteriormente para a probóscide do vetor.

A resistência do parasito aos baixos valores de *pH* do fagolisossoma acontece pela presença de uma enzima de membrana, que funciona como uma bomba de prótons, bombeando prótons de dentro do vacúolo parasitóforo para o exterior (ZILBERSTEIN & DWYER, 1988). No vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas diferenciam-se em formas aflageladas, amastigotas, que são metabolicamente mais ativas em *pH* ácido (CAZULLO, 1992). As amastigotas multiplicam-se por divisão binária no interior do fagolisossoma, o que causa o rompimento da célula infectada, liberando os parasitos no meio extracelular, os quais serão fagocitados por outros macrófagos, reiniciando os ciclos de multiplicação.

O ciclo de vida no interior do intestino do flebotomíneo é complexo, variando entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, e incluindo um número distinto de formas morfológicas (LAWYER et al., 1987; WALTERS et al. 1989; CIHAKOVA & VOLF, 1997; ROGERS et al., 2002; GOSSAGE et al., 2003; WILSON et al., 2010). No subgênero *Leishmania*, as formas amastigotas ingeridas juntamente com os macrófagos de mamíferos hospedeiros são liberadas no intestino médio do inseto vetor após a ingestão sanguínea, e se transformam em promastigotas procíclicas, as formas proliferativas. Cerca de 48- 72 horas após o repasto sanguíneo, os promastigotas se desenvolvem em formas longas que não se dividem, os promastigotas nectomonas, os quais escapam da matriz peritrófica para o lúmen do intestino médio. Aqui eles se desenvolvem em promastigotas leptomonas - um sinônimo para nectomonas curtas (WALTERS et al., 1989, CIHAKOVA & VOLF. 1997, BATES, 2007), iniciando assim outro ciclo proliferativo, e pelo quarto dia após a alimentação sanguínea, estas formas evolutivas compreendem a maioria da população de parasitas encontrada no inseto vetor. A fase final corresponde na transformação de formas leptomonas em formas de estágio infectante de mamíferos, os promastigotas metacíclicos. Entre 7 - 10 dias após a alimentação sanguínea, 60% da população de parasitas na região da válvula estomodeal (junção entre o intestino médio e intestino anterior) é composta desta forma (ROGERS et al., 2002; GOSSAGE et al., 2003; WILSON et al., 2010).

Os promastigotas metacíclicos se concentram na região da válvula estomodeal (cárdia) promovendo a destruição da mesma. Isso se dá em função da degradação de uma camada de quitina que reveste esta porção do intestino do inseto, através da liberação de quitinase, produzida pelo próprio parasito (SCHLEIN et al., 1992). A destruição da válvula faz com que o inseto ao tentar sugar o sangue de um vertebrado durante a picada, regurgite o conteúdo intestinal que carrega os parasitos presentes na porção anterior do tubo digestivo (cárdia e probóscide), podendo infectar o hospedeiro vertebrado.

### **1.5. Hospedeiros Vertebrados dos parasitos causadores das leishmanioses.**

A interação reservatório- parasito é multifatorial, sendo considerada um sistema complexo, imprevisível e dinâmico onde inclui o homem e/ ou animal doméstico, o parasito, o vetor e o animal reservatório dentro de um determinado ambiente. Este conjunto desencadeando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança

em função das alterações do meio ambiente e das interações que ligam suas histórias de vida e modelam o processo evolutivo (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007).

Segundo a OMS, para ser incriminada como hospedeiro reservatório, a população de animais deve ser numerosa, possuir hábitos gregários frequentes, vida longa, intenso contato com o inseto vetor, infecção leve de curso longo e o parasito infectante deve ser indistinguível do parasito encontrado no homem (ASHFORD, 1996). Considera-se “RESERVATÓRIO”, a espécie ou o conjunto de espécies que garantem a circulação de um determinado parasito na natureza dentro de um recorde de tempo e espaço (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007). ASHFORD (1996; 1997) propoe a mais simples, clara e objetiva conceituação ao definir RESERVATÓRIO, não como sendo uma única espécie, mas como um sistema formado pelo conjunto de espécies que garanta a manutenção de um determinado parasito na natureza. O autor define ainda que um sistema reservatório deve ser consistente, equilibrado e, principalmente, deve ser sempre considerado numa escala espaço-temporal única. São características importantes desse sistema: a alta abundância relativa das espécies mamíferas que sustentam a rede de transmissão (para permitir que cada componente seja fonte de infecção a pelo menos outro animal), e alta longevidade – do sistema e não necessariamente dos hospedeiros – para permitir a persistência do agente durante o período de baixa transmissão (ASHFORD, 1996). Porém neste caso, torna-se relevante reconhecer os hospedeiros que são essenciais à manutenção do parasito (reservatórios) daqueles que são meramente incidentais (hospedeiros que se infectam, mas que apresentam baixa transmissibilidade).

Uma espécie de *Leishmania* pode ser mantida por diversos hospedeiros (homens, cães e roedores), e um mesmo hospedeiro pode albergar diferentes espécies deste parasito (SALIBA et al., 1988; STRELKOVA et al.,1993). Identificar os animais que podem servir de reservatório para as leishmanias, em uma área endêmica, tem grande relevância na epidemiologia das leishmanioses. Infecções por leishmanias que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais, algumas espécies de roedores (*Bolomys lasiurus*, *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*), marsupiais (*Didelphis albiventris*), edentados (*Bradypus tridactylus*) e canídeos silvestres. (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007). Se tratando de leishmaniose visceral, na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção

em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios conhecidos até o momento são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2006).

A identificação de um animal como reservatório necessita ser provada e depende do isolamento do parasito de lesões de pele ou de vísceras (SALIBA & OUMEISH, 1999). Métodos de laboratório (imunoensaios, eletroforese de isoenzimas, sondas de DNA e técnicas de PCR) têm papel essencial na identificação de espécies do parasito isoladas de animais e podem ser utilizados como importante ferramenta para identificação de novos reservatórios.

### **1.6. Hospedeiros Invertebrados - Subfamília Phlebotominae.**

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (YOUNG & DUNCAN, 1994). A subfamília Phlebotominae está dividida em seis gêneros, três no Velho Mundo: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, e três no Novo Mundo: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*. *Psychodopygus* tem sido considerado como gênero por alguns autores (FRAIHA et al., 1971; FORATTINI, 1973; FRAIHA et al., 1974), contudo, manteve-se sua posição taxonômica como subgênero de *Lutzomyia*. Segundo a classificação de GALATI (1995; 2003), os flebotomíneos americanos são divididos em 23 gêneros, os vetores de leishmânias estão distribuídos principalmente em sete deles: *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus*, e *Trichophoromyia*.

No Velho Mundo, o gênero *Phlebotomus* é o mais importante relacionado à leishmaniose, enquanto que no Novo Mundo, as espécies mais relevantes são pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (revisado por LAINSON & SHAW, 1987, 1992, 1998). Apesar da existência de mais de 500 espécies de flebotomos no Novo Mundo, apenas cerca de 30 delas são incriminadas como vetores (Ver tabela 1.1). Segundo a Organização Mundial de Saúde, para que uma espécie seja considerada transmissora, cinco critérios devem ser cumpridos: alta densidade do flebotomo na área endêmica, seu grau de antropofilia, a infecção natural por *Leishmania* sp., a comprovação experimental da infecção e a transmissão pela picada (WHO, 1990).

Esses pequenos insetos raramente ultrapassam cinco milímetros, apresentam pernas delgadas e longas, e são facilmente reconhecidos no campo devido a três características marcantes: quando em repouso as asas não permanecem justapostas, mas



em ângulo em relação ao abdômen; seu corpo é densamente piloso; e geralmente aproximam-se das fontes de alimento através de pequenos saltos (FORATTINI 1973; KILLICK-KENDRICK 1999).

Os flebotomíneos devido aos seus aspectos físicos recebem várias denominações populares, como “mosquito palha”, devido sua coloração semelhante à palha vegetal; “asa branca”, “asa dura” ou “anjinho”, porque possuem asas de formato lanceolado, que na posição de pouso permanecem levantadas, com pequena inclinação; “tatuquira”, pelo hábito de se abrigarem em buracos de tatu; “arrepinado”, por possuírem o corpo piloso; “pula-pula”, por ficarem saltitando nos locais de pouso; “cangalhinha”, porque após a hematofagia, o estômago posterior das fêmeas se dilata e ocupa quase toda cavidade abdominal, assemelhando-se a uma cangalha de animal (FORATTINI, 1973).

Desde a descrição da primeira espécie de Psychodidae por SCOPOLI em 1786, diversas modificações têm sido propostas na classificação do grupo, em especial a daqueles do continente americano. THEODOR, em 1948, propôs uma nova classificação para os flebotomíneos do Novo Mundo, dividindo-os em quatro gêneros, com importância destacada para o uso de caracteres do cibário e das genitálias masculina e feminina para a separação dos grupos. Pequenas modificações foram feitas nessa classificação do grupo por YOUNG & FAIRCHILD (1974), LEWIS et al. (1977) e por YOUNG & DUNCAN (1994). Atualmente, muitos trabalhos utilizam a classificação proposta por GALATI, no ano de 1995, baseada na filogenia do grupo, com ênfase para os flebotomíneos da América (GALATI 2003), que elevou a gênero os subgêneros propostos na taxonomia de YOUNG & DUNCAN (1994) empregados anteriormente. No conceito de GALATI (2003), além do gênero citado em que somente algumas espécies estão incluídas, outros gêneros existem. Assim, quando se lê *Nyssomyia neivai* estamos nos referindo à espécie *Lutzomyia neivai* que era empregada em publicações anteriores.

Os flebotomíneos adultos apresentam dimorfismo sexual expresso nas diferenças da forma do corpo, como também no comportamento alimentar que se expressa na hematofagia exclusiva das fêmeas, as quais apresentam um ciclo gonodotrófico, fazendo a ovoposição cerca de cinco à sete dias após o repasto sanguíneo. A alimentação sanguínea é necessária para que ocorra o amadurecimento do folículo ovariano e desenvolvimento dos ovos. Além disso, os flebotomos alimentam-se de seivas de plantas ou secreções de afídeos (*honeydew*) como fonte de carboidratos,

dos quais obtêm energia para suas atividades fisiológicas, principalmente relacionadas ao voo (BRAZIL & BRAZIL, 2003; FORATTINI, 1973).

Os flebotomíneos apresentam peças bucais relativamente curtas (0,2 - 0,4 mm), impedindo uma penetração profunda na pele dos hospedeiros. A laceração da pele e dos capilares sanguíneos leva à formação de hemorragia subcutânea de onde o sangue é sugado, processo denominado “*Pool feeding*”. A saliva dos flebotomíneos é uma importante ferramenta na hematofagia, sendo observada pela primeira vez por ADLER & THEOR, em 1926, a presença de anticoagulantes na saliva de *Phlebotomus papatasi*. É de grande importância o estudo da composição salivar dos flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* (vetor de *L. infantum*) a espécie mais estudada, a qual apresenta um peptídeo denominado maxadilina em alusão a seu potente efeito vasodilatador. Substâncias anticoagulantes e vasodilatadoras presentes na saliva de flebotomíneos possibilitam ao inseto neutralizar os mecanismos de hemostasia do vertebrado, facilitando o repasto sanguíneo, pois permitem a formação de pequenas poças de sangue que protraem dos diminutos vasos dilacerados pela probóscida do inseto (BRAZIL & BRAZIL, 2003; RIBEIRO et al., 1989).

Para se reproduzirem, os flebotomos põem ovos de maneira esparsa no substrato, os quais ficam aderidos a uma substância viscosa, que é produto de secreção das glândulas acessórias. A média de incubação dos ovos é de sete a quinze dias de acordo com a espécie. Como todo díptero, os flebotomos são holometábolos, sendo o ciclo biológico desses insetos composto por quatro estágios larvais. As larvas vivem em solo úmido ou rico em detritos orgânicos. A quarta larva migra para um solo ligeiramente mais seco para pupar. Após a evolução do estágio de pupa para adulto, o inseto vive cerca de 28 à 32 dias. Neste período a fêmea é capaz de realizar repastos sanguíneos, adquirindo o parasito no interior de macrófagos, se a fonte alimentar em questão estiver infectada. Os flebotomos possuem hábitos crepusculares e noturnos para realizar a hematofagia, embora possuam também hábitos matutinos e vespertinos no interior das matas (FORATTINI, 1973).

O conhecimento da fauna de flebotomíneos e da sua dinâmica populacional é essencial para o entendimento dos ciclos de transmissão das leishmanias e para o desenvolvimento de estratégias de controle eficazes. Desta forma, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no Brasil e em outros países da América, com o objetivo de

identificar a fauna presente em regiões onde ocorrem casos de LVA e LTA, e estudar a dinâmica das populações desses dípteros.

**Tabela 1.1 – Vetores de *Leishmania spp.* responsáveis pela transmissão de leishmaniose cutânea nas Américas.**

Espécie de <i>Leishmania</i>	Distribuição geográfica	Forma clínica	Vetor (es)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	América do Sul e Central	LC/LMC	<i>Ny. intermedia</i> , <i>Ny. neivai</i> , <i>Ny. whitmani</i> , <i>Mi. migonei</i> , <i>Psy. wellcomei</i> , <i>Psy. complexus</i>
<i>L.(V.) guyanensis</i>	Norte do Brasil, Guiana Francesa e Suriname	LC/LMC	<i>Ny. umbratilis</i>
<i>L.(V.) panamensis</i>	Norte da America do Sul e America Central	LC	<i>Ny. trapidoi</i> , <i>Ny. ylephiletor</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Psy. panamensis</i>
<i>L.(V.) peruviana</i>	Peru	LC	<i>Lu. peruensis</i> , <i>Lu. verrucarum</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Norte do Brasil, Bolívia, Peru	LC	<i>Tr. ubiqualis</i> , <i>Lu. nuneztovari anglesi</i> , <i>Tr. velascoi</i>
<i>L (V.) naiffi</i>	Norte do Brasil, Guiana Francesa	LC	<i>Psy. ayrozai</i> , <i>Psy. paraensis</i>
<i>L (V.) shawi</i>	Norte do Brasil	LC	<i>Ny. whitmani s.l</i>
<i>L (V.) colombiensis</i>	Colômbia e Panamá	LC	<i>Lu. hartmanni</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Psy. panamensis</i>
<i>L.(V.) lindenbergi</i>	Brasil (Pará)	LC	<i>Nyssomyia antunesi</i>

LC- Leishmaniose Cutanea / LMC- Leishmaniose Mucocutanea / Ny- *Nyssomyia* / Mi- *Migonemyia* / Psy- *Psychodopygus* / Lu – *Lutzomyia* / Tr – *Tricophoromyia*. (Fonte: Reginaldo Brazil)

## 1.7. A Leishmaniose no Brasil

### 1.7.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA no Brasil não é um fato recente. MARZOCHI et al. (1994), baseados em estudos epidemiológicos e na distribuição geográfica dos parasitas identificados como *L. (V.) braziliensis* em diferentes ecossistemas, envolvendo vetores e reservatórios diversos, sugerem a hipótese de que a origem e difusão da doença humana tenha se iniciado a partir da região ocidental amazônica (que hoje se constitui dos estados de Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima), principalmente ao sul do rio Marañón-Solimões-Amazonas. O processo de dispersão para outras áreas do Brasil é recente, ocorrido principalmente através do ciclo econômico da borracha, entre 1880 e 1912, que atraiu milhares de nordestinos, os quais, após o debacle da borracha

retornavam às terras de origem ou eram atraídos para o ciclo do café na região sudeste do Brasil. Outros ciclos posteriores, que também implicaram em mobilidades sociais, como a construção de rodovias (1960-70), a mineração do ouro (1970-80) e a exploração de madeiras (1980-90), teriam contribuído para a disseminação da LTA no país (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

A segunda teoria é de origem andina. Esta começa a formular-se a partir dos descobrimentos de peças de cerâmica pré-colombiana ou huacos peruanos em 1895 (VIRCHOW, 1895; NEIVA et al., 1917; RABELLO, 1925) e foi reforçada pelos documentos do século XVI (Figura 1.3). Estudos arqueológicos desenvolvidos em *huacos* peruanos - vasos de cerâmica com reprodução de figuras humanas sadias e mutiladas por diferentes moléstias, puderam assegurar a ocorrência da *uta* e *espundia* - denominações locais para as formas cutânea e mucosa da LT, respectivamente - entre os incas durante a era pré-colombiana, embora a princípio tenham sido confundidas com a sífilis. Entretanto, estudos das cerâmicas antropomórficas produzidas por nossos ancestrais indígenas, por seu caráter rudimentar, não permitiram a mesma constatação (VALE & FURTADO 2005).

ALTAMIRANO-ENCISO et al. (2003), tomando por base a proposta de MARZOCHI et al. (1994) sobre a origem amazônica da *L. (V) braziliensis*, responsável pelas formas cutânea simples (LC) e mucocutânea (LM), sugerem que a doença humana é muito antiga, dispersando-se primeiro para a selva alta e posteriormente às terras quentes interandinas, através dos limites da Bolívia e do Peru com o Brasil (Figura 1.4).



**Figura 1.3:** Mapa da origem andina da Leishmaniose Tegumentar proposta por RABELLO (1925).



**Figura 1.4:** Modelo da expansão amazônica da LTA pela *L. (V.) braziliensis* proposto por MARZOCHI et al. (1994) e ALTAMIRANO-ENCISO et al. (2003).

Entre 1880 e 1930, ocorriam no Brasil surtos de LTA associados ao ciclo econômico da borracha, às fazendas cafeeiras e ao crescimento das cidades brasileiras. Mas a medicina da época incluía essa nova doença nas manifestações clínicas da lepra, do lúpus, da sífilis ou da tuberculose, que também afetavam endemicamente o país. Nesse período, entre os agentes de saúde que lutaram denodadamente pela conscientização do povo quanto à LTA, destacam-se: Sommer, Breda, Austregésilo, Moreira, Pupo, Pirajá da Silva, Oswaldo Cruz, Carlos Chagas, Gaspar Vianna e Eduardo Rabello, entre outros (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

Em 1885, Alexandre Cerqueira, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebótomos como vetores. Entretanto, no Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, pela primeira vez, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania*, idênticas à *Leishmania tropica* (WRIGHT, 1903), agente etiológico de leishmaniose tegumentar do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo (PESSÔA, 1982). Em 1911, Gaspar de Oliveira Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o batizou de *Leishmania braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcer de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (VIANA, 1911; SILVEIRA et al., 1987).

Henrique Aragão (1922) pôde atribuir a uma espécie de flebótomo, a transmissão de Leishmaniose Tegumentar no Continente Americano. Fato ocorrido apenas um ano após ter sido sugerida a transmissão desta doença no Velho Mundo por flebotomíneos. Aragão assinalou a associação entre alta densidade de flebótomos e a presença da doença, na localidade de Aguas Ferreas, incriminando *Nyssomyia intermedia* como potencial vetor de *L.(V.) braziliensis* (ARAGÃO, 1922).

Ao analisar-se a evolução da LTA, observa-se uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 unidades federadas do Brasil e, em 2003, todos os estados registraram autoctonia. A partir da década de 90, o Ministério da Saúde notificou uma média anual de 32 mil novos casos de LTA. Analisando-se os dados pertinentes em 2003, verificou-se a seguinte situação: a Região Norte notificou aproximadamente 45% dos casos, predominando os estados do Pará, Amazonas e Rondônia; a Região Nordeste, 26% dos casos, principalmente na Bahia e Ceará; a Região Centro-Oeste, 15% dos casos, com maior frequência em Mato Grosso; a Região Sudeste, 11% dos casos, predominantemente em Minas Gerais; e a Região Sul, 3,0%, destacando-se o Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007).

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; mais recentemente, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* foram identificadas como novos agentes da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007). Recentemente, foi descrita para o subgênero *L. (Viannia)* a espécie *L. lindenbergi*, (SILVEIRA et al., 2002), que foi isolada de soldados brasileiros que praticavam manobras próximas a florestas primárias degradadas ao norte do Estado do Pará.

A *Leishmania (V.) guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas múltiplas. Ocorre apenas na calha norte da Amazônia, tendo sido recentemente descrita no Estado do Acre, em áreas de colonização recente e relacionadas ao habitat de animais silvestres, como a preguiça de dois dedos, o tamanduá, os marsupiais e os roedores, em florestas primárias e secundárias. Os flebotomíneos envolvidos na transmissão são *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei* e *Ny. whitmani*.

A *Leishmania (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, lesões anérgicas difusas em indivíduos com deficiência imunológica inata. A transmissão está associada, geralmente, à presença de roedores silvestres e marsupiais, sendo a infecção humana menos frequente porque o vetor *Bichromomyia flaviscutellata* é considerado pouco antropofílico. Entretanto, a infecção por *L. (L.)*

*amazonensis* ocorre em diferentes ambientes das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, provavelmente associada à ciclos enzoóticos de matas residuais.

A *Leishmania (V.) braziliensis* causa lesões cutâneas e mucosas metastáticas e se distribui amplamente no Brasil, tanto em áreas de colonização recente na Amazônia quanto em regiões mais antigas do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Sua transmissão está associada principalmente as espécies vetoras *Psychodopygus wellcomei*, e *Psychodopygus complexa* em florestas da Amazônia, onde os reservatórios silvestres são ainda desconhecidos.

Outras leishmanias descritas – como a *Leishmania (V.) lainsoni*, *L.(V.) lindenberg*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) shawi* – podem estar associadas a vetores e reservatórios silvestres e acometer o homem na região Amazônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007).

### **1.7.2. Leishmaniose Visceral**

A Leishmaniose Visceral foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada "ponos" ou "hapoplinakon". Foi na Índia em 1869 que recebeu o nome "kala-jwar" que quer dizer febre negra ou "kala-azar" que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI et al., 1981).

Em 1900, William Leishman identificou um protozoário no baço de um soldado que havia vindo a óbito na Índia, em decorrência de uma febre local conhecida como "febre "Dum Dum" ou "Kala-azar". Suas anotações não foram publicadas até 1903 quando Donovan encontrou o mesmo parasita em outro paciente. Ainda no mesmo ano, Laveran & Mesnil descreveram o protozoário com o nome de *Piroplasma donovani*. Leonard Rogers, em 1904, foi o primeiro a conseguir cultivar o parasita e observou que nas culturas ele era visto sob a forma flagelada. Patton, em 1907 observou as formas leishmanias (amastigotas) em monócitos e as formas leptomonas (promastigotas) no intestino de insetos que eram alimentados sobre pacientes com calazar (in FAUST et al., 1974).

O primeiro caso no Brasil foi descrito por Migone em 1913. O paciente era um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos /SP. e após viajar para Mato Grosso, adoeceu, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai (ALENCAR,1977).

Foi PENNA (1934), um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, quem iniciou os estudos sobre a distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral nas Américas, quando comprovou parasitologicamente, 41 casos dentre as 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil.

Em 1953 surgiram numerosos casos da doença, principalmente no Ceará, o que levou à criação da "Campanha contra a Leishmaniose Visceral". Foram DEANE e MANGABEIRA que em 1954 incriminaram *Lu. longipalpis* como responsável pela transmissão da *L. (L.) chagasi* e, a partir de 1957, propuseram o uso do DDT como combate ao inseto vetor, numa tentativa de romper o ciclo da doença.

Em agosto de 1977 foi diagnosticado o primeiro caso autóctone de Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro. Era um homem, de 55 anos, residente na localidade de Rio de Prata, no bairro de Bangu, subúrbio da cidade (SABROZA et al., 1978).

Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste representou uma redução para 77% dos casos do País (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2006).

O agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Lutzomyia longipalpis* atua como principal vetor (DEANE & DEANE, 1962; LAINSON & RANGEL, 2005) em grande parte do Brasil, com exceção de algumas áreas em Mato Grosso do Sul, onde *Lutzomyia cruzi* é o vetor incriminado (SANTOS et al., 1998; PITA- PEREIRA et al., 2008). Recentemente *Migonemyia migonei* tem sido sugerido como possível vetor de *L. infantum*, em La Banda, na Argentina (SALOMÓN et al 2010) e no Estado de Pernambuco, Brasil (CARVALHO et al., 2010).

### **1.8. A Leishmaniose no Município de Rio Branco (Acre).**

A expansão da LTA na região Amazônica parece estar relacionada a uma mudança de comportamento epidemiológico da doença, que antes limitada às zonas florestais, passou a ocorrer em zonas rurais desmatadas e peri-urbanas, facilitada pelo surgimento de áreas de garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e formação de novos núcleos urbanos em ambientes favoráveis à transmissão da doença (SILVA-NUNES et al., 2008).



O Estado do Acre está situado num planalto com altitude média de 200 m, localizado no sudoeste da Região Norte. Os limites do Estado são formados por fronteiras internacionais com Peru (Oeste) e Bolívia (Sul) e por divisas estaduais com os estados do Amazonas (Norte) e Rondônia (Leste). As cidades mais populosas são: Rio Branco, Cruzeiro do Sul, Feijó, Tarauacá e Sena Madureira.

O nome Acre surgiu de “Aquiri”, que significa “rio dos jacarés” na língua nativa dos índios Apurinãs, habitantes originais da região banhada pelo rio que empresta o nome ao Estado. Os exploradores da região transcreveram o nome do dialeto indígena, dando origem ao nome Acre. Os primeiros habitantes da região eram os índios, até 1877, quando imigrantes nordestinos arregimentados por seringalistas para trabalhar na extração do látex, devido aos altos preços da borracha no mercado internacional, iniciaram a abertura de seringais. Este território, antes pertencente à Bolívia e ao Peru, foi aos poucos sendo ocupado por brasileiros (IBGE, 2006).

O ser humano participa acidentalmente do ciclo silvestre de manutenção da doença, por meio de atividades que necessitem de sua entrada no ambiente de mata, ou mesmo devido à existência de moradias localizadas perigosamente próximas à borda da floresta ou até mesmo no interior da mesma, como no caso dos seringais.

No Estado do Acre, existem poucos estudos referentes à situação da leishmaniose tegumentar americana em seu território. Sabe-se que os casos de LTA têm aumentado nos últimos anos, sendo notificados 8.516 casos no período de 2001 a 2006 (soma referente às duas mesorregiões – Tabela 1.2). Deste total, 7.746 (91%) correspondem a casos novos, 650 (7,6%) equivalem às recidivas e 120 (1,4%) representam casos ignorados (SILVA & MUNIZ, 2009). Ressalta-se que até o momento não há registros de Leishmaniose Visceral Americana no estado.

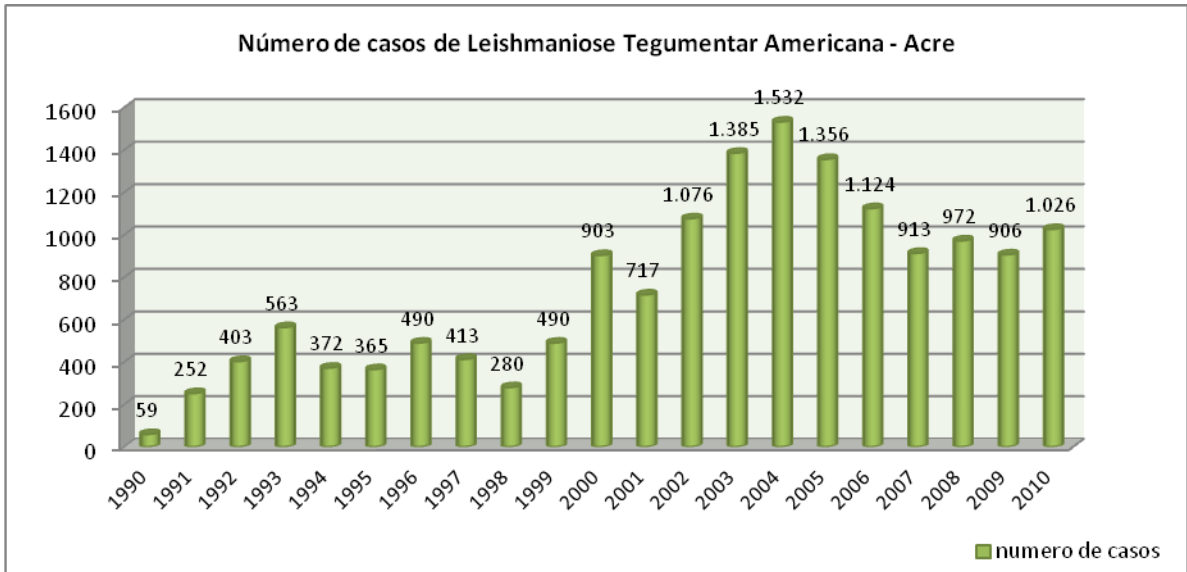
Em 2003, a incidência de LTA no Estado do Acre foi de 265 casos/100 mil habitantes, o maior coeficiente do país. Do total de casos notificados naquele ano, os municípios de Rio Branco, Sena Madureira e Brasiléia contribuíram com 52% dos registros do estado (SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MS, 2005).

**Tabela 1.2: Distribuição do número de casos e da prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana por 10 mil habitantes nos períodos de 1992 a 1997, e de 2001 a 2006, conforme micro e mesorregião do Estado do Acre, Brasil.**

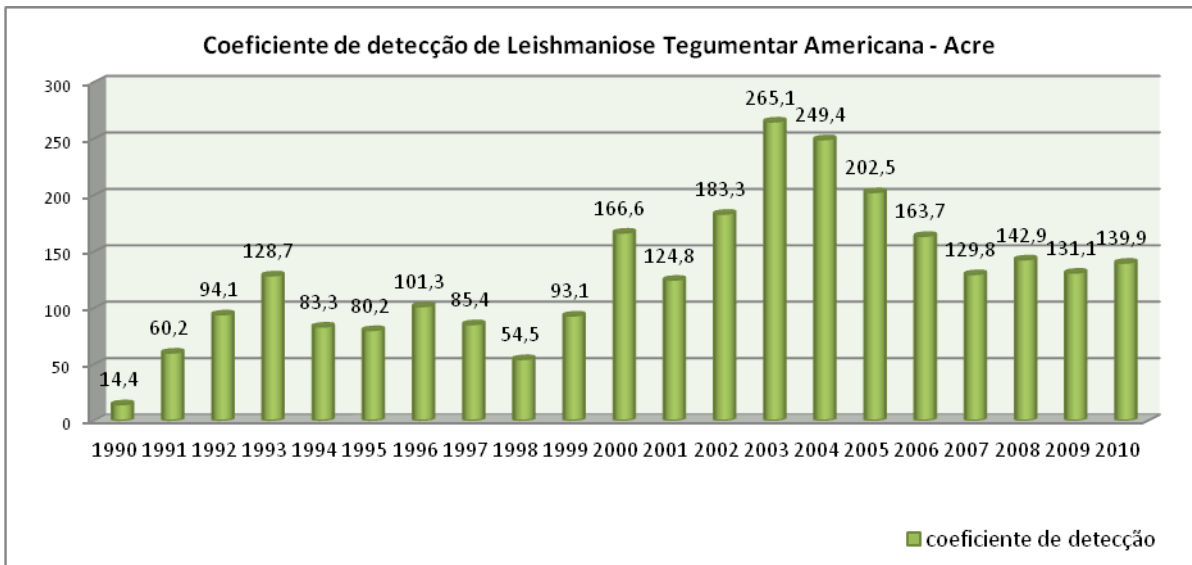
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2001-2006	1992-1997*
	N (P)	N (P)	N (P)	N (P)	N (P)	N (P)	N (P)	N
<b>Microrregião</b>								
Cruzeiro do Sul	142 (13,7)	102 (9,5)	113 (10,3)	109 (9,3)	113 (9,3)	63 (5,2)	147 (7,6)	25,8
Tarauacá	75 (12,7)	81 (12,9)	77 (12,3)	64 (9,0)	59 (8,0)	84 (11,6)	440 (61,0)	38
Sena Madureira	170 (48,2)	254 (64,4)	208 (57,8)	246 (59,5)	234 (59,5)	192 (44,3)	1.304 (311,4)	80,4
Rio Branco	277 (8,3)	585 (16,7)	740 (21,5)	882 (23,9)	795 (20,6)	558 (14,7)	3.837 (101,1)	40,6
Brasiléia	302 (67,3)	341 (71,6)	441 (96,9)	456 (93,0)	795 (20,6)	375 (72,5)	2.293 (443,3)	231,8
<b>Mesorregião</b>								
Vale do Acre	749 (18,4)	1.180 (27,1)	1.389 (32,9)	1.584 (34,5)	1.407 (29,8)	1.125 (23,8)	7.434 (158,2)	60,2
Vale do Juruá	217 (13,3)	183 (10,7)	190 (11,0)	173 (9,2)	172 (8,8)	147 (7,6)	1.082 (55,7)	30,3

*N: número de casos de LTA; P: prevalência.; \* Silva et al., 2008. (Fonte: SILVA & MUNIZ 2009)*

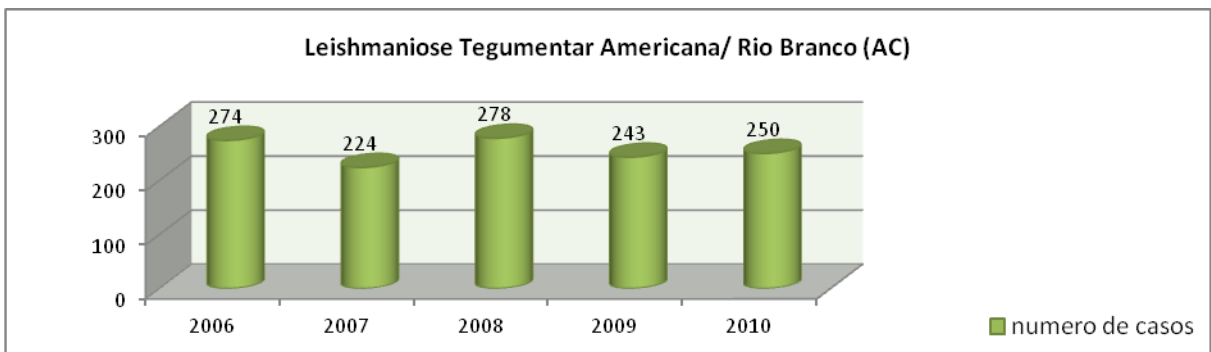
No ano de 2005, o coeficiente de detecção de LTA no Estado do Acre foi de 202,05 casos/100 mil habitantes. Do total de casos, 57,4% foram registrados nos municípios de Rio Branco, Xapuri, Sena Madureira e Brasiléia. Observou-se que 83% dos casos foram registrados em indivíduos com idades maiores que 10 anos, e 69% eram do sexo masculino. No que se refere à forma clínica, o Acre é o estado que apresenta maior proporção de forma mucosa no País, chegando a 21% em 2005. Aproximadamente 95% dos casos foram confirmados laboratorialmente e 88% apresentaram cura clínica. Do total de casos notificados, cerca de 5% foram importados de outros países, principalmente da Bolívia (SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MS, 2007). Entre os anos de 2009 e 2010 houve um registro de 120 novos casos no Estado (Gráfico 1.1) e conseqüentemente, houve um aumento no coeficiente de detecção de 8,8 casos/100.000 habitantes neste período (Gráfico 1.2). Somente no município de Rio Branco, houve um registro de 7 novos casos (Gráfico 1.3). A forma cutânea da doença prevalece (87%) sobre a forma mucosa (13%) (Gráfico 1.4), e o coeficiente geral de detecção de casos de LTA ,em 2010, no município foi de 81.7 casos/100.000 habitantes, sendo classificado como muito alto pelo Ministério da Saúde (SINAN/SVS/MS 2011), ensejando assim mais estudos para que estes índices possam vir a diminuir num futuro próximo.



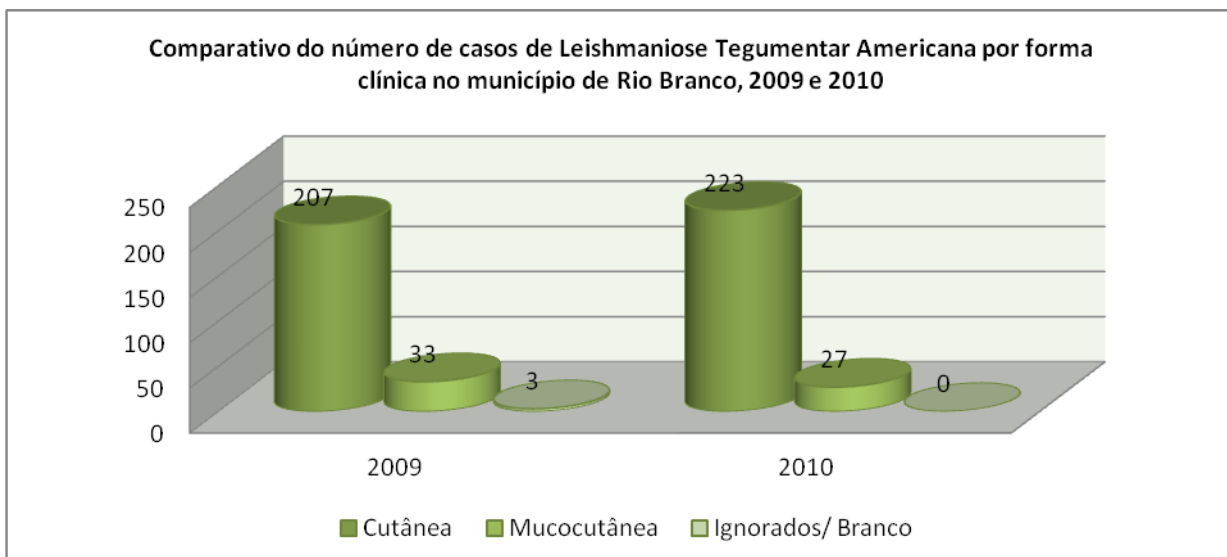
**Gráfico1.1** – Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana - Acre Fonte: Sinan/SVS/MS – atualizado em 23/08/11 - [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta\\_casos08\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf)



**Gráfico 1.2:** Coeficiente de detecção de Leishmaniose Tegumentar Americana - Acre Fonte: Sinan/SVS/MS - atualizado em 23/08/11 [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta\\_casos08\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf)



**Gráfico1.3:** Leishmaniose Tegumentar Americana/ Rio Branco (AC) Fonte: Sinan/SVS/MS- Atualizado em 23/08/11 [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta\\_casos08\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf)



**Gráfico 1.4** :Comparativo do número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por forma clínica no município de Rio Branco, 2009 e 2010. Fonte: Sinan/SVS/MS – atualizado em 23/08/11  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Ita\\_casos08\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Ita_casos08_09_11.pdf)

TOJAL et al. (2003) e (2006) identificaram e caracterizaram espécies distintas de *Leishmania* isoladas de lesões cutâneas de pacientes do município de Rio Branco: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni* e um híbrido de *Leishmania (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni*. Porém, estudos sobre a fauna de flebotomíneos no Estado do Acre ainda são limitados (MARTINS & SILVA 1964; ARIAS et al., 1984; SILVA-NUNES et al., 2008). Há poucos dados disponíveis sobre potenciais vetores de LTA no Acre e na região Amazônica como um todo (ARIAS & FREITAS 1982; 1977; AZEVEDO et. al., 1993). A presença de *Nyssomyia whitmani* já foi descrita na Amazônia, sendo comprovadamente transmissora de *L. (V.) shawi* no Pará (LAINSON & SHAW, 2005; RANGEL et al., 1996). Entretanto, seu papel na transmissão de *L. (V.) braziliensis* nessa parte do país ainda é discutido (SHAW et al., 1991), uma vez que esta espécie de flebotomíneo parece ser pouco antropofílica na Amazônia (DA COSTA et al., 2007). Uma espécie antropofílica associada à transmissão da LTA e encontrada no Amazonas e no Acre é a *Ny. umbratillis* descrita por WARD & FRAIHA, em 1977 (LAINSON et al., 1979; FEITOSA et al., 2004; READY et al., 1986; AZEVEDO et al., 1993).

Em um estudo realizado em 2008 nos municípios de Bujari, Xapuri e Rio Branco, no Estado do Acre, foi verificado a abundância de espécies no solo e na copa das árvores, onde das 52 espécies identificadas, *Nyssomyia antunesi*, *Nyssomyia whitmani*, *Psychodopygus davisi*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia umbratilis*,

*Bichromomyia flaviscutellata*, *Trichophoromyia ubiquitalis*, *Psychodopygus hirsuta hirsuta*, *Psychodopygus paraensis* e *Psychodopygus ayrozai* são conhecidas por serem vetores de *Leishmania*; sugerindo assim, três prováveis ciclos de transmissão na região estudada, *L. (V.) braziliensis* por *Ny. whitmani*, *L. (V.) lansonii* por *Ny. ubiquitalis* e também a existência do ciclo de transmissão de *Leishmania (V.) guyanensis* por *Ny. umbratilis* no sul do rio Amazonas, Acre (AZEVEDO et al., 2008).

A região Amazônica possui características particulares como a diversidade biológica de potenciais vetores e reservatórios, que podem favorecer a circulação simpátrica de várias espécies de *Leishmania* (GRIMALDI et al., 1989; LAINSON et al., 1994).

O contato do homem com o ambiente silvestre e, conseqüentemente com os ciclos de transmissão de diversos parasitas, ocorreu e vem ocorrendo em diversas situações. A expansão de fronteiras agrícolas, aquecimento global e popularização do eco-turismo são apenas alguns exemplos de fatores que têm levado o homem a um contato maior com esses ciclos de transmissão, permitindo a formação de um gradiente contínuo de transmissão entre animais silvestres, domésticos e o homem (DEEM et al., 2000; FAYER, 2000; MAYER, 2000). Esses parasitos, que passam então a ser transmitidos para humanos, animais domésticos e silvestres (zoonoses) resultam em impacto na saúde pública, na economia agropecuária e na conservação ambiental (SUTHERST et al., 2001; CLEVELAND et al., 2001; KRUSE et al., 2004), reforçando assim a crescente preocupação da comunidade no que concerne a emergência e/ou re-emergência de várias doenças parasitárias (SPEAR et al., 2000; DASZAK et al., 2000; 2001).

### **1.9. Diagnóstico da infecção de flebótomos por *Leishmania* spp.**

A taxa de flebótomos naturalmente infectados nas áreas endêmicas, assim como a identificação correta da espécie de *Leishmania* que infecta flebótomos, é de primordial importância para epidemiologia das leishmanioses. Para detecção da infecção dos flebótomos por *Leishmania*, o método mais utilizado sempre foi à dissecação do aparelho digestório do díptero, seguido do exame microscópico entre lâmina e lamínula. Neste caso, a positividade das amostras deve ser confirmada com o isolamento do parasito em meio de cultura e ou inoculação em animais de laboratório, uma vez que outros flagelados podem ser encontrados no trato digestivo destes insetos (RODRIGUEZ et al.,

1994; SILVA & GRUNEWALD, 1999). Um fator limitante para esta técnica é a dificuldade de processar grande número de espécimes capturados nas áreas de elevada transmissibilidade (ARANSAY et al., 2000; PEREZ et al., 2007), uma vez que o procedimento é laborioso e exige experiência e perícia técnica do profissional. A investigação de infecção natural por *Leishmania* através do uso do método convencional de dissecação de flebotomos fêmeas tem gerado taxas de infecção que variam de 0 a 9% (RYAN & BRAZIL 1984; ARIAS et al., 1985; GONÇALVES et al., 1985; SANTOS et al., 1998), mas em geral estes índices se situam abaixo de 1% para as distintas áreas endêmicas investigadas tanto no Brasil quanto em outros países da América do Sul (GALATI et al., 1996; LUZ et al., 2000; PEREZ et al., 1994)

Com a introdução de novas estratégias para identificação de infecção natural em flebotomos, estes índices vêm sofrendo considerável aumento. Métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido frequentemente utilizados em estudos para detecção de infecção natural e têm aumentado a sensibilidade e especificidade da identificação de *Leishmania* spp., independente do número, estágio e localização do parasito no vetor (PEREZ et al., 1994). Além de possibilitar maior rapidez na análise de uma grande amostragem (BARKER, 1989; MICHALSKY et al., 2002), a técnica permite trabalhar com insetos mantidos a seco, congelados ou conservados em etanol, sem interferir no desempenho da reação (PAIVA et al., 2007).

Ensaio diagnósticos utilizando a PCR têm sido desenvolvidos, baseados em diferentes alvos moleculares como: minicírculos do kDNA (PEREZ et al., 1994; EL TAI et al., 2000; MIRANDA et al., 2002; PITA-PEREIRA et al., 2005; 2008; 2009; 2011; SOUZA-ROCHA et al., 2010, CARVALHO et al., 2010; RASSI et al., 2012), genes da subunidade menor do ribossomo (EL TAI et al., 2000; RASSI et al., 2012), seqüências espaçadoras do gene de mini-exon (PAIVA et al., 2006), seqüências subteloméricas e seqüências nucleares de cópia única, como o gene de citocromo b e gene da DNA polimerase  $\alpha$  (SOUZA-ROCHA et al., 2010, BEZERRA-VASCONCELOS et al., 2011).

Entretanto é reconhecido que fatores adicionais influenciam na sensibilidade da PCR, como por exemplo, o método empregado para extração de DNA, o número de cópias do DNA alvo da amplificação, assim como a variabilidade genética do alvo selecionado. Existem evidências que diferenças na eficiência de métodos de extração influenciam significativamente na sensibilidade do ensaio molecular. Além disso, o processo de “otimização” de um protocolo baseado na PCR deve resultar em uma

combinação perfeita entre o DNA extraído (e conseqüentemente o método de extração) e as condições da PCR (BASTIEN et al., 2008).

A sensibilidade destes sistemas pode ser aumentada ainda mais quando são utilizadas como alvo de detecção do parasito, seqüências representadas em múltiplas cópias, tais como, DNA do cinetoplasto, genes de RNA ribossomal, genes de mini-exon ou outras seqüências repetidas do genoma de *Leishmania* spp. O emprego de regiões conservadas ou variáveis presentes nestes alvos permite adaptar a especificidade da PCR em nível de gênero, complexo, espécie ou até mesmo do isolado individual (PITA-PEREIRA 2010).

PITA-PEREIRA et al. (2005) descreveram um ensaio molecular por PCR direcionado para a detecção da região conservada do kDNA gênero *Leishmania*, seguido de hibridização não radioativa, para estimar índices de infecção em flebótomos capturados em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. A etapa de hibridização mostrou-se importante para o aumento da sensibilidade do ensaio de PCR, principalmente quando aplicado como ferramenta diagnóstica em insetos vetores, devido à complexidade do material biológico a ser analisado. Com esta abordagem foi verificado que a etapa de hibridização de produtos amplificados possibilitou um aumento de dez vezes na sensibilidade de detecção do método.

Os minicírculos de kDNA se tornam alvos ideais, pois possuem uma região de seqüência conservada (presente em todas as espécies de *Leishmania*) e uma região variável que permite discriminação acurada entre as diferentes espécies do parasito. Além disso, as moléculas de minicírculos estão representadas na rede de kDNA em torno de 10.000 cópias por célula de leishmania, sendo o alvo molecular que apresenta maior sensibilidade para o diagnóstico de infecção natural em flebotomíneos coletados em áreas endêmicas. Um estudo realizado por BEZERRA-VASCONCELOS et al., (2011) corrobora a sensibilidade ótima do alvo de kDNA, através da comparação com outros genes presentes em diferentes números de cópias para a detecção e quantificação de *L. infantum chagasi* em amostras de *Lu. longipalpis*, por PCR em tempo real. Foram empregados os alvos kDNA, polimerase  $\alpha$  (cópia única) e a subunidade ribossômica 18S, e os minicírculos do kDNA exibiram uma maior sensibilidade entre os genes testados.

A PCR tendo como alvo o kDNA, se torna uma importante ferramenta de detecção e tipagem das espécies de leishmanias detectadas, principalmente quando associada a outras metodologias, como RFLP (VOLPINI et al., 2004; TOJAL et al.,

2006; ROCHA et al., 2010; RASSI et al., 2012) e sequenciamento dos produtos amplificados (VERGEL et al., 2005; RASSI et al., 2012).

## **2.0. Justificativa**

Entre os fatores que dificultam o controle das leishmanioses está à diversidade das espécies de ambos: parasito e vetor. O conhecimento da densidade dos flebótomos e da incidência de infecção natural dos mesmos, aliado à correta identificação das espécies de *Leishmania*, contribuem para um maior entendimento da epidemiologia das leishmanioses. Além disso, considerando as peculiaridades das áreas com e sem transmissão de LTA e, ainda a diversidade das espécies de flebotomíneos vetores, acredita-se que a implementação de estudos ecológicos das espécies apontadas como vetoras comprovadas e/ ou suspeitas, trará informações úteis para subsidiar a elaboração de indicadores que venham contribuir para a avaliação de risco, e, deste modo, gerando medidas de prevenção e controle mais eficazes (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS 2007). No entanto, ainda são escassos estudos realizados na região Amazônica, o mais importante foco de transmissão de LTA do país com um coeficiente de detecção de 44,8/100.000 habitantes (SINAN/SVS/MS. 2011).

A explicação para o crescente número de casos de LTA no Estado do Acre poderia estar relacionada com a melhoria no sistema de notificação, as migrações de pessoas suscetíveis para zonas de maior transmissão da doença, a mudança do equilíbrio natural em razão do desmatamento e exploração de produtos florestais, como frutas, borracha e madeira.

Os ciclos de transmissão da doença são bastante heterogêneos, onde participam várias espécies de vetores e do parasito. Desta forma, existe a necessidade real de se caracterizar melhor os padrões epidemiológicos da LTA no Acre e na região Amazônica como um todo, bem como inferir taxas de infecção natural dos seus potenciais vetores e a correta identificação dos parasitos circulantes. Para isto, estudos prospectivos de campo com a utilização de dados epidemiológicos provenientes dos próprios serviços de saúde locais, poderão gerar informações importantes para a melhor compreensão da doença na região.



### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Estudar a fauna flebotomínica e estimar índices de infecção natural por *Leishmania* spp. nos insetos vetores capturados no Município de Rio Branco (Acre).

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar as espécies de flebotomíneos capturados no Município de Rio Branco, Estado do Acre;
- ✓ Avaliar taxas de infecção natural nas diferentes espécies de flebotomíneos aplicando ensaios de PCR multiplex (para detecção simultânea de kDNA de *Leishmania* e do gene *cacophony* de flebotomíneos);
- ✓ Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* detectada(s) através de ensaios moleculares complementares (PCR-RFLP e sequenciamento);
- ✓ Correlacionar às espécies de flebotomíneos positivas para infecção natural com as espécies de *Leishmania* spp. detectadas para a maior compreensão do papel destas espécies na transmissão da LTA no Município de Rio Branco.

## 4.0. Materiais e Métodos

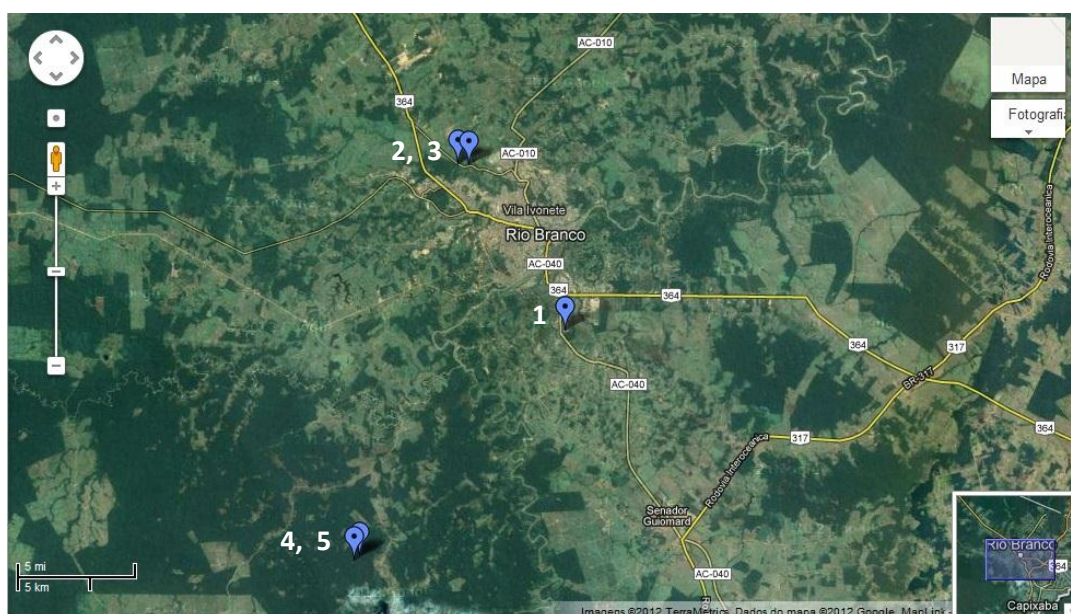
### 4.1. Área de Estudo

O estudo foi realizado no Município de Rio Branco, em área de transmissão vigente de Leishmaniose Tegumentar Americana, previamente estabelecida de acordo com os casos humanos autóctones registrados nos últimos anos pela Secretaria de Vigilância e Saúde do Estado.

Rio Branco é a capital do Estado do Acre, possuindo uma área de 9.222,58 Km<sup>2</sup>, população estimada de 348 354 habitantes em 2010 (IBGE, 2012). Localiza-se as margens do rio Acre.

As áreas selecionadas correspondem aos bairros Vila Acre, Bosque e a estrada Transacreana (Assentamento Moreno Maia) (Figura 4.5).

Foram realizadas 3 capturas semestrais no período de um ano.



**Figura 4.5:** Foto de satélite da área de estudo, Ponto 1 Vila Acre; Ponto 2,3 Bosque; Ponto 4,5 Estrada Transacreana (Imagem: <https://maps.google.com.br/>)

**Vila Acre - Parque Ambiental Chico Mendes** (Ponto 1: S 10° 02' 135'' W 67° 47' 716'')

O Parque Ambiental Chico Mendes é uma Unidade de Conservação municipal, medindo 57 hectares de florestas primárias e secundárias que estão em diferentes

estágios de regeneração. É um dos últimos resquícios de floresta nativa na zona urbana de Rio Branco e abriga importantes representantes da fauna e flora endêmicas.

Localizado na rodovia AC-40, a 10 km do centro da cidade, o Parque foi criado em 1996 em homenagem ao seringueiro Chico Mendes (Figura 4.6, 4.7 e 4.8). Antes de sua criação, a área do Parque sofreu intensa ação antrópica, principalmente extração de madeira e caça.

Neste ponto foi possível de realizar apenas uma noite de captura durante todo o período.

Duas armadilhas luminosas foram dispostas, uma na mata próxima ao ressoito dos porcos do mato, e outra na mata afastada da presença de pessoas e ressoito de animais do parque.



**Figura 4.6:** Foto de satélite do Parque Ambiental Chico Mendes - Vila Acre (Imagem: <https://maps.google.com.br/>)



**Figura 4.7:** Foto do Centro de visitantes do Parque Ambiental Chico Mendes - Vila Acre



**Figura 4.8:** Foto da entrada do Parque Ambiental Chico Mendes – Vila Acre

**Bosque** – Foram estabelecidos dois pontos de captura na Rua Custodio Freire, em áreas urbanas do município de Rio Branco (Figura 4.9).

Ponto 2 (S 09° 55' 802'' W 67° 51' 763'')

Ponto 3 (S 9° 55' 820'' W 67° 51' 340'')

Neste ponto foi possível de ser realizada capturas em todas as noites durante os períodos, pois era o local de mais fácil acesso.

Armadilhas luminosas foram dispostas no peridomicílio de duas residências, onde foram colocadas armadilhas luminosas nos galinheiros e nas matas. No ponto 2 também foi realizada uma noite de captura com capturador de Castro em barraca de Shannon.



**Figura 4.9** - fotos de satélite dos pontos de Coleta na Rua Custorio Freire  
(Imagem:<https://maps.google.com.br/>)

**Estrada Transacreana** – Foram estabelecidos dois pontos de captura no Projeto de assentamento Moreno Maia, em área rural do município de Rio Branco (Figura 4.10 e 4.11).

Ponto 4 (S 10° 10' 357'' W 67° 55' 505'')

Ponto 5 (S 10° 10' 514'' W 67° 55' 706'')



**Figura 4.10:** Residência de Ponto de coleta 4 Estrada Transacreana – Projeto de Assentamento Moreno Maia



**Figura 4.11:** Residência de Ponto de coleta 5 Estrada Transacreana – Projeto de Assentamento Moreno Maia

## 4.2. Estudo da fauna de flebotomíneos

### 4.2.1. Métodos de captura

#### 4.2.1.1. Capturas sistematizadas

A captura sistematizada dos flebotomíneos foi realizada durante o período de um ano (Abril de 2011 à Abril de 2012), com capturas semestrais, destinadas ao estudo taxonômico da fauna, bem como à observação de infecção natural das fêmeas.

Para a realização das capturas semestrais foram utilizadas cinco armadilhas luminosas do tipo HP (CDC modificada) (Figura 4.12). A armadilha HP consta de um tubo de PVC, que apresenta na sua parte superior uma pequena abertura circular, onde está inserida uma lâmpada de led, e na abertura inferior, encontra-se um motor, cujas hélices criam um fluxo de ar sugando os insetos atraídos pela luz para o interior da gaiola e impedindo que os mesmos retornem para o exterior, ficando retidos em uma gaiola rede de fina espessura que recobre toda a abertura inferior. As armadilhas são alimentadas por quatro pilhas de 1,5 volts, responsável pela iluminação e pelo giro do motor (PUGEDO et al., 2005).



**Figura 3.12:** Armadilha luminosa HP

Os pontos de captura foram selecionados de forma aleatória, abrangendo ao máximo a área selecionada para a realização do estudo. As armadilhas foram expostas no peridomicílio, em locais previamente estabelecidos, sendo estes locais propícios à presença dos flebotomíneos, tais como galinheiros, e locais com vegetação mais intensa. Cabe ressaltar que as armadilhas foram expostas tentando diminuir ao máximo, a

interferência de outras fontes de luz presentes, minimizando a possível competição com a isca luminosa da armadilha.

A exposição das armadilhas teve duração de 12 horas ininterruptas, sendo ligadas aproximadamente às 18 horas e retiradas às 6 horas do dia seguinte.

#### 4.2.1.2 . Capturas não sistematizadas

As capturas não sistematizadas tiveram como objetivo principal aumentar o número de exemplares e a captura de uma maior diversidade de espécies de flebotomíneos que constituem a fauna local.

Para isso, foi utilizada a captura com a armadilha de Shannon, que consiste de uma armação central em forma retangular, com duas superfícies externas igualmente de pano. No campo, a armadilha deve permanecer suspensa e fixada por meio de corda em quatro pontos amarrados em árvores ou a estacas. Em seu interior podem ser colocados outros atrativos, como fonte de luz, ou em alguns casos, animais. Neste caso, considera-se que o homem também pode funcionar como atrativo, objetivando avaliar a antropofilia. Os insetos atraídos são capturados nas paredes da armadilha, através do capturador de Castro (ou tubo aspirador) (Figura 4.13).



**Figura 4.13:** Captura com a Armadilha de Shannon

Em ambos os tipos de captura foram empregadas fichas de campo para anotações referentes às capturas, como o tipo de captura, as temperaturas, umidade relativa do ar, ventos e chuvas. Os flebotomos capturados foram mantidos a - 4° dentro das gaiolas de coleta para a eutanásia e para posterior triagem e separados de acordo com a localidade e o ambiente (peridomicílio ou áreas de mata), e colocados em tubos eppendorf e

mantidos congelados até o momento da montagem em lâmina para identificação taxonômica, no laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz-RJ. Os insetos fêmeas foram dissecados para a análise molecular de diagnóstico, no laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (IOC), incluindo alguns machos como controles.

#### **4.2 .2. Preparação e montagem dos flebotomíneos**

Os flebotomíneos machos e as fêmeas ingurgitadas foram preparados e montados entre lâmina e lamínula, com objetivo de se identificar a diversidade das espécies existentes no município, seguindo as etapas descritas a seguir.

Após a triagem dos insetos, os flebotomíneos foram transferidos para uma placa de Petri contendo Eugenol (óleo de cravo), por 24 horas, para o amolecimento da quitina. Posteriormente, foram transferidos para outra placa contendo hidróxido de potássio (KOH) a 10%, por 12 horas, para clarificação. Em seguida, foram novamente transferidos para placa contendo ácido acético a 10%, por 15 a 20 minutos, a fim de neutralizar o processo de clarificação. Após estas etapas, foi realizada a desidratação seriada: álcool 70% - 10 minutos, álcool 90% - 10 minutos, álcool 95% - 10 minutos e álcool 100% - 10 minutos. Em seguida foram transferidos para o Eugenol por mais 24 horas, para a diafanização das estruturas com valores taxonômicos. Após finalização do processo, cada inseto foi colocado na lâmina sobre uma gota de bálsamo do Canadá, com o auxílio de dois estiletes de pontas finas, separando-se a cabeça do tórax nos exemplares machos. Para as fêmeas separou-se a cabeça do tórax, e o abdômem. Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre cada exemplar; para retirar as bolhas entre a lâmina e lamínula utilizou-se uma placa quente para aquecer a lamína e lamínula espalhando melhor o balsamo. O material foi levado à estufa para secagem à 37°C e após 72 horas (podendo ser uma semana), colocou-se esmalte incolor em volta da lamínula para sua impermeabilização (FORATINI, 1973).

#### **4.2 .3. Identificação Taxonômica dos flebotomíneos.**

Todos os insetos provenientes das capturas realizadas foram identificados até ao nível de gênero e/ ou espécie, através de microscopia óptica, seguindo a classificação de GALATI (2003).

As fêmeas e os machos destinadas à avaliação de infecção natural foram dissecadas sobre uma gota de solução de EDTA (10 mM) em lâmina de microscopia. Com o auxílio de agulhas descartáveis, foram cortadas o penúltimo segmento abdominal, e deste conjunto foi examinada as genitálias feminina e masculina, ou seja, as espermatecas e seus anexos. Também foi utilizada como caractere taxonômico, a visualização do cibário das fêmeas, mantendo no momento da dissecação, a parte ventral da cabeça voltada para cima, para identificação taxonômica no nível de espécie. O restante do corpo do inseto foi introduzido em tubo *ependorf* e rotulado de acordo com a área de captura, espécie e sexo. Deve-se ressaltar que para cada fêmea dissecada foi utilizado apenas duas agulhas descartáveis, evitando assim a contaminação do material a ser utilizado nas provas de PCR. Os tubos contendo o material para ser processado nas análises moleculares foram mantidos à temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  até posterior uso.

### **4.3. Diagnóstico Molecular**

#### **4.3.1. Obtenção do Extrato total dos flebotomíneos**

O DNA utilizado na PCR foi obtido a partir de um extrato de amostras individuais de flebotomíneos machos (como controle negativo) e fêmeas, em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de lise: 10 mM Tris-HCl pH 9,2 contendo 10 mM de EDTA e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteinase K (USBiological). Os lisados foram mantidas em tubos *ependorf* e incubados (2 a 3 horas,  $56^{\circ}\text{C}$ ) com agitações periódicas. No final da incubação, o material foi centrifugado (9.800g, 15 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante coletado e aquecido (15 minutos,  $95^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, as amostras foram mais uma vez centrifugadas (9.800g, 40 segundos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) (MIRANDA et al., 2002). Os volumes das preparações foram ajustados para 200  $\mu\text{L}$  com TE 0,1X e estocadas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o momento da extração do DNA total.

#### **4.3.2. Extração de DNA**

A extração de DNA a partir dos lisados de flebotomíneos foi realizada utilizando o kit comercial *Wizard SV Genomic DNA Purification System* (PROMEGA), segundo as especificações do fabricante, e o DNA eluído em 50  $\mu\text{L}$  TE 0,1X foi posteriormente estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Todas as etapas para a extração de DNA foram monitoradas pela inclusão de amostras controle negativo (insetos machos

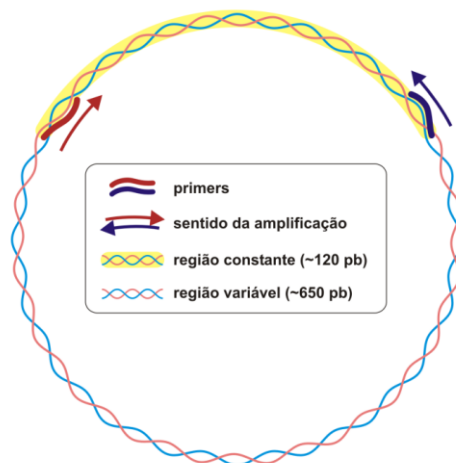


capturados no campo). A inclusão de machos determina um controle para possíveis contaminações, pois essas amostras não podem conter DNA de *Leishmania* spp. Os fluxos laminares próprios para extração de DNA, assim como todo o material utilizado nesta etapa foram devidamente descontaminados com a utilização de cloro e exposição a raios UV.

#### 4.3 .3. Reação em Cadeia da Polimerase – *Hot-start PCR multiplex*.

Para a PCR foram utilizados dois pares de iniciadores que amplificam simultaneamente na mesma reação, um produto de 120 pb referente ao DNA de *Leishmania* (no caso de amostras de fêmeas positivas) e outro de 220 pb correspondente ao DNA de flebotomíneo gênero *Lutzomyia* (no caso de todas as amostras de machos e fêmeas). O primeiro par amplifica a região constante do minicírculo do kDNA; primer A [5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3'] e primer B [5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3'] (figura 3.14) (PASSOS et al., 1996); o segundo par amplifica um gene constitutivo específico de flebotomos (*cacophony*): 5Llcac [5'GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3'] e 3Llcac [5'CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3'] (LINS et al., 2002). A inclusão deste segundo par de iniciadores (gene *cacophony*) confere a confiabilidade do material extraído, evitando possíveis resultados falso negativos, pois todas as amostras (machos e fêmeas) constituídas por flebotomíneos deveriam amplificar o produto referente a esse alvo.

As reações ocorreram em um volume final de 100 µL, consistindo de solução tampão da PCR 1X (100mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM de KCl - solução PCR 10X, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada dNTP (Invitrogen), 0,2 µM de cada primer, 1,25 U Taq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems), 10 µL de DNA e H<sub>2</sub>O (ultra pura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e foi realizada no aparelho modelo DNA Thermal Cycler 9600, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 seg, 94 °C), anelamento (30 seg, 55 °C) e extensão (30 seg, 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (12 min, 94 °C) para ativação da enzima (*Hot Start*) e após os 36 ciclos foi incluído um passo de extensão final (10 min, 72 °C).



**Figura 4.14:** Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de *Leishmania* sp. (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação.

#### 4.3 .4. Visualização dos produtos da PCR.

Para a detecção dos produtos amplificados (*amplicons*) foram usados dois sistemas de análise em fase sólida: 1) migração eletroforética em gel de agarose, tendo como marcadores de peso molecular, fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos em pares de bases, dentro da faixa compatível de tamanho dos fragmentos de DNA amplificados; 2) adsorção em membrana de náilon para a etapa de hibridização e posterior revelação por reação enzimática, identificada pela precipitação do produto da catálise.

##### 4.3 .4.1. Eletroforese em gel de agarose.

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal, em géis de agarose (Seakem e NuSieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) a 2,0%, com dimensões de 12,5 x 20 cm, preparados em TBE 1X (0,89 M Tris-HCl; 0,89 M ácido bórico; 0,024M EDTA, pH 8,3 - TBE 10X). Após a imersão do gel solidificado em tampão TBE, alíquotas contendo 10 µL do produto da PCR foram misturadas a 1 µL do tampão de aplicação de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida por 2 horas à 70 V. O peso molecular dos *amplicons* foi determinado pela inclusão nos géis do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA *Ladder* – Invitrogen Life Technologies). Após a eletroforese, o gel foi corado (15 minutos) em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL de brometo de etídio em TBE 1X) e descorado (15 minutos) em água destilada. Após

esta etapa os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

#### 4.3 .4.2. Dot- Blot

O produto amplificado na PCR também foi analisado por hibridização em fase sólida. Inicialmente, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação, que consistiu em um aquecimento (100 °C, 3 minutos) de 10 µL dos *amplicons* diluídos em 90 µL de água destilada, seguido de rápido resfriamento em gelo (4 °C) e a adição de 13 µL de solução desnaturante (4N NaOH contendo 25mM EDTA pH 8.0). O material desnaturado foi adsorvido por vácuo moderado à membrana de náilon (Boehringer Mannheim, Germany), previamente umedecida em água destilada e acondicionada em aparelho Bio-Dot™ (BioRad, Hercules, CA, EUA). Após a adsorção dos *amplicons*, as áreas de aplicação da membrana foram tratadas com 100 µL/poço de água destilada, seguida de 100µL/poço de solução desnaturante. A membrana foi removida do Bio-Dot™, lavada 5 vezes por 5 minutos cada lavagem em solução salina contendo citrato de sódio - SSC 2X (300 mM NaCl, 30 mM C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> - SSC 20X) e seca à temperatura ambiente. Finalmente, o DNA foi covalentemente fixado à membrana por irradiação com luz UV em aparelho Stratalinker™, durante dois minutos.

Para a reação de hibridização, as membranas contendo o DNA foram pré-tratadas (3 horas, 60 °C) em solução BLOTTO - *Bovine lacto transfer technique optimizer* (SSC 1,5X, 1% SDS, 0,5% de leite desnatado Mollico<sup>R</sup>), em forno de hibridização (Techne Inc, Princeton N.J./USA). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução BLOTTO (16 horas, 56°C) contendo 25 pmol/µL da sonda específica para o subgênero *Viannia*: 5`TAA TTG TGC ACG GGG AGG CCA 3` (FERNANDES et al., 1996), ou com sonda específica para *Leishmania infantum*: 5` AAA AAT GGG TGC AGA AAT (FRANCINO et al., 2006), marcadas com biotina na extremidade 5´. Após o período de hibridização, as membranas foram lavadas (5 vezes/5 minutos cada) com tampão de lavagem (tampão salina ou PBS contendo 0,05% de Tween-20) à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas (1 hora, 25 °C) com o conjugado Streptavidina-Peroxidase (Sigma) diluído (1/1000) em tampão de lavagem. Após um novo ciclo de lavagem das membranas, a reação de hibridização foi revelada com kit de quimiluminescência (Santa Cruz, USA) seguindo as especificações do fabricante.

## **4.3 .5. Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição - RFLP**

### **4.3.5 .1. Cultivo de diferentes espécies de *Leishmania*.**

Com o objetivo de implementar a metodologia de PCR-RFLP no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (IOC), foi necessária a obtenção de massa de células de diferentes espécies de *Leishmania* e posterior recuperação do DNA genômico, para uso nos ensaios de PCR-RFLP como amostras padrão com perfis de restrição conhecidos, segundo VOLPINI et al. (2004).

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408) foram gentilmente cedidas pela Coleção de Leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (CLIOC). Todas estas cepas foram mantidas, na forma de inóculo, em meio semi-sólido Novy, Mc Neal e Nicolle (NNN) a 28 °C. Para ampliação da massa de parasitos, as células foram transferidas para meio líquido *Liver Infusion-Tryptose* (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas à 28 °C. As culturas foram ampliadas por sucessivas passagens a cada quatro dias, até alcançarem a concentração de parasitos necessária, em torno de 10<sup>8</sup> parasitos/mL. A metodologia de extração de DNA genômico foi realizada através de lise das células e extração de DNA com fenol-clorofórmio.

#### **4.3.5. 1.1. Lise das células de Cultura.**

O DNA utilizado na PCR foi obtido a partir de um extrato de 500 µL do precipitado de cultura das diferentes cepas utilizadas adicionado à 500 µL de tampão de lise: 10 mM Tris-HCl pH 9,2 contendo 10 mM de EDTA e 100 µg/mL de proteinase K (USBiological). Os lisados foram mantidos em tubos *ependorf* e incubados (2 a 3 horas, 56 °C) com agitações periódicas. No final da incubação, o material foi aquecido (15 minutos, 95 °C) para inativação da enzima e separado em duplicatas de 500 µL para cada amostra das diferentes cepas. Posteriormente foi realizado a extração de DNA fenol-clorofórmio.

#### **4.3.5. 1.2. Extração de DNA por fenol-clorofórmio.**

Um volume correspondente à 500 µL do DNA extraído por solução de lise foi acrescido de 200 µL de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v; Introgen Corporation, CARLSBAD, CA), e centrifugado (13.000 g, 8 minutos, 25 °C). O sobrenadante obtido (S1) foi coletado e reservado, e o precipitado foi lavado com 200 µL de água ultra-pura, por centrifugação (13.000 g, 8 minutos; 25 °C) para obter o segundo sobrenadante (S2). Os dois sobrenadantes foram reunidos para serem tratados (v/v) com clorofórmio (Merck S.A. Indústrias Químicas) e centrifugados (13.000 g, 8 minutos, 25 °C). O novo sobrenadante (S3) foi recuperado e o DNA precipitado pela adição de 0,3 M de acetado de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na.3H<sub>2</sub>O; Sigma Chemical Co., St Louis Missouri, USA) e dois volumes de etanol absoluto (Merck S.A.), com incubação em banho de gelo (15 minutos, 4 °C) e posterior centrifugação (13.000 g, 15 minutos, 25 °C). O precipitado final foi seco (5 minutos, entre 75 e 80 °C), o DNA solubilizado em 50 µL TE 0,1X e estocado (-20 °C) até o momento do uso.

#### **4.3 .5.2. PCR-RFLP e visualização dos fragmentos de restrição.**

Os ensaios de PCR-RFLP foram empregados com intuito de identificar a espécie de *Leishmania* presente nos vetores flebotomíneos que deram resultados positivos para infecção no diagnóstico por PCR multiplex seguido de hibridização. Para tal, as amostras de DNA de cada inseto confirmadamente positivo para infecção por *Leishmania* sp., foram re-amplificadas por PCR a partir do DNA extraído utilizando-se apenas os iniciadores para gênero *Leishmania*, sem ser em multiplex. Após a re-amplificação, seguindo as mesmas condições de ciclagem térmica descritas no item 3.3-3, 5 µL do produto amplificado foram utilizados para digestão com as enzimas *HaeIII* (Promega®), *AvaI* (Promega®), *MspI* (Promega®), *Sau3AI* (Promega®) por 3h à 37 °C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10 % a 100 V no aparelho Mini- Protean II (BioRad, Hercules, CA) e o gel foi submetido à coloração com Nitrato de Prata (VOLPINI et al., 2004).

#### **4.4. Clonagem**

Da mesma forma como descrito acima, amostras de DNA de cada inseto confirmadamente positivo para infecção por *Leishmania* sp., foram re-amplificadas por

PCR a partir do DNA extraído utilizando-se apenas os iniciadores para gênero *Leishmania* para posterior clonagem e sequenciamento do produto amplificado contendo a região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania*.

#### **4.4 .1 Preparo de células competentes**

A metodologia foi iniciada com uma semeadura da cultura de *Escherichia coli* linhagem TOP10 em placa contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido sem antibiótico, com crescimento *overnight* a 37° C. Uma colônia foi retirada e transferida para um frasco Erlenmeyer de 200 mL contendo LB líquido sem antibiótico, com forte agitação a 37 ° C. Depois de 1h foi iniciada a leitura da D.O. (Densidade Ótica) a 550 nm e posteriormente, em intervalos de 20 – 30 minutos até atingir o valor de D.O. = 0.5 (fase log). A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos em tubos cônicos de 50 mL estéreis. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão cuidadosamente em 25 mL de CaCl<sub>2</sub> a 100 mM, em gelo. Uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente ressuspensão em 25 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril a 100 mM. Após centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi gentilmente ressuspensão em 2 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril a 100 mM acrescido de 10 % de glicerol. Foram feitas alíquotas de 100 µL das células em tubos eppendorf® de 1,5 mL mantendo-as no gelo. Em seguida, as células foram submetidas ao choque térmico com nitrogênio líquido ou gelo seco em álcool por 1 minuto e rapidamente estocadas em freezer - 70 °C até o momento de uso.

Com a finalidade de testar a competência dessas células, incubou-se uma alíquota da colônia bacteriana em 5 mL de meio de cultura LB acrescido do antibiótico seletivo para células contendo o plasmídeo PUC19 (ampicilina 100 µg/ mL), e posteriormente foi realizada uma reação de transformação com plasmídeos controle (PUC19).

#### **4.4. 2 Clonagem**

Para os experimentos de clonagem foi utilizado o vetor pGEM T-Easy Vector kit Promega®, segundo as recomendações do fabricante.

Para a reação de ligação foram utilizados 5 µL do tampão de ligação rápida T4 ligase 2X; 1 µL do vetor de clonagem pGEM Easy Vector (50 ng); 3 µL de produto de PCR; 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (3 U/µL); e água *nuclease-free* para um volume final de 10 µL. A reação foi gentilmente homogeneizada e incubada *overnight* (durante uma noite) a 4° C.

Após a etapa de ligação do produto amplificado de *Leishmania* sp. no vetor pGEM, foram adicionados 2 µL do produto de ligação em um tubo *eppendorf*® de 1,5 mL contendo previamente as células competentes de *E. coli* linhagem TOP10 e homogeneizados levemente. As células foram incubadas em gelo por 15 minutos e, em seguida, foi realizado o choque térmico a 42° C por 1 minuto. Posteriormente, foi acrescentado 1 mL de LB sem antibiótico ao mesmo tubo *eppendorf*®, e as células foram incubadas à 37° C por 50 minutos concluindo, dessa forma, a etapa de transformação.

Placas de LB sólido contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/ mL foram subsequentemente utilizadas, tendo sido adicionados 40 µL de X-Gal em cada placa a fim de selecionar as bactérias que continham o plasmídeo com a região de resistência a ampicilina. O X-Gal indica se a bactéria expressa a enzima β-galactosidase, codificada pelo gene *LacZ* (colônia azul); bactérias contendo o plasmídeo recombinante formam colônias brancas (devido ao gene *LacZ* com a enzima beta-galactosidase inativada pela inclusão do inserto no quadro aberto de leitura).

Após selecionarmos as colônias brancas com auxílio de um palito previamente autoclavado, cada palito carregando uma colônia bacteriana foi introduzido em um tubo *eppendorf*® e a colônia foi diluída em 10 µL de água estéril autoclavada para a etapa subsequente de PCR de colônia.

#### **4.4. -3 PCR de Colônia**

A PCR de Colônia foi utilizada com a finalidade de ampliar a quantidade de inserto das colônias obtidas. Para isso foi empregado os iniciadores que flangeiam o inserto M13 *forward* (GTTGTAAAACGACGGCCAGT) e M13 *reverse* (CAGGAAACAGCTATGACC). As reações ocorreram em um volume final de 50 µL nas seguintes condições: tampão PCR 1X [100mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM Invitrogen), iniciadores (0,2 µM), Taq Gold (Applied Biosystems; 0,05 U/µL) e 10 µL do contendo o inserto. A ciclagem

térmica foi realizada no aparelho modelo DNA Thermal Cyclor 9600, com a seguinte programação, por ciclo (40 ciclos): desnaturaçãõ (1 min 95 °C), anelamento (1,5 min 55 °C) e extensãõ (1 min 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (5 min, 95 °C) para ativaçãõ da enzima (*Hot Start*) e após os 40 ciclos foi realizada a extensãõ final (5 min, 72 °C). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose, como descrito no ítem 3.3 - 4.1, e purificados utilizando o kit comercial *Wizard® SV gel PCR clean- Up system*, seguindo as especificações do fabricante.

#### **4.4. -4 Sequenciamento**

As reações de sequenciamento foram processadas com o *kit Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) segundo as especificações do fabricante, e os dados gerados foram armazenados no *software* de análise de seqüências de DNA (Plataforma de Sequenciamento PDTIS/IOC/Fiocruz).

#### **4.4.-5 Análise das Sequências**

##### **4.4-5.1 Avaliação da qualidade das seqüências geradas.**

Os eletroferogramas gerados no sequenciamento dos clones de DNA foram inicialmente analisados pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avaliou a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada, conferindo um valor de qualidade a cada uma. Para esta análise foram estabelecidos os parâmetros de aceitaçãõ das seqüências baseados na probabilidade de 0,02% de erro estimado para uma determinada base.

##### **4.4-5.2 Agrupamento das seqüências**

As regiões com boa qualidade de seqüências foram submetidas à montagem utilizando o programa CAP3(HUANG & MADAN, 1999).

##### **4-4-5.3 Retirando a seqüência do vetor**

A retirada da regiãõ da seqüência referente ao vetor foi realizada utilizando o programa Vector Screen do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html> /)



#### **4-4-5.4 Busca no Banco de Dados**

Após os procedimentos acima foi realizada uma busca na base de dados do Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando o algoritimo Blast N, Base de dados NT e um filtro para o organismo: Gênero *Leishmania*; a busca foi realizada na data 05 de Dezembro de 2012. Foram retiradas da análise as sequências com "e value" maior que  $1e^{-20}$ . As sequências referência mais próximas a cada clone foram utilizadas na construção do alinhamento.

#### **4-4- 5.5 Alinhamento das sequências**

O alinhamento múltiplo das sequências geradas nesse estudo com as sequências de referência obtidas com o Blast, foi processado com o programa MUSCLE (EDGAR, 2004).

#### **4-4-5.6 Construção da árvore filogenética**

A partir do alinhamento múltiplo, o método de máxima verossimilhança ("Maximum likelihood") foi empregado utilizando 1000 replicatas de 'bootstrap', seguindo o modelo de substituição GTR ("General Time Reversible") com o programa MEGA versão 5.10 (TAMURA et al., 2011). Os valores de 'bootstrap' menores do que 50 foram omitidos na árvore filogenética.

## 5.0. Resultados

### 5.1. Estudo da fauna flebotomínica do município de Rio Branco (Acre)

Após 12 meses de captura foi coletado um total de 455 espécimes de flebotomíneos, sendo 256 fêmeas e 199 machos. A primeira coleta foi toda destinada para identificação de fauna do município de Rio Branco (AC). Nas coletas posteriores, os machos, assim como as fêmeas ingurgitadas foram montados entre lâmina e lamínula para identificação taxonômica, e as fêmeas não ingurgitadas foram dissecadas e destinadas à análise molecular. Dentre os exemplares capturados nas duas últimas coletas, 173 fêmeas do total de 256 tiveram até o penúltimo segmento do abdome e a cabeça dissecados com o auxílio de agulhas descartáveis para identificação de espécie e posteriormente foram encaminhadas para a análise molecular de diagnóstico (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3: Número de espécimes de flebotomíneos coletados no município de Rio Branco(AC) no período Abril/2011 a Abril/2012.**

	Total de indivíduos coletados - Rio Branco (AC)			Análise Molecular
	Machos	Fêmeas	Total	Fêmeas
1° Coleta/ Abril 2011	34	40	74	-
2° Coleta/ Outubro 2011	95	147	242	112
3° Coleta/ Abril 2012	70	69	139	61
<b>Total</b>	<b>199</b>	<b>256</b>	<b>455</b>	<b>173</b>

Todos os exemplares coletados foram identificados de acordo com a classificação de GALATI (2003).

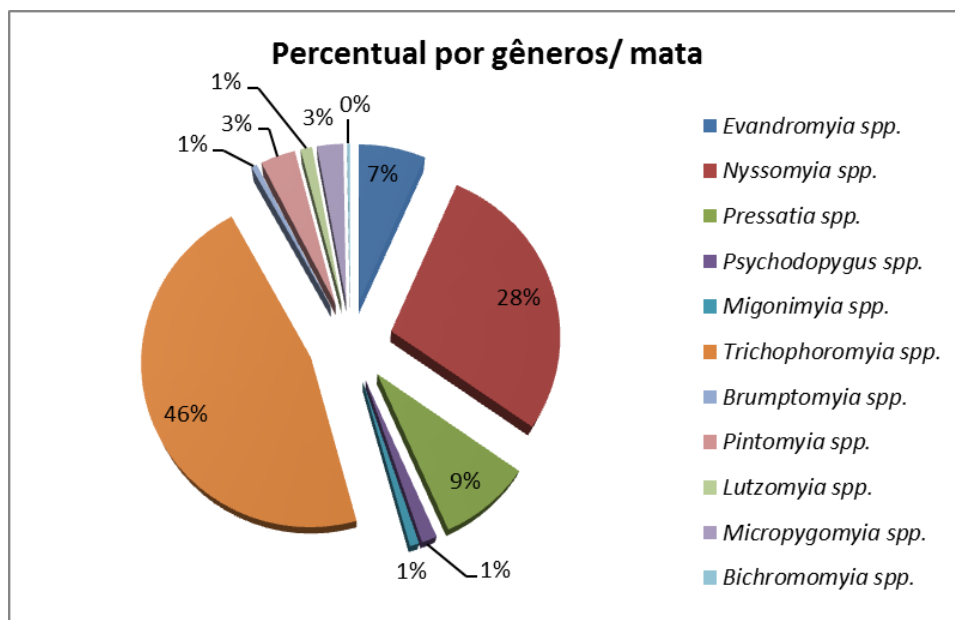
A identificação taxonômica revelou um total de 20 espécies de flebotomíneos coletados no município de Rio Branco, e sete foi possível a identificação apenas de gênero. As espécies/ gêneros identificadas foram: *Evandromyia saulensis* (FLOCH & ABONNENC, 1944), *Evandromyia bourrouli* (BARRETTO & COUTINHO, 1941), *Evandromyia bacula* (MARTINS, FALCÃO & SILVA, 1965), *Evandromyia walkeri* (NEWSTEAD, 1914), *Nyssomyia* sp. (BARRETO, 1962), *Nyssomyia richardwardi* (READY & FRAIHA, 1981), *Nyssomyia anduzei* (ROZEBOOM, 1942), *Nyssomyia whitmani* (ANTUNES & COUTINHO 1939), *Bichromomyia flaviscutellata* (MANGABEIRA, 1942), *Pressatia* sp. (MANGABEIRA, 1942), *Pressatia duncanae*

(LE PONT, MARTINEZ, TORREZ-ESPEJO & DURJARDIN, 1998), *Pressatia choti* (FLOCH & ABONNENC, 1941), *Pressatia calcarata* (MARTINS & SILVA, 1964), *Psychodopygus* sp. (MANGABEIRA, 1941), *Migonemyia migonei* (FRANÇA, 1920), *Trichophoromyia auraensis* (MANGABEIRA, 1942), *Trichophoromyia cellulana* (YOUNG, 1979), *Trichophoromyia* sp. (BARRETO, 1962), *Brumptomyia avellari* (COSTA LIMA, 1932), *Brumptomyia* sp. (FRANCA & PARROT, 1921), *Pintomyia* sp., *Pintomyia ovallesi*, *Pintomyia disiuncta*, *Lutzomyia sherlocki* (MARTINS, SILVA & FALCÃO, 1971), *Micropygomyia* sp. (BARRETO, 1962), *Micropygomyia peresi* (MANGABEIRA, 1942), *Micropygomyia trinidadensis* (NEWSTEAD, 1922). As espécies coletadas estão dispostas na Tabela 4.4 de acordo com o tipo de armadilha e o local de captura.

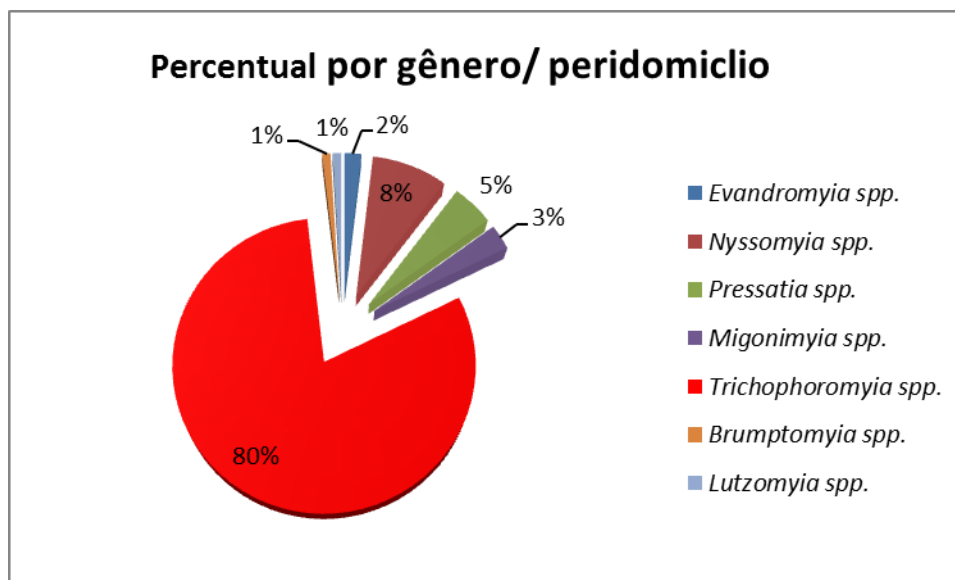
**Tabela 5.4: Consolidado de flebotomíneos capturados no município de Rio Branco (AC) durante o período Abril/2011 a Abril/2012, separados por ambientes antrópico e silvestre**

Zona	Urbana			Rural			Total	
	HP		Shannon	HP				
Armadilha / Barraca	Peridomicílio	Silvestre	Peridomicílio		Peridomicílio	Silvestre		
Ambiente	Peridomicílio	Silvestre	Peridomicílio	Total	Peridomicílio	Silvestre	Total	
Ecótopos	Galinheiro	Mata			Galinheiro	Mata		
Espécies	Número (N)	N		N	Número(N)	N	N	
<i>Trichophoromyia</i> sp.	12	111		123	22	1	23	146
<i>Trichophoromyia auraensis</i>	19	44		63	32	1	33	96
<i>Nyssomyia whitmani</i>	6	68		74				74
<i>Pressatia choti</i>		16	2	18				18
<i>Evandromyia saulensis</i>		16		16				16
<i>Nyssomyia</i> sp.		13	1	14	1		1	15
<i>Pressatia</i> sp.		13	2	15				15
<i>Nyssomyia richardwardi</i>		9		9	1		1	10
<i>Nyssomyia anduzei</i>		7		7				7
<i>Evandromyia walkeri</i>	2	5		7				7
<i>Migonimyia migonei</i>	3	3		6				6
<i>Pintomyia disiuncta</i>		6		6				6
<i>Micropygomyia</i> sp.		5		5				5
<i>Psychodopygus</i> sp.		5		5				5
<i>Trichophoromyia cellulana</i>		4		4	1		1	5
<i>Lutzomyia sherlocki</i>		4	1	5				5
<i>Pintomyia</i> sp.		4		4				4
<i>Micropygomyia peresi</i>		3		3				3
<i>Pintomyia ovallesi</i>		3		3				3
<i>Brumptomyia avellari</i>	1	1		2				2
<i>Pressatia duncanae</i>		1		1				1
<i>Pressatia calcarata</i>	1			1				1
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>		1		1				1
<i>Micropygomyia trinidadensis</i>		1		1				1
<i>Evandromyia bourrouli</i>		1		1				1
<i>Evandromyia bacula</i>		1		1				1
<i>Brumptomyia</i> sp.		1		1				1
<b>Total:</b>	<b>44</b>	<b>346</b>	<b>6</b>	<b>396</b>	<b>57</b>	<b>2</b>	<b>59</b>	<b>455</b>

Dos espécimes identificados apenas até gênero, os *Trichophoromyia* sp. foram os mais abundantes com 146 indivíduos, seguido da espécie *Trichophoromyia auraensis* com 96 indivíduos capturados e *Nyssomyia whitmani* com 74 exemplares coletados. Os gêneros *Trichophoromyia* spp. e *Nyssomyia* spp. foram os mais abundantes não apenas nas áreas de mata como também nas áreas de peridomicílio (Gráficos 5.5 e 5.6).



**Gráfico 5.5:** Percentual distribuído por gêneros de flebotomíneos coletados nas áreas de mata do município de Rio Branco (AC) no período Abril/2011 a Abril/2012



**Gráfico 5.6:** Percentual distribuído por gêneros de flebotomíneos coletados nas áreas de peridomicílio do município de Rio Branco (AC) no período Abril/2011 a Abril/2012

## 5.2. Avaliação de Infecção Natural.

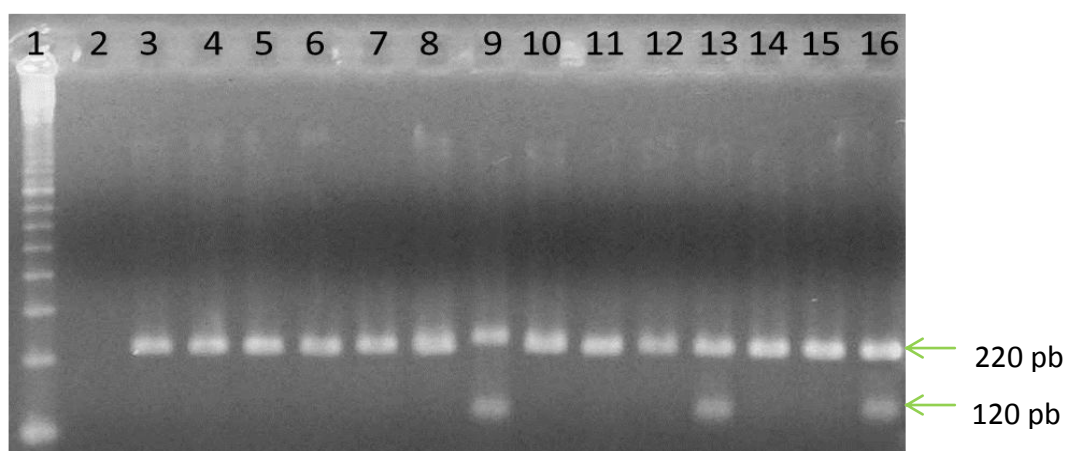
Foram destinadas à avaliação de infecção natural por *Leishmania* spp, 173 fêmeas de flebotomíneos referentes às espécies *Ev. saulensis*, *Ny. anduzei*, *Psychodopygus* sp, *Tr. cellulana*, *Pintomyia ovallesi*, *Mg. migonei*, *Trichophoromyia* sp, *Bi. flaviscutelada*, *Ny. whitmani* e *Pressatia* sp.

Os exemplares foram identificados e separados individualmente para a análise molecular, sendo que machos foram utilizados para controle de todas as etapas. As reações de PCR foram realizadas em multiplex com dois pares de iniciadores, sendo um para o alvo *Leishmania*, que amplifica um produto de 120 pb correspondente à região conservada dos minicírculos do kDNA, e outro específico para flebotomíneos (gene *cacophony*), gerando um produto de 220 pb. A amplificação simultânea do gene *cacophony* atua como um importante controle para possíveis inibições da enzima DNA polimerase, decorrentes da presença de inibidores nas amostras de DNA (proteínase k por exemplo), ou até mesmo falhas durante a etapa prévia de extração de DNA total a partir de lisados de insetos.

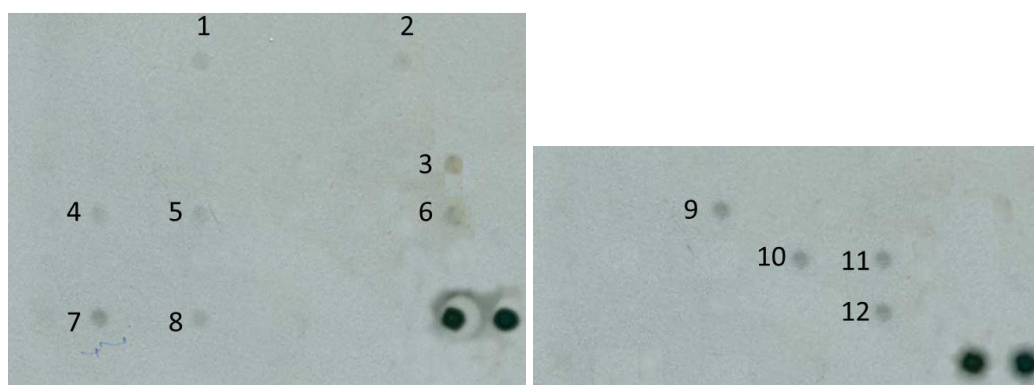
Das 173 fêmeas analisadas individualmente, em apenas duas amostras foi possível observar resultados positivos para infecção por *Leishmania* sp. em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Por outro lado, após a etapa de hibridização não-radioativa com sonda específica para o subgênero *Viannia* dos produtos amplificados de todas as 173 amostras avaliadas, foi possível confirmar a positividade destas duas amostras, além de mais 10 amostras que revelaram sinal de hibridização e que não puderam ser identificadas como positivas em gel de agarose. Assim, foi revelado um total de 12 amostras positivas em 173 fêmeas analisadas, conferindo taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. de 6,94% na área estudada.

As duas amostras positivas em gel de agarose são referentes às áreas de mata no bairro Bosque e correspondem a espécies do gênero *Trichophoromyia* sp. e *Pressatia* sp. (Figura 4.16). Das amostras que foram identificadas como positivas após a etapa de hibridização com sonda específica para o subgênero *Viannia*, duas correspondem à *Ev. saulensis* e foram capturadas na área de mata no Bairro de Vila Acre, e oito foram identificadas como *Trichophoromyia* sp. referentes à área de mata do bairro do Bosque,

além da confirmação das duas amostras que deram resultados positivos em gel de agarose (Figura 4.17).



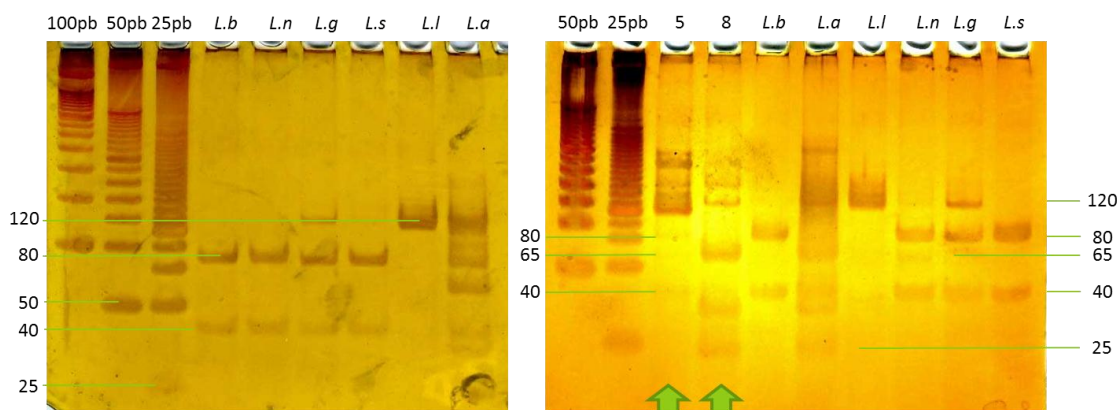
**Figura 5.16: Exemplo de eletroforese em gel de agarose à 2% corado com brometo de etídeo para avaliação de infecção natural de flebótomos por *Leishmania* sp..1:** Marcador de peso molecular 100 pb; 2: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 3-6: Controles negativos - DNA extraído de flebótomos machos; 7-15: Fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular revelando positividade em duas amostras (linhas 9 e 13); 16: Controle positivo da reação (DNA de um único flebotomíneo macho misturado com DNA de *L. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).



**Figura 5.17: Exemplo de hibridização dos produtos amplificados com sonda específica para subgênero *Viannia* (Dot-Blot) – 1 e 2: *Evandromyia saulensis* – mata- bairro Vila Acre; 3: *Pressatia* sp – mata – bairro Bosque; 4 à 12: *Trichophoromyia* sp – mata- bairro Bosque. Quatro controles positivos foram incluídos (sinal mais intenso) e representam 10  $\mu$ L DNA de *L. (V.) braziliensis* (153,7 ng/  $\mu$ L) extraído de cultura celular.**

Com a finalidade de identificar as espécies de *Leishmania* encontradas nos flebótomos, foram feitos ensaios de PCR-RFLP. Porém, este procedimento só pôde ser realizado com amostras que apresentaram resultados positivos de amplificação para *Leishmania* em gel de agarose (duas amostras apenas). Para tal, foi feita uma nova PCR a partir do DNA extraído destas amostras, empregando apenas os iniciadores específicos

para *Leishmania*, sem ser em formato multiplex. Os produtos obtidos foram então submetidos à clivagem com as seguintes enzimas de restrição: *AvaI*, *MspI*, *Sau3AI* e *HaeIII*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida à 10 % a 100 V e o gel foi submetido à coloração com Nitrato de Prata. Entre as enzimas utilizadas a *HaeIII* foi a que diferenciou melhor as espécies. Mesmo assim, o perfil de duas amostras positivas não foi compatível com nenhuma das cepas de referência utilizadas no ensaio (Figura 5.18).



**Figura 5.18: Exemplo de dois experimentos de PCR-RFLP em gel de poliacrilamida à 10% revelado por prata, empregando a enzima *HaeIII*:** 100, 50 e 25 pb correspondem aos marcadores de peso molecular; amostras de referência utilizadas: *Leishmania braziliensis* (*L.b*), *Leishmania naiffi* (*L.n*), *Leishmania guyanensis* (*L.g*), *Leishmania shawii* (*L.s*), *Leishmania lainsoni* (*L.l*), *Leishmania amazonensis* (*L.a*); 5 e 8: Amostras positivas para infecção natural por *Leishmania* spp. detectadas apenas em gel de agarose (setas verdes).

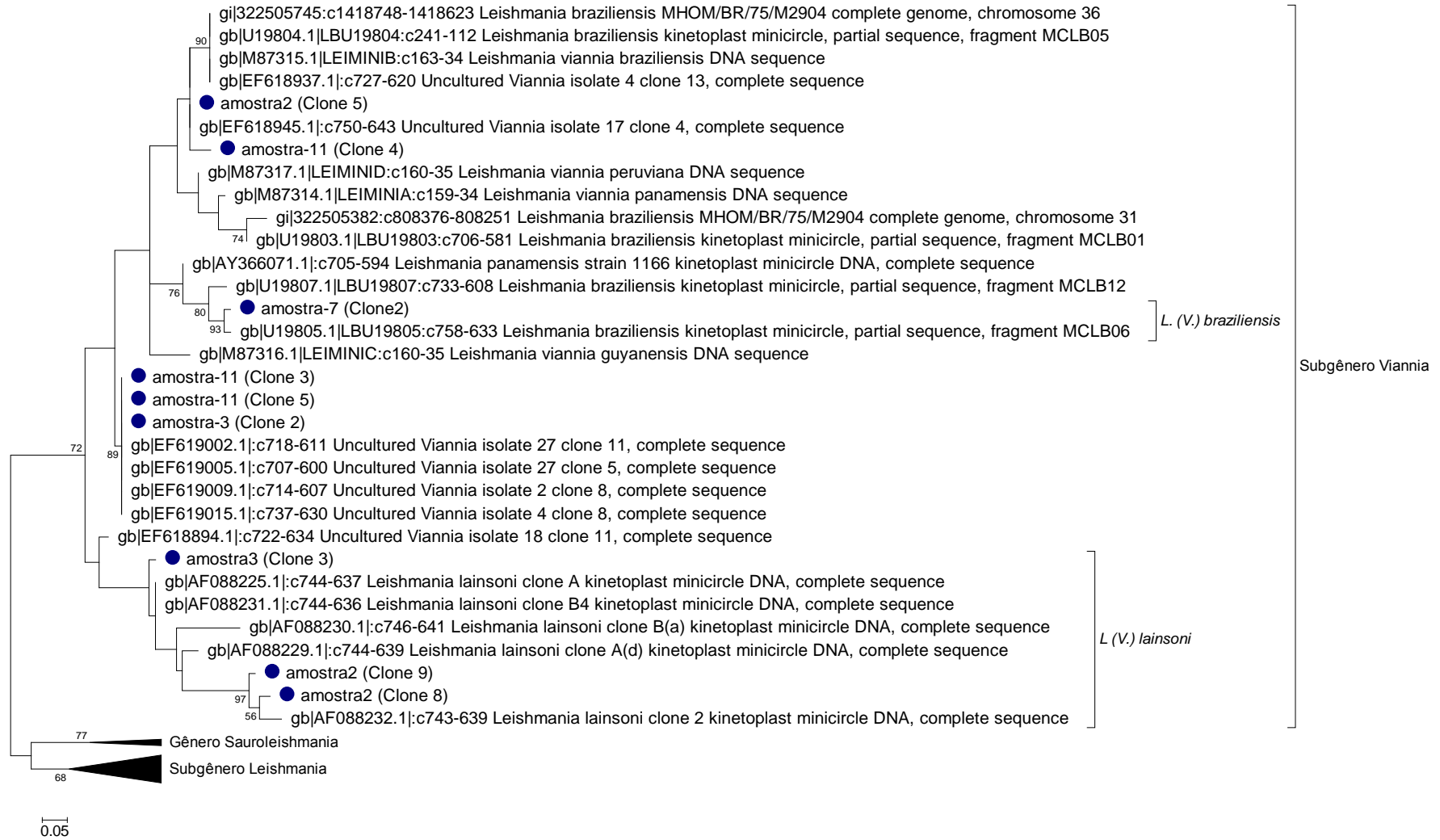
Considerando que das 12 amostras positivas, apenas duas revelaram produto de *Leishmania* amplificado em gel de agarose, e nestas duas amostras a PCR-RFLP não foi capaz de identificar o parasito comparando com as cepas referência, optamos por voltar ao DNA das 12 amostras de flebótomos e refazer o ensaio de PCR utilizando apenas o par de iniciador específico para gênero *Leishmania* para posterior clonagem e sequenciamento da região conservada dos minicírculos do kDNA.

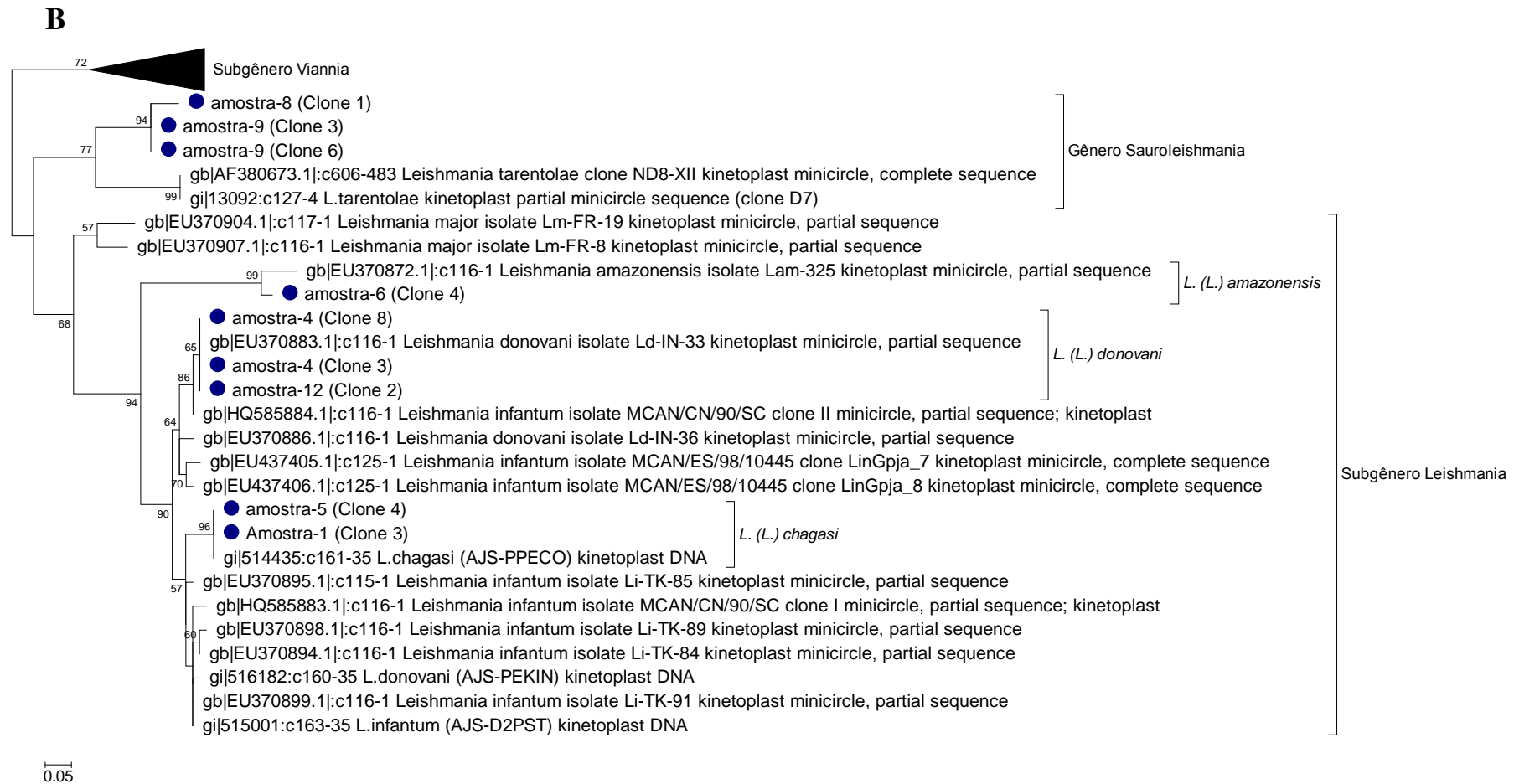
As amostras foram então clonadas e sequenciadas segundo a metodologia já descrita, e após o sequenciamento foram obtidas 82 sequências divididas em *forward* e *reverse* (sequências senso e anti-senso). Destas, foram retiradas 11 sequências devido à baixa qualidade do DNA molde (inserto), segundo os parâmetros estabelecidos pelo programa Phred para aceitação das sequências, os quais são baseados em 0,02% de probabilidade de erro estimado para uma base. Além dessas, 17 sequências foram retiradas após a análise utilizando o Blast, pois tinham o "e value" maior do que 1e-20.



As análises foram então inicialmente processadas com um total de 54 sequências divididas em diversos clones para as diferentes amostras. A partir da busca no banco de dados e alinhamento múltiplo das sequências geradas, foi realizada a montagem de uma árvore filogenética para inferir a similaridade das amostras-teste com as amostras referência. O método de máxima verossimilhança foi empregado utilizando 1000 replicatas de 'bootstrap' e o modelo de substituição GTR com o programa MEGA. Os valores de 'bootstrap' menores do que 50 e clones que apresentaram baixa similaridade de sequências foram omitidos na árvore filogenética (Figura 4.19, A e B). Na figura estão representadas 18 sequências de clones derivados de 11 amostras (amostra 10 apresentou sequências de baixa qualidade e foi retirada da análise), previamente positivas para infecção natural por *Leishmania* spp. Esses resultados foram correlacionados com as espécies de flebotomíneos e áreas de captura e estão demonstrados na Tabela 5.5.

A





**Figura 5.19: Árvore de máxima verossimilhança, não enraizada, mostrando as relações filogenéticas entre os clones dos minicírculos de leishmânias obtidas de flebotomíneos positivos e as seqüências de referência. A) Subgênero *L. Viannia*; B) Gênero *Sauroleishmania* e Subgênero *L. Leishmania*. Valores de ‘bootstrap’ acima de 50 são mostrados nos ramos da árvore. Amostras: 1 e 2: *Evandromyia saulensis* – mata- bairro Vila Acre; Amostra 3: *Pressatia* sp – mata – bairro Bosque; Amostras 4 à 12: *Trichophoromyia* spp. mata- bairro Bosque.**

**Tabela 5.5: Correlação entre espécimes de flebotomos e identificação de *Leishmania* spp. segundo a árvore filogenética gerada a partir da região conservada dos minicírculos de kDNA.**

<b>Amostra</b>	<b>Espécie de flebotomíneo</b>	<b>Local de Captura</b>	<b><i>Leishmania</i> spp.</b>
1	<i>Ev. saulensis</i>	mata - Vila Acre	<i>L. (L.) chagasi</i>
2	<i>Ev. saulensis</i>	mata - Vila Acre	<i>L. Viannia</i> e <i>L. (V.) lainsoni</i>
3	<i>Pressatia</i> sp.	mata - Bosque	<i>L. Viannia</i> e <i>L. (V.) lainsoni</i>
4	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>L. (L.) donovani</i>
5	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>L. (L.) chagasi</i>
6	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>L. (L.) amazonensis</i>
7	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>L. (V.) braziliensis</i>
8	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>Sauroleishmania</i>
9	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>Sauroleishmania</i>
10*	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	-
11	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>L. Viannia</i>
12	<i>Trichophoromyia</i> sp.	mata - Bosque	<i>L. (L.) donovani</i>

\* Não entrou na árvore

## 6.0. Discussão

### 6.1. Estudo da fauna flebotômica do município de Rio Branco

Ocorriam no Brasil entre 1880 e 1930, surtos de LTA associados ao ciclo econômico da borracha, principalmente na região ocidental amazônica que compreende a área de estudo do presente trabalho, que hoje se constitui nos estados de Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima. Esta fase econômica atraía trabalhadores de diversas áreas do Brasil, os quais posteriormente retornavam para suas cidades de origem ou migravam para outras áreas para trabalhar em ciclos, como o de café nas fazendas cafeeiras, dispersando assim a doença, associada também ao crescimento das cidades brasileiras (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

O desenvolvimento do município de Rio Branco no Estado do Acre, com a construção de casas dentro das áreas de mata, assim como ocorrido em diversas cidades do Brasil, apresentou papel fundamental na disseminação de agravos da saúde. Este crescimento desordenado implicou em uma série de transformações do meio ambiente e possibilitou a instalação e desenvolvimento da LTA. Mudanças rápidas das condições ambientais em muitas regiões tropicais, causadas pela destruição do habitat e associadas aos processos de desmatamento e urbanização, têm uma influência enorme na população de insetos vetores e, por conseguinte na transmissão da doença. Enquanto algumas espécies estão sujeitas à extinção, outras podem se tornar abundantes (BEJARANO et al., 2002). O conhecimento da distribuição geográfica das espécies transmissoras de LTA é ainda escasso para algumas regiões, tais como o Estado do Acre, aonde a doença é endêmica (MARTINS & SILVA 1964; ARIAS et al., 1984; SILVA-NUNES et al., 2008).

São fortes as evidências de que a presença de animais domésticos e silvestres no peridomicílio atrai um grande número de flebotômíneos, incluindo as espécies que são vetoras de leishmanioses, contribuindo assim, para o aumento do risco de transmissão de *Leishmania* spp. nestas áreas (BRAZIL et al., 1991; FORATTINI 1953; 1960; 1976). Na nossa região de estudo pode ser observado um grande número de galinheiros, com aves de diversos tipos soltas pelo peridomicílio, cães, e o relato dos moradores da presença de animais silvestres, principalmente no período noturno.

Em 2008 foi realizado um estudo nos municípios de Bujari, Xapuri e Rio Branco, no Estado do Acre, onde foi verificada a abundância de espécies de flebotomos

no solo e na copa das árvores; *Trichophoromyia auraensis*, *Nyssomyia antunesi*, *Nyssomyia whitmani* e *Psychodopygus davisii* representaram 66,95% dos espécimes coletados. *Ny. whitmani* foi a espécie mais abundante, seguida de *Ny. antunesi* e *Psy. davisii* (AZEVEDO et al., 2008). Desde então, não foi realizado nenhum outro trabalho de fauna flebotomínica na região.

No presente trabalho, foi coletado um total de 455 espécimes de flebotomíneos no período de um ano, sendo 256 fêmeas e 199 machos. AGUIAR et al., (1985), acreditam que coletas com armadilhas luminosas possam atrair um maior número de machos, visto que estes formam agregados com o propósito de acasalamento. Em nossas coletas foi observado um número menor de machos, comparado ao de fêmeas, não corroborando com o pressuposto observado pelos autores; sendo admissível que nem todas as espécies de flebotomíneos possuam esta peculiaridade, como já observado em alguns estudos com flebotomíneos neotropicais (FUZARI, 2011; ANDRADE-FILHO, 2008).

Para identificar as espécies de flebotomíneos utilizamos a nomenclatura de GALATI (1995, 2003). E dentre as espécies e/ ou gêneros identificados: *Evandromyia saulensis*, *Evandromyia bourrouli*, *Evandromyia bacula*, *Evandromyia walkeri*, *Nyssomyia* sp., *Nyssomyia richardwardi*, *Nyssomyia anduzei*, *Nyssomyia whitmani*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Pressatia* sp., *Pressatia duncanae*, *Pressatia choti*, *Pressatia calcarata*, *Psychodopygus* sp., *Migonemyia migonei*, *Trichophoromyia auraensis*, *Trichophoromyia cellulana*, *Trichophoromyia* sp., *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia* sp., *Pintomyia* sp., *Pintomyia ovallesi*, *Pintomyia disiuncta*, *Lutzomyia sherlocki*, *Micropygomyia* sp., *Micropygomyia peresi*, *Micropygomyia trinidadensis*, todos já tinham sido descritos na área (AZEVEDO et al., 2008; GALATI, 2003; AGUIAR, 2003).

Comparando todos os gêneros identificados, *Trichophoromyia* spp. foi o mais prevalente, tanto nas áreas de peridomicílio - correspondendo a 80%, quanto nas áreas de mata (46%), em relação aos outros gêneros coletados (Gráficos 4.5 e 4.6). Em relação aos espécimes possíveis de serem identificados até gênero, *Trichophoromyia* spp. prevaleceu com 146 indivíduos no total, seguido da espécie *Trichophoromyia auraensis* com 96 indivíduos e *Nyssomyia whitmani* com 74 exemplares coletados. É possível que todas as *Trichophoromyia* identificadas até gênero sejam pertencentes à espécie *Trichophoromyia auraensis*, porém a coleta de cinco espécimes que foram

identificadas como *Trichophoromyia cellulana* nos deixou em dúvida, devido à presença de diferenças muito sutis entre as fêmeas deste gênero. A grande quantidade de exemplares de *Trichophoromyia* spp. e *Nyssomyia* spp. coletados no presente trabalho pode ser corroborada pelos estudos de AZEVEDO et al. (2008), que já haviam descrito a abundância destas na região.

A região amazônica possui características particulares como a diversidade biológica de potenciais vetores e reservatórios, que podem favorecer a circulação simpátrica de várias espécies de *Leishmania* (GRIMALDI et al., 1989; LAINSON et al., 1994). Os gêneros *Psychodopygus* e *Nyssomyia* são os mais abundantes em espécies e também os mais importantes vetores de *Leishmania* na região amazônica (WARD et al., 1973, GRIMALDI et al., 1991, RANGEL & LAINSON 2003, AZEVEDO et al., 2008). AZEVEDO et al. (2002) demonstraram que, com base na análise quantitativa e qualitativa da fauna de flebotomíneos no município Peixoto de Azevedo, no Estado de Mato Grosso, diferenças na composição da fauna de flebotomíneos entre a floresta primária (predominantemente *Psychodopygus* spp.) e área antrópica (predominantemente *Nyssomyia* spp.), podem ser detectadas. Em estudo realizado no Estado do Acre em 2008, AZEVEDO e colaboradores identificaram as espécies *Ny. whitmani*, *Ny. antunesi*, *Psy. davisii* e *Ny. umbratilis*, como potenciais vetores de *Leishmania* spp. na região de estudo (AZEVEDO et al., 2008).

## **6.2. Avaliação de Infecção Natural por *Leishmania* spp.**

A determinação de infecção natural para identificação de espécies vetoras, sobretudo nas regiões endêmicas, e a identificação correta da espécie de *Leishmania* em uma determinada espécie de flebotomíneo são de grande importância na epidemiologia das leishmanioses (PITA-PEREIRA, 2004). Sendo assim, dos 455 flebotomíneos coletados neste estudo, 173 fêmeas referentes às espécies *Ev. saulensis*, *Ny. anduzei*, *Psychodopygus* sp., *Trichophoromyia cellulana*, *Pintomyia ovallesi*, *Mg. migonei*, *Trichophoromyia* sp., *Bi. flaviscutelada*, *Ny. whitmani* e *Pressatia* sp. foram destinadas aos ensaios moleculares para avaliação de infecção natural por *Leishmania* spp.

Segundo KILLICK-KENDRICK (1990), existem critérios que devem ser obedecidos para se confirmar uma espécie de flebotomíneo como vetaora de leishmanioses. Critérios essenciais correspondem ao grau de antropofilia; distribuição

espacial coincidente com a área geográfica de ocorrência de casos de infecção humana; infecção natural por parasitos do gênero *Leishmania*, identificados como pertencentes à mesma espécie que infecta o homem na mesma área geográfica, além de critérios complementares que avaliam a capacidade de desenvolvimento do parasito nas fêmeas de flebotomíneos infectadas experimentalmente, assim como a capacidade destas se infectarem e transmitirem o parasito através da picada. Porém, sendo os critérios essenciais determinados, é possível sugerir o potencial papel vetorial de uma determinada espécie de flebotomíneo.

Neste contexto, o diagnóstico de infecção natural entra como uma ferramenta complementar em nosso estudo de fauna flebotomínica, para que possamos sugerir espécies vetoras nas áreas de trabalho. Das 173 fêmeas analisadas individualmente, encontramos 12 positivas nos ensaios de avaliação de infecção natural correspondendo à uma taxa de infecção de 6,9% para *Leishmania* spp. As espécies que apresentaram resultados positivos foram 5,2% de *Trichophoromyia* sp. (9/173) capturados nas áreas de mata do bairro do Bosque, 1,1% de *Ev. saulensis* (2/173) capturados nas áreas de mata do do bairro Vila Acre, 0,6% *Pressatia* spp. (1/173) capturados nas áreas de mata do bairro do Bosque.

Até o momento não se tem o conhecimento de infecção natural de *Evandromyia saulensis* por *Leishmania* spp., correspondendo este achado ao primeiro registro de infecção nesta espécie. *Ev. saulensis* apresenta uma distribuição bem ampla na América do Sul e Central, e no Brasil apresenta predomínio na região amazônica aparecendo também na região centro-oeste (YOUNG & DUNCAN 1994, GALATI 1995). A identificação de um espécime de *Pressatia* spp. com infecção natural em nossos estudos foi corroborada pelo encontro recente deste mesmo gênero de flebotomíneo, com resultado positivo para infecção natural por *Leishmania* spp. em região do Peru, fronteira com o Acre ( Hugo Valdivia, comunicado pessoal). Ainda não existem relatos sobre antropofilia ou hábitos alimentares destas duas espécies.

Nossos resultados do encontro de positividade em nove indivíduos do gênero *Trichophoromyia* sp. corroboram estudos recentes que revelam a presença de *Trichophoromyia* sp. naturalmente infectada, descrita por VALDIVIA et al. (2012) em Madre de Dios, no Peru, região de fronteira com a Bolívia e com o Brasil, na localidade de Flor do Acre. Os autores relatam a identificação de exemplares de *Trichophoromyia*



*auraensis* infectados com as espécies *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) braziliensis*, através de PCR em tempo real para os alvos DNA do cinetoplasto (kDNA), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) e manose fosfato isomerase (MPI) (VALDIVIA et al., 2012). Outros estudos realizados em Puno, Peru, mostram que *Tr. auraensis* pode ser antropofílico (ARÍSTIDES, 1999), embora esta evidência ainda necessite de confirmação (FERNANDEZ et al., 1998).

Em relação às espécies estudadas e que obtivemos resultados negativos para infecção natural, vale mencionar que *Ny. whitmani* é considerada o principal vetor da *L. (Viannia) braziliensis* em diversas áreas do Brasil (MAYRINK et al., 1979; RANGEL e LAINSON 2003). A presença de *Nyssomyia whitmani* já foi descrita na Amazônia, sendo comprovadamente transmissora de *L. (V.) shawi* no Pará (LAINSON et al., 2005; RANGEL et al., 1996); entretanto, seu papel na transmissão de *L. (V.) braziliensis* nessa parte do país ainda é discutido (SHAW et al., 1991), uma vez que parece ser pouco antropofílica na Amazônia (DA COSTA et al., 2007).

A espécie *Mg. migonei* tem sido sugerida como possível vetor de *L. (L.) infantum*, em La Banda, na Argentina (SALOMÓN et al., 2010) e no Estado de Pernambuco (CARVALHO et al., 2010); assim como já foi encontrada naturalmente infectada por *L. (V.) braziliensis* em área endêmica de leishmaniose cutânea no Rio de Janeiro (PITA-PEREIRA et al., 2005), sendo incriminada como vetor de leishmaniose cutânea em outras regiões do Brasil (QUEIROZ et al., 1994).

Em relação à *Bi. flaviscutellata*, LAINSON & SHAW (1968) demonstraram sua capacidade vetorial para *L. (L.) amazonensis*. Felizmente, esta espécie é dotada de pouca antropofilia, e no nosso trabalho apenas um exemplar foi capturado em área de mata, possivelmente devido ao tipo de armadilha utilizada. Caso esta espécie fosse abundante no peridomicílio, a problemática da leishmaniose cutânea na Amazônia poderia ser bem mais grave, não só pelo número de pessoas infectadas, mas, principalmente, pelo fato de que a *L. (L.) amazonensis* é responsável pela forma clínica anérgica difusa da leishmaniose cutânea (RANGEL & LAINSON, 2003).

Apesar das espécies *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Bi. flaviscutellata* serem consideradas vetoras em diversas áreas, estas não foram encontradas naturalmente infectadas no presente estudo.

É importante ressaltar que a capacidade vetorial das espécies de flebotomíneos é possivelmente um fator regulado por questões de ordem físico e fitogeográfica, uma vez que o meio ambiente de cada região pode influenciar na melhor adaptação de uma determinada espécie; o que por sua vez, pode determinar a predominância de uma espécie sobre outra (LAINSON, 1983). Temos como exemplo uma área endêmica de LTA na Venezuela, onde *Mi. migonei* assume a posição de principal transmissor da LTA, enquanto que *Lu. intermedia* representa o vetor secundário (FELICIANGELI et al., 1988, 1991; AÑEZ et al., 1989). Em localidades da região sudeste do Brasil, esta situação se inverte. Neste caso, a hipótese que vigora é que *Ny. intermedia* seria o principal transmissor da LTA em humanos, enquanto que *Mi. migonei* estaria atuando como vetor secundário (FERREIRA et al., 2001; RANGEL et al., 1986; PITA-PEREIRA et al., 2005).

A capacidade de um flebotomíneo em atuar como vetor é primeiramente determinada pela habilidade de sobrevivência, multiplicação e diferenciação do parasito no interior do trato digestivo do inseto (LAINSON & RANGEL, 2005). Conseqüentemente, a observação e a correta identificação das formas do parasito presentes no intestino do vetor constituem passos importantes para a incriminação de vetores de *Leishmania* e caracterização da doença. Embora as diversas espécies de *Leishmania* sejam morfologicamente semelhantes, elas apresentam graus variáveis de especificidade em relação aos seus hospedeiros invertebrados (SHAW, 1994).

Sendo o diagnóstico de infecção natural um dos critérios que auxiliam na sugestão de possíveis espécies vetoras, a PCR entra como uma ferramenta importante, onde as principais vantagens de seu uso consistem na sua maior sensibilidade e especificidade, comparada aos métodos convencionais, possibilitando a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em quantidades mínimas como 50fg de DNA do parasito (FU et al., 1998); além da rapidez do diagnóstico quando uma grande amostragem de flebotomos precisa ser avaliada (BARKER, 1989; MICHALSKY et al., 2002). Para isso se faz necessária a escolha de um alvo molecular adequado que confira uma maior sensibilidade e especificidade de detecção do parasito. Neste sentido, os minicírculos que fazem parte da rede de kDNA dos parasitos do gênero *Leishmania*, estão presentes em cerca de 10.000 cópias por rede e possuem em comum uma única região de seqüência conservada.

A técnica de PCR *multiplex* associada à hibridização não-radioativa é importante, considerando os seguintes fatores: (i) análise simultânea de um grande número de exemplares em um único ensaio, possibilitando em uma única reação inferir a qualidade do DNA recuperado a partir de lisados de insetos, além de controlar a presença de potenciais inibidores, evitando assim resultados falso-negativos para infecção natural por *Leishmania* spp.; (ii) pela sua especificidade que permite identificar precisamente DNA de *Leishmania* spp., em função do conjunto de iniciadores selecionados; (iii) a etapa posterior de hibridização aumenta a sensibilidade de detecção, o que otimiza o diagnóstico de infecção natural em insetos vetores, como demonstrado neste estudo, onde das 12 amostras positivas, 10 foram visualizadas apenas após a hibridização molecular.

No nosso trabalho, devido à grande diversidade de potenciais vetores e reservatórios que podem estar favorecendo a circulação simpátrica de várias espécies de *Leishmania* na área estudada, não foi possível a identificação precisa da espécie do parasito encontrada no inseto vetor, através do emprego da metodologia de PCR-RFLP. Os perfis de restrição observados para as duas únicas amostras que tiveram suas positivities reveladas em gel de agarose, as quais correspondem às espécimes de *Tricophoromyia* sp. e *Pressatia* sp., mostraram-se complexos e distintos dos perfis das amostras referência. Aparentemente, pela Fig. 4.18, pode ser observada uma maior semelhança do padrão de bandas exibido pela amostra 8 com *L. (L.) amazonensis*, e para a amostra 5 especula-se um padrão misto de *L. (V.) lainsoni* com *L. (V.) naiffi*.

Para uma maior acurácia na identificação da espécie de *Leishmania* presente nas 12 amostras de flebótomos positivas, fez-se necessária a posterior clonagem e sequenciamento dos produtos amplificados das 12 amostras positivas - duas reveladas em gel de agarose e confirmadas após hibridização, e 10 detectadas apenas por hibridização. Os fragmentos clonados e sequenciados foram correspondentes à região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania*. Apesar de estarmos trabalhando com uma região considerada "conservada" entre as diferentes espécies de *Leishmania* sp., o alinhamento das sequências geradas pelos clones obtidos de cada amostra, demonstrou uma variação considerável (substituições de nucleotídeos, inserções e/ou deleções), possibilitando a construção de uma árvore.

A partir da construção da árvore, foi possível observar a proximidade das sequências geradas (sequências-teste) com as sequências de referência, depositadas no

banco de dados. Como exemplo, os clones obtidos a partir das amostras 1 e 2, referentes às espécies de flebotomíneos *Ev. saulensis* demonstraram similaridade com *L. (L.) chagasi* (amostra 1), *L. Viannia* e *L. (V.) lainsoni* (amostra 2). Dois clones da amostra 3, referentes ao flebotomíneo *Pressatia* sp. também apresentaram similaridades com *L. Viannia* e *L. (V.) lainsoni*. Os clones relacionados às amostras numeradas de 4 a 12, que correspondem aos espécimes de *Trichophoromyia* sp. revelaram similaridades com as sequências referência, da seguinte forma: amostras 4 e 12 - *L. (L.) donovani*; amostra 5 - *L. (L.) chagasi*; amostra 6 - *L. (L.) amazonensis*; amostra 7 - *L. (V.) brasiliensis*; amostras 8 e 9 - gênero *Sauroleishmania*, a amostra 10 não entrou na análise por não apresentar uma sequência dentro dos valores de qualidade estabelecidos pelo programa; e a amostra 11 – Subgênero *Viannia*.

Curiosamente, os resultados do sequenciamento revelaram similaridades de alguns clones com espécies representantes do subgênero *Leishmania*, tendo em vista o resultado negativo da hibridização dos produtos amplificados (região conservada dos minicírculos de kDNA) das 12 amostras de flebotomíneos positivas para *Leishmania* spp., empregando sonda específica de *Leishmania (L.) chagasi* (dados não mostrados). Por outro lado, em ensaios prévios para otimização das condições de hibridização com a sonda desenhada para o subgênero *Viannia*, incluímos duas amostras de DNA extraído de *Leishmania (L.) amazonensis* (como controles negativo), as quais revelaram sinais fracos na hibridização (resultado não mostrado). Desta forma, acreditamos que um dos clones sequenciados correspondente à *Ev. saulensis*, assim como outros dois clones de *Trichophoromyia* sp., os quais foram similares às sequências de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente, possam ser referenciados à esta última espécie.

Em relação às amostras que se aproximaram de sequências referências do gênero *Sauroleishmania* (amostra 8 – clone 1 e amostra 9 – clones 3 e 6), identificadas como *Trichophoromyia* sp., estas não foram incluídas no mesmo ramo em que se encontram as sequências de *L. tarentolae*, sugerindo assim que estas amostras possam ser de outros tripanossomatídeos semelhantes ao gênero *Sauroleishmania* e que ainda não foram isolados e/ou caracterizados. Vale ressaltar que apesar da Organização Mundial de Saúde considerar, *Sauroleishmania* como gênero, ainda há discussões sobre o assunto, estudos com base em dados isoenzimáticos e de sequências de genes de ITS rDNA, polimerase  $\alpha$ , Subunidade maior do RNA polimerase II, 7SL RNA, Citocromossomo B

e Hsp 70 (THOMAZ-SOCCOL et al., 1993;. CROAN et al., 1997; ORLANDO et al., 2002;. LUYO-ACERO et al., 2004;. ZELAZNY et al., 2005, SCHÖNIAN et al., 2010; FRAGA et al., 2010), apoiam a classificação das leishmanias de lagarto como subgênero *L.(Sauroleishmania)* proposto por SAF'JANOVA (1982).

Assim, os resultados gerados pela árvore poderiam ser interpretados de duas maneiras:

1- Padrão tão heterogêneo e complexo obtido com o marcador empregado (região conservada dos minicírculos do kDNA, de 120 pb aproximadamente) que poderia estar relacionado, de fato, às características da área de estudo no que se refere à elevada variabilidade de espécies de *Leishmania* circulantes no município de Rio Branco. TOJAL et al. (2003) e (2006), identificaram e caracterizaram espécies distintas de *Leishmania* isoladas de lesões cutâneas de pacientes, a saber, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* e um híbrido de *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni*.

2- Limitações técnicas, tais como a reduzida concentração do inserto de DNA a ser sequenciado (lembrando que trabalhamos com avaliação de infecção natural de um único inseto flebotomíneo), além do seu pequeno tamanho (120 pb), poderiam ter induzido erros nas sequências geradas. Com isso vemos a necessidade da busca de novos marcadores no genoma de *Leishmania*, que apresentem um maior grau de polimorfismo e um maior poder de resolução para a diferenciação entre espécies do parasito. Uma possibilidade seria o emprego da molécula inteira de minicírculo de *Leishmania*, em torno de 800 pb.

## 7.0. Conclusões

- A fauna flebotomínica do município de Rio Branco, Estado do Acre, apresentou-se bem diversificada, onde foram encontradas 20 espécies de 11 gêneros diferentes;
- Os gêneros mais abundantes foram *Trichophoromyia* spp. e *Nyssomyia* spp.;
- A taxa de infecção natural por *Leishmania* spp foi de 6,9% nas áreas investigadas, correspondendo à 12 espécimes positivas de 173 fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular;
- A PCR direcionada à região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* spp., apesar de apresentar ótima sensibilidade diagnóstica, não possibilitou por si só, a detecção, em gel de agarose, da infecção em 10 flebótomos analisados individualmente; o que foi confirmado após hibridização dos produtos amplificados com sonda para *L. (Viannia)*, totalizando assim 12 amostras positivas;
- Foram encontradas naturalmente infectadas as espécies/gêneros de flebotomíneos: *Ev. Saulensis*, *Pressatia* sp. e *Trichophoromyia* spp., necessitando de mais estudos para saber se estas espécies podem estar atuando como vetores na região;
- Os ensaios de PCR-RFLP revelaram perfis de restrição complexos em relação às cepas referências, não auxiliando assim na identificação das espécies de *Leishmania* encontradas em duas amostras de flebótomos positivas que puderam ser analisadas por essa metodologia;
- Os resultados de sequenciamento inferidos da árvore filogenética demonstraram similaridades entre os clones derivados das amostras de flebótomos positivas e sequências referência de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, subgênero *Viannia*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) donovani* e gênero *Sauroleishmania*;
- Maiores esforços devem ser concentrados na busca de outros marcadores do genoma de *Leishmania* spp. que forneçam resultados mais acurados para a identificação das espécies do parasito que possam estar infectando a fauna flebotomínica do município de Rio Branco, Estado do Acre.

## 8.0. Referências Bibliográficas

- ADLER, S. & THEDOR, O. The mouthparts, alimentary tract and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi* Annals of Tropical Medicine Hygiene, 20:109-142, 1926.
- AGUIAR G M, MEDEIROS W M. Distribuição regional e habitats das espécies flebotomíneas do Brasil, p.207-255. In Rangel E F, Lainson R (orgs) Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 368p, 2003.
- AGUIAR GM, VILELA ML, SCHUBACK PD, SOUCASAUX T, AZEVEDO ACR. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 80:465-482, 1985.
- ALENCAR, J.E. Leishmaniose Visceral no Brasil. Revista de. Medicina da Universidade Federal do Ceará. 17/18: 129-148, 1977/78.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O. e MARZOCHI, K. B. F., Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e póscolombianas - História, Ciências, Saúde . Manguinhos, 10(3): 853-82, set.-dez. 2003.
- ALVAR J, VELEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, DEN BOER M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671, 2012.
- ANDRADE-FILHO J.D, OLIVEIRA R.C, FONSECA A.R Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) Coletados com Armadilha Malaise no Centro-Oeste de Minas Gerais. Neotropical Entomology 37(1):104-106, 2008.
- AÑEZ N, NIEVES E, CAZORLA D. The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene;83(5):634-5, 1989.
- ANTOINE JC, PRINA E, JOUANNE C. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophage maintain an acidic pH. *Infect Immunol* 58: 779-787, 1990.
- ARAGÃO, H.B. Transmissão da Leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brasil Médico* , 36:129, 1922.
- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E., TSELENTIS, Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Semi-nested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 66( 5): 1933-1938, mai. 2000.

- ARIAS JR, MILES MA, NAIFF RD, POVOA MM, DE FREITAS RA, BIANCARDI CB, CASTELLON EG. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Nov;34(6):1098-108, 1985.
- ARIAS JR, FREITAS RA, BARRETT TV. A new sandfly in the subgenus *Nyssomyia* (Diptera, Psychodidae) from the Amazon Basin of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 325-327, 1984.
- ARIAS JR, FREITAS RA. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 3: Phlebotomine sandfly stratification in “terra firme” forest. Acta Amazônica 12: 599-609, 1982
- ARIAS JR, FREITAS RA. Flebótomos da Amazônia Central do Brasil. I. Resultados obtidos das capturas feitas em isca humana e equina (Diptera: Psychodidae). Acta Amazônica 7: 507-27, 1977.
- ARÍSTIDES H. La leishmaniasis tegumentaria en el Alto Tambopata, Departamento de Puno, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 15:15–24, 1999.
- ASHFORD RW. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. Clinical and Experimental Dermatology 14:523-532, 1996.
- ASHFORD R.W. What it takes to be a reservoir host. Belgian Journal of Zoology. 127: 85-90, 1997
- AZEVEDO ACR, COSTA SM, PINTO MCG, SOUZA JL, CRUZ HC, VIDAL J, RANGEL EF. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 103(8): 760-767, December 2008.
- AZEVEDO ACR, LAINSON R, SOUZA AA, FÉ NF, FELICIANGELI DM, MENESES CRV, RANGEL EF. Comparative studies of populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) in Brazil and Venezuela. Journal of Medical Entomology 39: 587-600, 2002.
- AZEVEDO ACR, Luz SLB, Vilela ML, Rangel EF. Studies on the sandfly fauna of Samuel Ecological Station, Porto Velho Municipality, Rondônia State, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz ; 88: 509-12. 1993.
- BANETH, G. KOUTINAS, A., SOLANO-GALLEGO, L.B. & FERRER, L. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology, 24(7), 324-330 .2008.
- BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. Parasitology, Oxford, 99: 125-146, 1989.



- BARKER D C. DNA Diagnosis of Human Leishmaniasis. *Parasitology Today* 3: 177-184, 1987.
- BASTIEN P, PROCOP GW, REISCHL U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6):1897–900, 2008.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097–1106. 2007.
- BEJARANO EE, URIBE S, ROJAS W, VÉLEZ ID . Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban *Leishmaniasis* in the city of Sincelejo, Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(5): 645-647, 2002.
- BEN ABDA I, MONBRISON F, BOUSSLIMIA N, AOUN K, BOURATBINEA A, PICOT S: Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(suppl 1):17-22, 2010.
- BEZERRA-VASCONCELOS D.R, MELO LM, ALBUQUERQUE ES, LUCIANO MCS, BEVILAQUA CML, Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods *Experimental Parasitology* 129: 234–239, 2011.
- BRAZIL,R.P & BRAZIL, B. G . Cap 4 - Flebotomíneos do Brasil - Elizabeth F. Rangel e Ralph Lainson (Orgs.) 2003.
- BRAZIL, R.P.; MORTON, I.E. & WARD, R.D. Notes of the feeding habits of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Ceará State, Northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86(4): 497-498, 1991.
- BRAZIL RP. In vivo fusion of lysosomes with parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 78(2):87–91, Apr 1984.
- CARVALHO, M.R.; VALENÇA H.F; SILVA FJ; PITA-PEREIRA D; PEREIRA T.A; BRITTO .C; BRAZIL R.P; BRANDÃO-FILHO S. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França,1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropica* 116, 108–110, 2010.
- CASTILHO TM, CAMARGO LM, MCMAHON-PRATT D, SHAW JJ, FLOETER-WINTER LM: A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(suppl 1):122-132, 2008.
- CAZZULO JJ. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB Journal*. Oct;6(13):3153-61. Review. 1992.

- CHANCE ML, The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. In: Leishmaniasis. 1st ed. Chang MP, Bray RS. Elsevier Science Publishing Company, Inc. USA. 1985.
- CIHAKOVA J, VOLF P. Development of different *Leishmania major* strains in vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91: 267–279. 1997.
- CLEAVELAND S, LAURENSEN MK, TAYLOR LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characterization, host range and the risk of emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 356: 991-999. 2001
- CROAN, D.G., MORRISON, D.A., ELLIS, J.T.; Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 89, 149–159, 1997.
- CRUZ AK, TOSI LRO. Molecular biology. *Clin Dermatol*. 1996; 14:533-540.
- CUPOLILLO E, AGUIAR ALVES F, BRAHIM LR, NAIFF MF, PEREIRA LO, OLIVEIRA-NETO MP, FALQUETO A, GRIMALDI G JR. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Medical Microbiology and Immunology (Berl)*. Nov;190(1-2):57-60. 2001.
- CUPOLILLO E, MEDINA-ACOSTA E, NOYES, H, MOMEN H, GRIMALDI JR, G. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today* 16: 142-144. 2000.
- CUPOLILLO E, GRIMALDI JR, G, MOMEN H. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73: 145-155. 1995.
- DA COSTA SM, CECHINEL M, BANDEIRA V, ZANNUNCIO JC, LAINSON R, RANGEL EF. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil-mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102:149-53.
- DANTAS-TORRES F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101:117–118, 2006.
- DANTAS-TORRES, F., DE BRITO, M. & BRANDÃO-FILHO, S. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), 54-60, 2006.
- DASZAK P, CUNNINGHAM AA, HYATT AD, 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife – Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287: 443-448.
- DASZAK P, CUNNINGHAM AA, HYATT AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop*. 78: 103-116. 2001.

- DEANE, L.M., DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 4, 198–212, 1962.
- DEEM SL, KILBOURN AM, WOLFE ND, COOK RA, KARESH WB. Conservation Medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916: 370-377. 2000.
- DESJEUX P. Global Control and *Leishmania* HIV Co-Infection. *Clin Dermat* 17: 317-325. 1999
- DEGRAVE W, FERNANDES O, CAMPEBELL D, BOZZA M, LOPES U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89:463-469. 1994.
- DEGRAVE W, FRAGOSO SP, BRITTO C, VAN HEUVERSWYN H, KIDANE GZ, CARDOSO MA, MUELLER RU, SIMPSON L, MOREL CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* Jan 1;27(1):63-70. 1988.
- DE LA CRUZ VF, NECKELMANN N, SIMPSON L. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *The Journal of Biological Chemistry* Dec 25;259(24):15136-47. 1984.
- EDGAR, R. MUSCLE: multiple sequence alignment with accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research, Oxford*, 35(5)1792 – 1797, 2004.
- ENGLUND P T. The molecular biology of Trypanosomes. *Ann. Ver. Biochem.* 51: 695-726. 1982
- EL TAI, N.O., OSMAN, O.F., EL FARI, M., PRESBER, W., SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 94, 575–579.2000.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8: 175-185, 1998.
- FAUST, E.C.; RUSSEL, P.F. & JUNG, R.C. Craig & Faust (ed.) *Parasitologia Clínica*. Ed. Salvat S.A. México 888p. 1974.
- FAYER R. Global change and emerging infectious diseases. *Journal of Parasitology*. 86: 1174-1181. 2000.
- FEITOSA MAC, CASTELLÓN EG. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amazônica*; 34:121-7. 2004.

- FELICIANGELI, MD, RODRIGUEZ, N, BRAVO, A, ARIAS, F, GUZMAN, B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. *Medical and Veterinary Entomology* -, 8(4):317-24,1991.
- FELICIANGELI MD. Ecology of sandflies (Diptera: *Psychodidae*) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. I. Description of the study area, catching methods and species composition. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 82 (1): 119 – 124, 1988.
- FERREIRA, AL, SESSA, PA, VAREJAO, JB, FALQUETO, A. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the State of Espirito Santo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96:1061-1067, 2001.
- FERNANDEZ R, GALATI EB, CARBAJAL F, WOOSTER MT, WATTS DM. Notes on the phlebotomine sand flies from the Peruvian southeast–I. Description of *Lutzomyia (Helcocyrtomyia) adamsi* n. sp. (Diptera: Psychodidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 41–44, 1998.
- FERNANDES O, BOZZA M, PASCALE JM, DE MIRANDA AB, LOPES UG, DEGRAVE WM, An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. May-Jun;91(3):279-84. 1996.
- FERNANDES O, MURTHY VK, KURATH U, DEGRAVE WM, CAMPBELL DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Aug;66(2):261-71. 1994.
- FORATTINI OP. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 10: 31-43. 1976.
- FORATTINI O. *Entomologia Médica São Paulo*: Edgard Blucher, Universidade de São Paulo, v. 4. 1973.
- FORATTINI OP. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2: 195-200, 1960.
- FORATTINI OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo*. 7: 158-167, 1953.
- FRAGA J., MONTALVO A.M, DONCKER S., JEAN- CLAUDE D., AUWERA G.V. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 238–245, 2010.
- FRAIHA H. A new species of *Psychodopygus* Mangabeira (Díptera: Psychodidae) from the Transamazônica highway, Pará State, Brazil. *Bulletin Entomological Research*, 64: 209-212. 1974.

- FRAIHA H, SHAW J J & LAINSON R. Phlebotominae Brasileiros II. *Psychodopygus wellcomei*, nova espécie antropófila de flebótomo do grupo *squamiventris*, do sul do estado do Pará, Brasil (Díptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 69: 489-500. 1971.
- FRANCINO O, ALTET L, SÁNCHEZ-ROBERT E, RODRIGUEZ A, SOLANO-GALLEGO L, ALBEROLA J, FERRER L, SÁNCHEZ A, ROURA X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 30;137(3-4):214-21, 2006.
- FU G, PERONA-WRIGHT G, BARKER DC. *Leishmania braziliensis*: characterization of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology* 90: 236-243, 1998.
- FUZARI A.A.R. ‘Estudo da Fauna Flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil’ [dissertação de mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, rio de Janeiro – RJ. 2011.
- GALATI, EAB. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. *In*: RANGEL, E.F. & LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 53:176, 2003.
- GALATI EA, NUNES VL, DORVAL ME, OSHIRO ET, CRISTALDO G, ESPÍNDOLA MA, DA ROCHA HC, GARCIA WB. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista de Saúde Pública*; 30(2):115-28, 1996.
- GALATI, EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir Malariol Saneam Amb* 35 (Supl. 1): 133-142. 1995.
- GONÇALVES MD, RYAN L, LAINSON R, SHAW JJ. The retained capacity of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) to transmit *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas) after eight years (64 generations) in a closed laboratory colony. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.;80(3):337-8 9, 1985.
- GONTIJO B. & CARVALHO M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36:1. 2003.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8:195-202, 1998.
- GOSSAGE SM, ROGERS ME, BATES PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology* 33: 1027–1034. 2003.

- GRIMALDI G JR, MOMEN H, NAIFF RD, MCMAHON-PRATT D, BARRET TV. Characterization and classification of *leishmanial* parasites from human, wild mammals and sandflies in the Amazon region of Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 645-661,1991.
- GRIMALDI G JR, TESH RB & MCMAHON-PRATT D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 6 41, 687–725.1989.
- HUANG AND MADAN. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9(9):868-877 ,1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – Web  
<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ac> data de acesso 17.10.2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – Dados do Censo 2010 publicados no Diário Oficial da União do dia 04/11/2010 -  
[http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados\\_divulgados/index.php?uf=12](http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php?uf=12)
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006; CPI dos limites do Estado do Acre, 2006.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22(9), 439-445, 2006.
- KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology* 17: 279–289, 1999.
- KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to from infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*;65 suppl 1:37-42. Review, 1990.
- KILLICK-KENDRICK R, LAINSON R, RIOUX J, SAF´JANOVA W. *The taxonomy of Leishmania-like parasites of reptiles*. Em: *Leishmania*. Em: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Editor: J Rioux. IMEEE, Montpellier, pp. 143-148. 1986.
- KRUSE H, KIRKEMO A, HANDELAND K. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases journal* 10(12): 2067-2072. 2004.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 569-596, 1983.
- LAINSON, R., RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 811–827 (2005).
- LAINSON R, SHAW JJ. New World *Leishmaniasis* – the neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D (org.). *Topley and Wilson’s Microbiology and Microbial Infections*. London: Arnold; 2005. p. 313-49.

- LAINSON R, SHAW JJ. *New World Leishmaniasis- The neotropical Leishmania species*. In Microbiology Infections. Ed. Topley & Wilson 9<sup>th</sup> Edition, chapter 13, p., 241- 266. 1998.
- LAINSON R, SHAW JJ, SILVEIRA FT, SOUSA AAA, BRAGA RR & ISHIKAWA EAY. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 435–443. 1994.
- LAINSON R & SHAW JJ. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonia, Brazil. *J Braz Ass Adv Sci* 94: 94-106. 1992.
- LAINSON R., SHAW JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Ann Parasitology Human Comp.**;64(1):3-9, 1989.
- LAINSON R. & SHAW J. J. 1987 Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Biology and Epidemiology*. London: Academic Press. v. 1, p. 1-120, 1987.
- LAINSON, R. SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. Lumsden WHR & Evans D. *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, v. 1, p. 1-120, 1979.
- LAINSON R, SHAW JJ, WARD RD, READY PD, NAIFF RD. Leishmaniasis in Brazil. XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará state. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 3: 239-42, 1979.
- LAINSON R, RANGEL EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 811-827, 2005.
- LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. *British Medical Bulletin* 28: 44-48. 1972.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil: 1. Observation on enzootic rodent leishmaniasis - incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62(3): 396-405, 1968.
- LAWYER PG, YOUNG DG, BUTLER JF, AKIN DE. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 24: 347–355. 1987.
- LEWIS, D.J., YOUNG, D.G., FAIRCHILD, G.B., MINTER, D.M. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology* 2, 319–332, 1977.

- LIMA AP, MINELLI L, TEODORO U, COMUNELLO E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. *An Bras Dermatol*; 77: 681 – 692, 2002.
- LINS, RM, OLIVEIRA, SG, SOUZA, NA, DE QUEIROZ, RG, JUSTINIANO, SC, WARD, RD, KYRIACOU, CP, PEIXOTO, AA. Molecular evolution of the *cacophony* IVS6 region in sandflies. *Insect Molecular Biology*, 11 (2): 117- 22, 2002.
- LUYO-ACERO, G.E., UEZATO, H., OSHIRO, M., TAKEI, K., KARIYA, K., KATAKURA, K., GOMEZ- LANDIRES, E., HASHIGUCHI, Y., NONAKA, S.; Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* 128, 483–491, 2004.
- LUZ E, MEMBRIVE N, CASTRO EA, DEREURE J, PRATLONG F, DEDET JA, PANDEY A, THOMAZ-SOCCOL V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 94(6):623-319, 2000.
- MARTINS AV, SILVA JE. Notas sobre os flebotomíneos do Estado do Acre, com a descrição de duas espécies novas (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia* 24: 127-138. 1964.
- MARZOCHI, M. C. A; MARZOCHI K. B. ‘Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. Rio de Janeiro’. *Cadernos de Saúde Pública*, n 10 (supl. 2), pp. 359-75. 1994.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*. 41 (5): 61-84. 1981.
- MAUEL J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology*.;38:1-51. Review. 1996.
- MAYER JD. Geography, ecology and emerging infectious diseases. *Social Science & Medicine*. 50:937-952. 2000
- MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M.V.; DIAS, M. & MARTINS, A.V. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 73:123-137, 1979.
- MICHALSKY, EM, FORTES-DIAS, CL, PIMENTA, PF, SECUNDINO, NF, DIAS, ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania spp* in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(5):255-9, 2002.



- MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Brasília, DF. 2007
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Brasília, DF. 2006.
- MINISTERIO DA SAUDE/ Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasília, DF. 2006
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Leishmaniose Tegumentar Americana, Distribuição de casos confirmados por Unidade Federada, Brasil 1980-2005. <http://www.portal.saude.gov.br/portal/SVS> [Acessado em 25/05/2006].
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar americana - Distribuição de casos confirmados por Unidade Federada 2006. Brasil, 1980 – 2005. Disponível em <http://www.saude.gov.br>
- MIRANDA JC, REIS E, SCHRIEFER A, GONCALVES M, REIS MG, CARVALHO L, FERNANDESO, BARRAL-NETTO M, BARRAL A. Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Mar;97(2):185-8. 2002.
- MOLYNEUX DH, KILLICK-KENDRICK R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters W, Killick-Kendrick R. eds. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London. Academic Press, 121-176. 1987.
- NEIVA, ARTHUR. Leishmaniasis tegumentaria americana.. Primera Conferencia de la Sociedad Sudamericana de Higiene, Microbiologia y Patologia. Buenos Aires, pp. 311-73. 1917.
- NICOLAS L, MILON G, PRINA E: Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. Jornal Microbiol Methods, 51(suppl 3):295-299, 2002.
- NOYES HA, ARANA BA, CHANCE ML, MAINGON R. The *Leishmania* hertigi(Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. Journal of Eukaryotic Microbiology. Sep-Oct: 44 (5):511-7. 1997.
- ORLANDO, T.C., RUBIO, M.A., STURM, N.R., CAMPBELL, D.A., FLOETER-WINTER, L.M. Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97, 695–701,2002.

- PAIVA, B. R, SECUNDINO N.F.C, PIMENTA P.F.P., GALATI E.A.B., ANDRADE JUNIOR H.F., MALAFRONTA R.S. Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, p. 87-94, 2007.
- PAIVA B.R., SECUNDINO N.F.C, NASCIMENTO J.C., PIMENTA P.F.P., GALATI E.A.B., ANDRADE JUNIOR H.F., MALAFRONTA R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Tropica 99, 252–259, 2006.
- PASSOS VM, LASMAR EB, GONTIJO CM, FERNANDES O, DEGRAVE W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania*(*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Jan-Feb;91(1):19-20. 1996.
- PEARSON R D, SOUZA A Q. Clinical Spectrum of *Leishmania*. Clinical Infectious Diseases 22: 1-13. 1996.
- PENNA,H.A. Leishmaniose Visceral no Brasil. Brasil Médico,18: 940-950. 1934.
- PEREZ, J. E. et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) peruviana from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 102(5): 655-658, 2007.
- PEREZ JE, OGUSUKU E, INGA R, LOPEZ M, MONJE J, PAZ L, NIETO E, AREVALO J, GUERRA H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Mar-Apr;88(2):161-4. 1994.
- PESSÔA SM. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
- PITA-PEREIRA D, LINS R, OLIVEIRA MP , LIMA RB, PEREIRA BAS, MOREIRA OC, BRAZIL RP AND BRITTO C . SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases Parasites & Vectors 5:15, 2012.
- PITA-PEREIRA D.; SOUZA, G. D.; PEREIRA T.A , ZWETSCH, A.; BRITTO , C.; & RANGEL, E. F. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. Acta Tropica 2011 Dec;120(3):273-5. Epub Sep 16, 2011.
- PITA -PEREIRA, D.; SOUZA, G. D.; ZWETSCH, A.; ALVES C. R.;BRITTO , C. & RANGEL, E. F. 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 PCR assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 80(4): 593-595. 2009.

PITA-PEREIRA D, CARDOSO MAB, ALVES CR, BRAZIL RP, BRITTO C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* using PCR multiplex assay in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. Acta Tropica Jul;107(1):66-9. Epub 2008 Apr 25, 2008.

PITA-PEREIRA D. 'Avaliação de infecção natural de Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. empregando ensaios de PCR multiplex e PCR em tempo real' [Tese de Doutorado]. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ. 2010.

PITA-PEREIRA D, ALVES CR, SOUZA MB, BRAZIL RP, BERTHO A, BARBOSA A, BRITTO C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 99: 905 – 913, 2005.

PITA-PEREIRA D. 'Implementação da PCR multiplex associada à hibridização não-radioativa na detecção de DNA de *Leishmania* subgênero *Viannia* em flebotomos vetores das leishmanioses.' [Tese de mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ. 2004.

POLI, A., ABRAMO, F., BARSOTTI, P., LEVA, S., GRAMICCIA, M., LUDOVISI, A. & MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania*. Veterinary Parasitology, 106, 181–191, 2002.

PUGEDO H, BARATA RA, FRANÇA-SILVA JC, SILVA JC, Dias ES. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38(1):70-72, jan-fev, 2005.

QUEIROZ, R.G., VASCONCELOS, I.A., VASCONCELOS, A.W., PESSOA, F.A., SOUZA, R.N., DAVID, J.R. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 50, 693–698, 1994.

QUISPE-TINTAYA KW, LAURENT T, DECUYPERE S, HIDE M, BANULS AL, DONCKER SD, RIJAL S, CANAVATE C, CAMPINO L, DUJARDIN JC: Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. The Journal of Infectious Diseases, 192:685-691, 2005.

RABELLO, EDUARDO. Contribuição ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil I. História e sinonímia. Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia, 1: 3-29, 1925.

- RANGEL, E.F. & LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. *In: \_\_\_\_\_*. (Org).  
Flebotomíneos do Brasil, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro 291-336, 2003
- RANGEL EF, LAINSON R, SOUZA AA, READY P, AZEVEDO ACR. Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 91: 43-50, 1996.
- RANGEL, EF, SOUZA, NA, WERMELINGER, ED, AZEVEDO, CRA, BARBOSA, AF, ANDRADE, CATAL. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 347-349, 1986.
- RANQUE P. Études morphologiques et biologiques de quelques Trypanosomides récoltes au Senegal. Tese para obtenção de grau de Doutor na Universidade de Aix- Marseilles, France. Apud Lainson R. & Shaw JJ. 1973.
- RASSI Y, DEHKORDI AS, OSHAGHI MA, ABAI MR, MOHTARAMI F, ENAYATI A, ZAREI Z, JAVADIAN E. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in northwestern Iran. *Experimental Parasitology* 131: 344–349, 2012.
- RAY D S. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*. 9: 1365-1367.1989.
- READY PD, LAINSON R, SHAW JJ. The ecology of *Lutzomyia umbratillis* Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae) the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* northeast amazonian in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*; 76: 21-40, 1986.
- RIBEIRO, J.M.C; VACHEREAU, A. & MODI, G.B. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Science*, 243: 212 – 214, 1989.
- RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E, PRATLONG F, BASTIEN P, PERIERES J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasit Hum Comp* 65: 111-125. 1990.
- ROCHA MN., MARGONARI C., PRESOT MI., SOARES RP / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 68 (2010) 401–409
- ROGERS ME, CHANCE ML, BATES PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol* 124: 495–507. 2002.
- RODRIGUES EHG. ‘Validação de abordagem molecular para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco.’ Recife. [Dissertação de Mestrado]. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. Pernambuco. 2000.

- RODRIGUEZ N, GUZMAN B, RODAS A, TAKIFF H, BLOOM B R, CONVIT J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept., 2246-2252. 1994
- ROSS R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal*. 11: 1261. 1903.
- RYAN, KA. Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology* -, 42: 339-358., 1988.
- RYAN, L., BRAZIL, R.P. Leishmania infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) on the Island of São Luis, Maranhão State, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 79, 383–384, 1984.
- SAF’JANOVA, V.M.,. Classification of the genus *Leishmania*. In *Leishmaniasis. Protozoology*, part 7, p. 200, Ross, ed. Leningrad: Academy of Science, U.S.S.R. all Union Society of Protozoologies, 95-101, 1982.
- SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A. & MARZOCHI, M.C.A. In XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e II Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, João Pessoa - PB. 1978.
- SALIBA EK, OUMEISH OY. Reservoir host of cutaneous Leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 17: 275-279. 1999.
- SALIBA EK, HIGASHI GI, YATES JA. Cutaneous leishmaniasis in Jordan: Biochemical identification of human and *Psammomys obesus* isolates as *Leishmania major*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 82: 21-25. 1988.
- SALOMÓN OD, QUINTANA MG, BEZZI G, MORÁN ML, BETBEDER E, VALDÉZ DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Tropica*, 2010 Jan;113(1):84-7.
- SANTOS, S.O., ARIAS, J.R., RIBEIRO, A.A., HOFFMANN, M.P., FREITAS, R.A., MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*. 12: 315–317 ,1998.
- SCHÖNIAN G, MAURICIO I, CUPOLILLO E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? doi:10.1016/j.pt.2010.06.013 *Trends in Parasitology* 26:466–469, 2010
- SCHLEIN Y, JACOBSON RL, MESSER G. Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Oct 15;89(20):9944-8. 1992.
- SCHNEIDER P, FERGUSON MA, MCCONVILLE MJ, MEHLERT A, HOMANS SW, BORDIER C. Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania major* promastigote surface protease. *The Journal of Biological Chemistry*. Oct 5;265(28):16955-64. 1990.

- SCHULZ A, MELLENTHIN K, SCHÖNIAN G, FLEISCHER B, DROSTEN C: Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41(suppl 4):1529-1535, 2003.
- SHAPIRO T.A., ENGLUND P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, 49:117-143. 1995.
- SHAW, JJ. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present e Future Trends and Their Implications. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 471-478, 1994.
- SHAW JJ, ISHIKAWA EA, LAINSON R, BRAGA RR, SILVEIRA FT. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania* (*Viannia*) shawi Lainson, de Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira in Pará State, Brazil. *Ann de Parasitol Hum Comp*; 66: 243-6,1991.
- SILVA-NUNES M, CAVASINI CE, SILVA NS, GALATI EAB. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotômíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 11: 241-251. 2008.
- SILVA NS & MUNIZ VD Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 25(6):1325-1336, jun, 2009
- SILVA O.S, GRUNEWALD J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Sep-Oct;94(5):579-82. 1999.
- SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A., De SOUZA, A.A., LAINSON R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Para State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) lindenbergi n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*; 9,43-50, 2002.
- SILVEIRA FT, Lainson R, Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, Souza AAA, Silva BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: Editora CEJUP; 1997.
- SIMPSON L, SHAW JJ. RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell* 57: 355-66. 1989.
- SIMPSON L. The mitochondrial genome of Kinetoplastida: transcription, replication and evolution. *Annual Review of Microbiology* 41: 363-382. 1987.
- SIMPSON L, SIMPSON AG. Kinetoplast RNA of *Leishmania tarentolae*. *Cell*. May;14(1):169-78. 1978.

SISTEMA INTEGRADO DE PROTOCOLO E ARQUIVO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE – Registro Número: 25000 184. 116/ 2011 – 84 Nota técnica Nº 52/ 2011- / CGDT/DEVIT/SVS/MS.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA E SAÚDE/ MINISTÉRIO DA SAÚDE – Casos de LTA - atualizado em 23/08/11 - acessado em 18/07/2012  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta\\_casos08\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf)

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA E SAÚDE/ MINISTÉRIO DA SAÚDE – Casos de LVA - atualizado em 23/08/11 - acessado em 18/07/2012  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf)

SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE: Relatório de situação : Acre/ ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em Saúde. – Brasília: ministério da Saúde, 2005.

SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE: Relatório de situação : Acre/ ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em Saúde. – Brasília: ministério da Saúde, 2007.

SOUZA – ROCHA L., SANTOS CB, FALQUETO A, GRIMALDI GJ., CUPOLILLO E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and Leishmania from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. *Parasitology Research* 107:465–468, 2010

SPEAR JR. Conservation Medicine: the changing view of biodiversity. *Biological Conservation* 14:1913-1917. 2000.

STRELKOVA MW, ELISEEV LN, PONIROVSKII EN. The isoenzyme dentification of Leishmania isolates taken from greater gerbils, sandflies and human patients in foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkmenistan. *Med Parasitol* 5: 34-37. 1993.

SUTHERST RW. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *International Journal for Parasitology* 31: 933-948. 2001.

STURM N R & SIMPSON L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* 61: 879-884. 1990.

TALMI-FRANK D, NASEREDDIN A, SCHNUR LF, SCHÖNIAN G, TÖZ SO, JAFFE CL, BANETH G: Detection and identification of Old World Leishmania by high resolution melt analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4:e581, 2010.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739, 2011.

- TAVARES CA, FERNANDES AP, MELO MN: Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert Review of Molecular Diagnostics 2003, 3:657-667.
- THOMAZ-SOCCOL V, LANOTTE G, RIOUX JA, PRATLONG F, MARTINI-DUMAS A, SERRES E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée; 68: 104 – 106, 1993.
- THOMAZ-SOCCOL V., LANOTTE G., RIOUX J.A., PRATLONG F., MARTINIDUMAS A., SERRES E. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, v.68, n.2, p. 104-106, 1993a.
- THOMAZ-SOCCOL V, LANOTTE G, RIOUX JA, PRATLONG F, MARTINI-DUMAS A, SERRES E 1993. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 68: 107-108. 1993.
- TOJAL AC, CUPOLILLO E, VOLPINI AC, ALMEIDA R, ROMERO GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, State of Acre, Brazil. Tropical Medicine & International Health. 2006 Sep;11(9):1388-98.
- TOJAL AC, ROMERO GAS, CUPOLILLO EA. A diversidade das espécies causadoras de leishmaniose cutânea em Rio Branco - Acre.Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36 (Supl. I): 49. 2003.
- VALDIVIA. H.O, DE LOS SANTOS M.B, FERNANDEZ, R.G. BALDEVIANO C., ZORRILLA V.O, VERA H., LUCAS C.M, EDGEL K.A, LESCANO A.G, MUNDAL K.D, AND GRAF P.C.F. Natural *Leishmania* Infection of *Lutzomyia* *auraensis* in Madre de Dios, Peru, Detected by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time Polymerase Chain Reaction. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 87(3): 511–517, 2012.
- VALE ECS, FURTADO T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. An Bras Dermatol. 80(4):421-8, 2005.
- VERGEL C., WALKER J, AND. SARAVIA NG Amplification Of Human DNA By Primers Targeted To *Leishmania* Kinetoplast DNA And Post-Genome Considerations In The Detection Of Parasites By a Polymerase Chain Reaction. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 72(4): 423–429, 2005.
- VIANA G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). Bras. Méd.,25: 411. 1911.
- VIRCHOW, RUDOLF .Sobre las cerámicas antropomorfas de los antiguos peruanos. Sesión extraordinaria por el jubileo del prof. Georges Lewin del 22 de nov. de 1895'. Sociedad de Dermatología de Berlin.1895.



- VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C. & ROMANHA, A.J. - PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous Leishmaniasis. *Acta tropica*. (Basel), 90: 31-37, 2004.
- WALTERS LL, MODI GB, CHAPLIN GL, TESH RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41: 295–317. 1989.
- WARD RD, FRAIHA H 1977. *Lutzomyia umbratilis*, a new species of sand fly from Brazil (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 14: 313-317.
- WARD RD, LAINSON R, SHAW JJ. Further evidence of the role of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 608-609, 1973.
- WILSON R, BATES MD, DOSTALOVA A, JECNA L, DILLON RJ, Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Comparative Binding Assay. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4(9): e816. 2010.
- WORTMANN G, HOCHBERG L, HOUNG HH, SWEENEY C, ZAPOR M, ARONSON N, WEINA P, OCKENHOUSE CF: Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hy The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(suppl 6):999-1004,2005.
- WORTMANN G, HOCHBERG LP, ARANA BA, RIZZO NR, ARANA F, RYAN JR: Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Guatemala using a real-time polymerase chain reaction assay and the smartcycler. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(suppl 5):906-908, 2007
- WRIGHT J.H. Protozoa in a case of tropical ulcer (“Delhi sore”). *The Journal of International Medical Research*. 10: 472–482, 1903.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.(Technical report series ; no. 975), 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – Leishmaniasis – Forms of Leishmaniasis [<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>], 2011
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rapport sur la Santé dans le Monde - 1998. Technical Report Series 59-103.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1990. Control of leishmaniasis. Report a WHO Expert Committee. Geneva. World Health Organization. WHO Technical Report Series, 793.

- YOUNG DG & DUCAN N A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomya* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst 54: 1-881. 1994.
- YOUNG, D.G & FAIRCHILD, G.B., Studies of Phlebotomine sand flies. Gainesville: department of Entomologu and Nematology, University of Florida – 151p., 1974.
- ZELAZNY, A.M., FEDORKO, D.P., LI, L., NEVA, F.A., FISHER, S.H.; Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72, 415–420, 2005.
- ZILBERSTEIN D, DWYERD M. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. Biochemical Journal Nov 15;256(1):13-21, 1988.