

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

**Leishmaniose Tegumentar Americana em Governador Valadares (Minas
Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores**

por

Fabiana de Oliveira Lara e Silva

**Belo Horizonte
Fevereiro/ 2011**

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

Leishmaniose Tegumentar Americana em Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores

por

Fabiana de Oliveira Lara e Silva

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração de Doenças
Infecciosas e Parasitárias.**

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias

Co-orientação: Dr. Ricardo Andrade Barata

**Belo Horizonte
Fevereiro/ 2011**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S586l

2010

Silva, Fabiana de Oliveira Lara e.

Leishmaniose Tegumentar Americana em Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores / Fabiana de Oliveira Lara e Silva. – Belo Horizonte, 2010.

xix, 106 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 102 - 125

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Cutânea/epidemiologia 2.
Leishmania/parasitologia 3.
Psychodidae/parasitologia 4. Reservatórios de
doenças/parasitologia I. Título. II. Dias, Edelberto
Santos (Orientação). III. Barata, Ricardo Andrade
(Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

Leishmaniose Tegumentar Americana em Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores

por

Fabiana de Oliveira Lara e Silva

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Edelberto Santos Dias (Presidente)

Dra. Nágila Francinete Costa Secundino

Dr. José Carlos Miranda

Suplente: Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza

Dissertação defendida e aprovada em: 22/02/2011

Suporte Financeiro

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG-nº EDT-0329-0.00-07)
Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES V-nº 403563/2008-9)
FIOCRUZ/CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita."

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho à memória de minha mãe, Cláudia

Agradecimentos

A Deus, pela vida, por colocar pessoas especiais à minha volta, iluminar sempre meu caminho e me dar forças para superar e alcançar meus objetivos.

A minha mãe querida, que sempre esteve comigo, torcendo, junto, desde o começo desta caminhada, e mesmo sem a presença física em parte dela, você é a minha luz e me ajuda muito quando eu penso não ter forças para seguir em frente, guiando meus passos sempre para o caminho certo. “Vou reaprendendo ser sem ter você, descobrindo em mim o que você deixou...”

Ao meu “pupi”, meu maior incentivador, obrigada pelo apoio, torcida e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, vibrando comigo a cada conquista! Obrigada por me ensinar tantas coisas, principalmente a ser bondosa com as pessoas e com os animais. Você é um exemplo para mim!

Ao meu irmão, por ser tão presente, por saber me ouvir e ter sempre a palavra certa na hora certa, pelos momentos de cumplicidade e risos. Você é o meu amigo para todas as horas!

Aos meus avós, meus exemplos de vida, por serem meu pilar, a vocês devo grande parte do que sou. Não tenho palavras para demonstrar o meu amor, então apenas agradeço por existirem, por me amarem e por dedicarem grande parte de suas vidas à minha formação.

Ao meu Léo, pelo amor, dedicação, carinho, compreensão e acima de tudo, companheirismo. Por ser tão presente na minha vida, compartilhando todos os momentos de alegria, e também os de desânimo, me ajudando a superá-los e caminhando sempre comigo, me motivando e me ensinando a ser uma pessoa melhor a cada dia. E é claro... pelo grande apoio computacional! Te amo muito!!!

A toda minha família, pela motivação, união, pelo amor e carinho nos momentos difíceis. Vocês são tudo para mim. À Tia Nonon, pelo exemplo de pessoa e profissional, obrigada pelo amor e por ser quem você é!

Ao Edelberto, por ter me aceitado no laboratório, pela confiança depositada em mim, pela boa vontade em me ajudar sempre e por ser compreensivo, entendendo alguns

momentos difíceis que passei durante este processo, sempre me motivando e me colocando para cima! Muito obrigada!

À Érika, pela ajuda em todos os momentos, principalmente com as técnicas de biologia molecular. Pela amizade e estímulo, acreditando em mim e me mostrando que vale a pena correr atrás dos meus sonhos.

Ao Ricardo, pelas conversas, conselhos, incentivos, pela sinceridade e por, mesmo no final do processo, distante, ter me auxiliado tanto.

Ao Du, pela colaboração e auxílio nas técnicas de biologia molecular, pela paciência e boa vontade em ajudar sempre que precisei. Muito obrigada.

Aos queridos amigos do LALEI: Karina, pela alegria, pelas conversas, desabafos, ajuda e amizade; Ailton, pela ajuda e pelas constantes risadas; Gustavo, pelo estímulo e incentivo desde que iniciei no laboratório; Tina, pelo carinho e por ser tão alto-astral, Shara, por ser tão apaziguadora, por ter sempre uma palavra de auxílio e pelos conselhos; Lisiane, pelo bom-humor mesmo quando as coisas parecem não estar tão bem; Josi pelo jeitinho meigo e carinhoso; Pollyanna pela ajuda e boa vontade; Lu por ser tão prestativa; Célia, pelo estímulo; Paty e Eloiza, pela boa convivência; Jana, pela alegria contagiante; Cris, pela motivação e alto-astral; Helbert, pela ajuda nas coletas de campo; Fernandinha, pela troca de experiências e convivência tão agradável; Rafael, por estar sempre disposto a ajudar; Felipe e Raquel, pela presença sempre agradável; Laura, Agnes, Débora e Ana Clara, pela boa vontade e carinho; Roberta, Marcela e Daniela, pela ajuda e convivência.

Aos demais amigos e contatos que fiz no CPqRR e que contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os responsáveis da Secretaria de Saúde de Governador Valadares, pelo apoio e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho, em especial à Aimara, que nos recebeu de prontidão para a realização do projeto no município e pela ajuda, tanto nas coletas de campo como no processamento do material.

Aos moradores das residências de estudo em Governador Valadares, por nos receberem bem e entenderem a importância deste trabalho para a promoção da saúde e bem-estar da população.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 AS LEISHMANIOSES	20
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	26
3.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	30
3.3 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO	31
3.4 OS VETORES	32
3.5 HÁBITOS ALIMENTARES	34
3.6 MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE REPASTO SANGUÍNEO.....	35
3.7 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS CLIMÁTICAS SOBRE OS FLEBOTOMÍNEOS	37
3.8 OS RESERVATÓRIOS	38
3.9 A UTILIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> SPP.	40
3.9.1 <i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	43
4.2 ESTUDO DE FLEBOTOMÍNEOS	45
4.2.1 <i>Captura de flebotomíneos</i>	45
4.2.2 <i>Preparação, montagem e identificação dos espécimes</i>	47
4.2.3 <i>Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos</i>	49
4.2.4 <i>Identificação do repasto sanguíneo de flebotomíneos através da reação de precipitina</i>	49
4.3 DETECÇÃO DE DNA DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. EM FLEBOTOMÍNEOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR.....	49
4.3.1 <i>Extração de DNA de Leishmania</i>	49
4.3.2 <i>PCR de gene constitutivo específico de flebotomíneo (cacofonia)</i>	50
4.3.3 <i>Nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de Leishmania</i> ..	51
4.3.4 <i>Análise dos produtos amplificados</i>	52
4.3.5 <i>Sequenciamento para a identificação da espécie de Leishmania spp.</i>	53
4.3.6 <i>Cálculo da taxa mínima de infecção natural</i>	53
4.4 ESTUDO DOS HOSPEDEIROS SINANTRÓPICOS E SILVESTRES.....	54
4.4.1 <i>Captura de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais)</i>	54

4.4.2	<i>Identificação dos animais</i>	54
4.4.3	<i>Detecção de DNA de Leishmania spp. a partir de amostras biológicas</i>	55
4.4.3.1	Coleta das amostras.....	55
4.4.3.2	Extração de DNA de sangue e tecido.....	55
4.4.3.3	PCR de gene constitutivo específico de mamíferos (IRBP).....	55
4.4.3.4	Nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de Leishmania.....	56
4.4.3.5	Sequenciamento para identificação da espécie de Leishmania spp.	56
5	RESULTADOS	57
5.1	FLEBOTOMÍNEOS.....	57
5.1.1	<i>Fauna</i>	57
5.1.2	<i>Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos</i>	59
5.1.3	<i>Identificação do repasto sanguíneo de flebotomíneos</i>	62
5.2	ESTUDO DE PEQUENOS MAMÍFEROS	64
5.2.1	<i>Fauna</i>	64
5.2.2	<i>Diagnóstico parasitológico direto em lâminas</i>	66
5.3	DETECÇÃO DE DNA DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. EM FLEBOTOMÍNEOS E PEQUENOS MAMÍFEROS	66
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	81
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
9	ANEXOS	83
9.1	ANEXO 1: AUTORIZAÇÃO DO IBAMA PARA REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA.	83
9.2	ANEXO 2: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA DE FLEBOTOMÍNEOS E ROEDORES	87
9.3	ANEXO 3: ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL	89
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Leishmaniose visceral	23
FIGURA 2: Leishmaniose cutâneo-mucosa	24
FIGURA 3: Leishmaniose cutânea difusa	24
FIGURA 4: Leishmaniose cutânea.....	24
FIGURA 5: Macho de flebotômíneo	34
FIGURA 6: Fêmea de flebotômíneo.....	34
FIGURA 7: Mapa do Município de Governador Valadares (MG), mostrando a distribuição de bairros.....	44
FIGURA 8: Armadilha luminosa tipo HP	46
FIGURA 9: Pontos de captura de flebotômíneos e roedores, georreferenciados, no município de Governador Valadares, MG. 1 e 2: Village da Serra; 3 e 4: Elvamar; 5 e 6: Vila Parque Ibituruna; 7 e 8: Vila Isa.....	46
FIGURA 10: Exemplos de locais escolhidos para as capturas de flebotômíneos e roedores no período de janeiro a dezembro de 2008 no município de Governador Valadares, MG.....	47
FIGURA 11: Principais estruturas morfológicas utilizadas na identificação de machos e fêmeas de flebotômíneos.....	48
FIGURA 12: Desenho esquemático do resultado da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de <i>Leishmania</i>	51
FIGURA 13: Armadilha tipo Tomahawk.....	54
FIGURA 14: Comportamento de flebotômíneos capturados no município de Governador Valadares, no período de janeiro a dezembro de 2008, em relação à endofilia e exofilia	58
FIGURA 15: Correlação entre o número de flebotômíneos capturados e a temperatura em Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil, de janeiro a dezembro de 2008.....	60
FIGURA 16: Correlação entre o número de flebotômíneos capturados e a umidade relativa do ar em Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil, de janeiro a dezembro de 2008.....	61

- FIGURA 17:** Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a pluviosidade em Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil, de janeiro a dezembro de 2008.61
- FIGURA 18:** Distribuição mensal de espécies vetoras de flebotomíneos em Governador Valadares, no período de janeiro a dezembro de 2008.62
- FIGURA 19:** Pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) capturados no período entre janeiro a dezembro de 2008 e janeiro e março de 2010, no município de Governador Valadares, MG. A: *Calomys* sp.; B: *Rattus norvegicus*; C: *Mus musculus*; D: *Rattus rattus*; E: *Didelphis aurita*; F: *Didelphis albiventris*.64
- FIGURA 20:** Produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos obtidos com iniciadores do gene da cacofonia IVS6 para *Lutzomyia* visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- marcador de peso molecular (100 pares de base). 1 a 17- Amostras de DNA de flebotomíneos. CP- Controle positivo da Reação (*L. longipalpis*). CN- Controle negativo da reação (sem DNA).67
- FIGURA 21:** Produtos de amplificação de DNA de roedores, constatando a presença da proteína IRBP, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: PM- peso molecular 100 pb. 1 a 12: Amostras de fígado, baço, pele de cauda e pele de orelha dos animais 1,2 e 3. 13 a 21- Amostras dos mesmos tecidos dos animais 4 e 5 e pele de orelha do animal 6. 22- Amostra de sangue de *Rattus norvegicus* (positiva para *Leishmania* spp.) CP- Controle positivo (DNA extraído de cão). CN- Controle negativo; pb- pares de base.67
- FIGURA 22:** Produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos e roedores obtidos com iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb) visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: PM- peso molecular Φ x 174 pb. 5 e 9- Amostras positivas de DNA de *L. longipalpis*. 17- Amostra positiva extraída de sangue de *Rattus norvegicus*. CN- Controle negativo (sem DNA). CP- Controle positivo: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/74/M2930). pb: pares de base.68

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Protocolo de preparação de flebotomíneos para montagem e identificação de machos e fêmeas, segundo normas preconizadas pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou.....47
- TABELA 2:** Flebotomíneos capturados em armadilha tipo HP segundo espécie, ambiente e sexo, no período de janeiro a dezembro de 2008 no município de Governador Valadares, MG.....58
- TABELA 3:** Número mensal de flebotomíneos capturados com armadilha luminosa HP, segundo bairros e sexo no município de Governador Valadares, de janeiro a dezembro de 2008.....59
- TABELA 4:** Espécies de flebotomíneos capturadas com armadilha luminosa tipo HP, nos meses de março/abril/maio/outubro/novembro e dezembro de 2009 e janeiro/fevereiro e março de 2010 (fêmeas capturadas, número de “pools” e número de “pools” positivos) no município de Governador Valadares, MG.....59
- TABELA 5:** Coeficiente de Correlação de Spearman entre o número de flebotomíneos e as variáveis climáticas (temperatura, umidade e pluviosidade), entre os meses de janeiro a dezembro de 2008.....61
- TABELA 6:** Fêmeas de flebotomíneos capturadas que se alimentaram em apenas um hospedeiro, segundo o teste de precipitina com utilização de diferentes anti-soros, no período de janeiro a dezembro de 2008 em Governador Valadares, MG.....62
- TABELA 7:** Fêmeas de flebotomíneos capturadas que se alimentaram em mais de um hospedeiro, segundo o teste de precipitina com utilização de diferentes anti-soros, no período de janeiro a dezembro de 2008 em Governador Valadares, MG.....63
- TABELA 8:** Distribuição de espécies de mamíferos capturados no município de Governador Valadares, MG durante o ano de 2008.65
- TABELA 9:** Distribuição de espécies de mamíferos capturados no município de Governador Valadares, MG nos meses de janeiro e março de 2010.65
- TABELA 10:** Distribuição de espécies de mamíferos capturados, segundo sexo e mês, capturados no município de Governador Valadares, MG durante o ano de 2008 e os meses de janeiro e março de 2010.66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- APA:** Área de Preservação Ambiental
- CN:** Controle Negativo
- CP:** Controle Positivo
- CPqRR:** Centro de Pesquisas René Rachou
- dATP:** Desoxiadenosina trifosfato
- dCTP:** Desoxicitosina trifosfato
- dGTP:** Desoxiguanina trifosfato
- DMSO:** Dimetilsufóxido
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- dTTP:** Desoxitimina trifosfato
- EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- FIOCRUZ:** Fundação Instituto Oswaldo Cruz
- GE:** General Eletric
- GRS:** Gerência Regional de Saúde
- HCl:** Ácido clorídrico
- HP:** Hoover Pugedo
- IBAMA:** Instituto Brasileiro para o meio Ambiente
- IGA:** Instituto de Geociências Aplicadas
- INMET:** Instituto Nacional de Meteorologia
- IRBP:** Interphotoreceptor retinoid-binding protein
- KCl:** Cloreto de Potássio
- kDNA:** DNA do cinetoplasto
- LC:** Leishmaniose cutânea
- LCD:** Leishmaniose cutânea difusa
- LCM:** Leishmaniose cutâneo-mucosa
- Ln-PCR:** Leishmania nested Polymerase chain reaction
- LT:** Leishmaniose Tegumentar
- LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana
- LV:** Leishmaniose Visceral
- LVA:** Leishmaniose Visceral Americana
- LVC:** Leishmaniose Visceral Canina

MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MS: Ministério da Saúde
OMS: Organização Mundial da Saúde
PB: Pares de base
PBS: Tampão Fosfato Salínico
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PM: Peso Molecular
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM: Rotações por minuto
SES: Secretaria Estadual de Saúde
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMF: Sistema Mononuclear Fagocítico
SSUrRNA: Small subunit ribosomal RNA
SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE: Tris-Borate-EDTA
UF: Unidades federadas
WHO: World Health Organization

RESUMO

No município de Governador Valadares (MG), área endêmica para leishmaniose tegumentar americana (LTA), foi realizado estudo objetivando conhecer os aspectos ecoepidemiológicos (vetores e possíveis reservatórios) envolvidos na transmissão da doença. Para o levantamento entomológico e identificação de repasto sanguíneo foram realizadas capturas de flebotomíneos nos bairros: Village da Serra, Vila Parque Ibituruna, Vila Isa e Elvamar, no período de 01 a 12/2008. O repasto foi identificado através da reação de precipitina. Para o estudo de infecção natural de flebotomíneos, foram selecionados bairros onde foram registrados casos humanos de LTA; as capturas foram feitas em meses dos anos de 2009 e 2010. Para as capturas sistemáticas e não-sistemáticas, foram utilizadas armadilhas luminosas HP, tanto no peri como no intradomicílio. A correlação entre pluviosidade, umidade relativa do ar e temperatura e o número de flebotomíneos foi realizada no ano de 2008. A captura de pequenos mamíferos para levantamento da fauna e detecção de infecção natural foi feita em meses dos anos de 2008 e 2010, utilizando 40 armadilhas em dois pontos por bairro. A detecção de DNA de *Leishmania* spp. e identificação da espécie do parasito nos flebotomíneos e em amostras de tecido e sangue de mamíferos foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA, respectivamente. Os resultados mostraram que a fauna de flebotomíneos é diversificada, com presença de 12 espécies (2 do gênero *Brumptomyia* e 10 do gênero *Lutzomyia*). Exemplos de interesse epidemiológico foram encontrados, com predominância de *Lutzomyia intermedia* (29,9%). Foram capturados 65% das espécies no peri e 35% no intradomicílio. A maioria dos flebotomíneos foram ecléticos quanto ao padrão alimentar, se alimentando preferencialmente em aves (35,8%). A análise dos fatores climáticos demonstrou correlação significativa entre pluviosidade e umidade, e o número de flebotomíneos. Foram capturados 32 exemplares de mamíferos (23 roedores e 9 marsupiais). As análises moleculares mostraram infecção natural por *Leishmania chagasi* em 2 “pools” de *L. longipalpis* e no sangue de 1 exemplar de *Rattus norvegicus*. Estes dados, aliados à presença do vetor competente da LTA, *L. intermedia* em elevada densidade, e os estudos das variáveis climáticas, alertam para a necessidade de vigilância epidemiológica e aplicação de medidas de controle tanto para LTA como para LVA.

ABSTRACT

In the city of Governador Valadares (MG), an endemic area for cutaneous leishmaniasis (ACL), a study was conducted to study ecoepidemiological aspects (vectors and possible reservoirs) involved in disease transmission. For the entomological survey and identification of blood feeding, sand flies captures were performed in the neighborhoods: Village da Serra, Vila Parque Ibituruna, Vila Isa and Elvamar from 01 to 12/2008. The blood meal was identified by the precipitin reaction. For the study of natural infection of sand flies, neighborhoods where human cases of ACL were recorded were selected; the captures were made in months of 2009 and 2010. For the systematic and non-systematic captures, HP light traps were used both in peridomicile and indoors. The correlation between rainfall, relative humidity and temperature and number of sand flies was carried out in 2008. The capture of small mammals for fauna survey and detection of natural infection was made in months of 2008 and 2010 using 40 traps in two sites in the neighborhood. The detection of *Leishmania* spp.' DNA and the identifying of the parasite species in sand flies and in tissue samples and mammals' blood was done by Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequencing, respectively. The results showed that the phlebotomine fauna is diverse, with the presence of 12 species (2 of the *Bruptomyia* genus and 10 of the *Lutzomyia* genus). Specimens of epidemiological interest were found, with predominance of *Lutzomyia intermedia* (29,9%). We captured 65% of species in peridomicile and 35% indoors. Most sand flies were eclectic regarding the food habit, feeding mainly on birds (35,8%). The analysis of climatic factors showed a significant correlation between rainfall and humidity, and the number of sand flies. We captured 32 specimens of mammals (23 rodents and 9 marsupials). Molecular analysis showed natural infection by *Leishmania chagasi* in two pools of *L. longipalpis* and the blood of a specimen of *Rattus norvegicus*. These data, combined with the presence of the competent vector of ACL, *L. intermedia* in high density, and studies of climatic variables, highlight the need for epidemiological surveillance and implementing control measures for both ACL and AVL.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* Ross, 1903. Este é dividido em dois subgêneros de acordo com o desenvolvimento no intestino do vetor: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson *et al.*, 1979). O ciclo de vida do parasito é digenético (heteroxênico), alternando-se entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, os flebotomíneos. A doença pode apresentar diversas formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da susceptibilidade do hospedeiro (Saravia *et al.*, 1989). As duas formas clínicas básicas que as leishmanioses humanas podem se apresentar são: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT).

As leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde pública, com uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em 88 países nos cinco continentes. A LV ocorre em 65 países, sendo que 90% dos casos ocorrem em áreas rurais pobres e subúrbios de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Em relação à LT, é endêmica em 82 dos 88 países onde a leishmaniose é transmitida e 90% dos casos ocorrem em sete países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Camargo & Barcinsky, 2003; Desjeux, 2004; WHO, 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam sob o risco de adquirirem a doença com aproximadamente 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano, sendo 500.000 relacionadas à LV e 1.500.000 à LT (WHO, 2006; Brasil, 2007).

As diversas formas clínicas das leishmanioses, causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, representam um complexo de doenças. A LV é uma doença sistêmica que atinge as células do Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) do homem, sendo os órgãos mais acometidos: baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele (FIGURA 1). A LV é uma doença grave, crônica, de alta letalidade, cuja mortalidade dos casos não tratados pode chegar a 90% (Melo, 2004). Ela tem aumentado significativamente sua importância no contexto de saúde pública, principalmente devido às modificações no ambiente e à emergência de focos da doença em áreas urbanas (Silva *et al.*, 2001; Travi *et al.*, 2002).

Os reservatórios incluem uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, sendo a ocorrência comum em roedores e canídeos, mas também em edentados, marsupiais, ungulados, primatas, e entre estes, o homem que é atingido acidentalmente pela infecção (Deane & Deane 1954; Lainson *et al.* 1985). O cão é apontado como o principal reservatório doméstico relacionado com os casos humanos da LV (Michalsky *et al.*, 2005).

No Brasil, o mecanismo de transmissão da LV se dá através da picada de vetores – *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi* infectados pela espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Alguns autores levantam a hipótese da transmissão entre a população canina através de ectoparasitos, sugerindo a hipótese da capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (Coutinho *et al.*, 2005; Coutinho & Linardi, 2007; Paz *et al.*, 2010). Outros autores sugerem que a transmissão possa ocorrer através de mordeduras, cópula ou transmissão vertical entre os cães, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão (Santos *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009).

Na LV as estratégias de controle até então utilizadas, são baseadas no controle dos reservatórios caninos, aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento dos casos humanos. Porém, estas medidas, aplicadas isoladamente, não se mostram efetivas para a redução da incidência da doença (Brasil, 2006).

A LT é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete a pele e cartilagens da nasofaringe, de forma localizada ou difusa (Basano & Camargo, 2004). Ela pode se apresentar em variados graus de morbidade: LCM (Leishmaniose cutâneo-mucosa), que pode ser fatal e é altamente desfigurante devido a complicações secundárias (FIGURA 2); LCD (Leishmaniose cutânea difusa), uma forma rara, com recaídas constantes devido à deficiência na resposta imune do paciente e características do parasito (Barral & Barral-Neto, 2009) (FIGURA 3), e LC (Leishmaniose Cutânea), que pode se apresentar com uma úlcera simples na pele, auto-limitada, ou tornar o indivíduo incapacitante, quando ocorrem inúmeras lesões (Desjeux, 2004; Cattand *et al.*, 2006) (FIGURA 4).

A LTA é considerada essencialmente uma zoonose do ambiente florestal primitivo (Gomes *et al.*, 1990), sendo este caráter evidenciado com a descoberta de reservatórios silvestres da doença (Guimarães *et al.*, 1968), o que aumenta a importância do estudo destes e de animais domésticos e peridomésticos na disseminação do parasito nas populações humanas. Já foram identificados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais, algumas espécies de roedores,

marsupiais, edentados e canídeos silvestres (Brandão- Filho *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994).

Para o diagnóstico das leishmanioses, necessita-se conhecer seus aspectos clínicos e epidemiológicos, assim como a disponibilidade de exames laboratoriais (diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular) possibilitando uma compreensão abrangente dos diversos aspectos envolvidos na transmissão (Gontijo & Carvalho, 2003). Estes métodos permitem a confirmação dos achados clínicos e podem fornecer informações epidemiológicas relevantes, possibilitando a identificação do parasito e norteados as medidas de controle para a doença (Brasil, 2007).

O tratamento de primeira linha para todas as formas da doença se faz por meio de medicamentos à base de antimoniais pentavalentes, de forma sistêmica. Contudo, é importante se conhecer a epidemiologia do local no que diz respeito à suscetibilidade do parasito às diferentes drogas, o entendimento da farmacocinética do medicamento, assim como uma criteriosa avaliação clínica do paciente, levando em consideração características imunológicas e aspectos socioeconômicos. Estes pontos são fundamentais na escolha da terapia e consequente sucesso da mesma (Tuon *et al.*, 2008).

Nas Américas as leishmanioses são consideradas doenças primariamente zoonóticas, de mamíferos silvestres; neste ambiente o parasito circula naturalmente entre os mesmos. A infecção do homem acontece quando este entra em contato com as áreas de transmissão, sendo considerada uma antroponose. Sua importância levou a OMS a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias no seu programa de controle (WHO, 1990). Nas últimas décadas, a epidemiologia da doença tem sofrido alterações, se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, como Belo Horizonte (Passos *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001), Rio de Janeiro (Marzochi *et al.*, 1985) e Manaus (Barrett & Senra, 1989).

Alguns fatores de risco devem ser considerados, haja vista a ampla distribuição geográfica das leishmanioses e sua alta incidência, como as transformações no ambiente provocadas pelo intenso processo migratório, pressões econômicas ou sociais, desmatamento, o processo de urbanização crescente e mudanças na susceptibilidade do hospedeiro à infecção, como imunossupressão e desnutrição (Desjeux, 2001; Brasil, 2006).

A incidência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os estados, sendo

considerada uma das infecções dermatológicas mais importantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que pode acarretar.

A LTA vem ocorrendo de forma endêmico-epidêmica apresentando diferentes padrões de transmissão, constituindo um importante problema de saúde pública pela sua magnitude, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle. Está distribuída por todo o Estado de Minas Gerais e os dados da Secretaria Estadual de Saúde (SES/MG) mostram casos da doença em praticamente todos os municípios. Análises epidemiológicas dessa parasitose têm mostrado nas últimas décadas, uma mudança no seu padrão de transmissão, inicialmente ocorrendo em ambientes silvestres e agora, já observada em áreas rurais e periurbanas.

O Vale do Rio Doce, em MG, foi considerado uma área endêmica tanto para LTA como para LVA. O município de Governador Valadares, no vale do Rio Doce, é considerado uma área endêmica para LTA. Segundo dados fornecidos pela Gerência Regional de Saúde (GRS) de Governador Valadares, foram diagnosticados 221 casos humanos de LTA entre 2004 e 2007. Em relação à LVA, de 2001 a 2006, 5 casos humanos da doença foram registrados, segundo dados do SINAN (Brasil, s.d.). De 2008 a 2011, 74 casos foram notificados, com 12 óbitos.

Neste sentido, o objetivo do estudo se fez oportuno e estratégico. Os casos humanos de LTA registrados pelos serviços de epidemiologia do município reforçaram esta necessidade. Os estudos de vetores e reservatórios domésticos e silvestres em áreas rurais e urbanas poderão fornecer um quadro epidemiológico da leishmaniose na região, sugerindo ações que irão subsidiar a escolha, pelos órgãos competentes, dos métodos de controle da doença mais adequados à situação atual.



FIGURA 1: Leishmaniose visceral
Fonte: Brasil, MS 2006



FIGURA 2: Leishmaniose cutâneo-mucosa
Fonte: Brasil MS2007



FIGURA 3: Leishmaniose cutânea difusa
Fonte: Brasil, MS 2007



FIGURA 4: Leishmaniose cutânea
Fonte: Brasil, MS 2007

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar os aspectos ecoepidemiológicos envolvidos na transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Governador Valadares, a fim de sugerir ações que auxiliarão no direcionamento das estratégias de controle.

2.2 Objetivos Específicos

a) Estudo de flebotomíneos

- Determinar a fauna de flebotomíneos do município;
- Estabelecer a distribuição mensal das espécies de flebotomíneos e correlacioná-la com algumas variáveis bioclimáticas;
- Estudar o comportamento das espécies de flebotomíneos com relação à endofilia e a exofilia;
- Identificar o repasto sanguíneo das fêmeas alimentadas, visando fazer inferência sobre potenciais reservatórios para LTA;
- Identificar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos, através da técnica de Nested PCR;
- Caracterizar através do sequenciamento de DNA as espécies de *Leishmania* spp. circulantes em flebotomíneos do município de Governador Valadares.

b) Estudo dos reservatórios sinantrópicos e silvestres

- Realizar o levantamento da fauna de animais sinantrópicos e silvestres na área estudada;
- Identificar presença de DNA de *Leishmania* spp. em mamíferos, através da técnica de Nested PCR;
- Caracterizar através do sequenciamento de DNA as espécies de *Leishmania* spp. circulantes em mamíferos do município de Governador Valadares.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade. Nas Américas, foram encontradas cerâmicas incas do Peru e Equador, datadas de 400 a 900 anos d.C., apresentando mutilações na face, características da espúndia e uta, conhecidas hoje respectivamente, como leishmaniose mucosa e cutânea (Lainson & Shaw, 2005).

Borovsky (1898) e Wright (1903) descreveram o parasito em células de lesões cutâneas do chamado “botão do oriente”, cujo agente causal é conhecido hoje como *Leishmania tropica*, causadora da leishmaniose cutânea no Velho Mundo. No Brasil, Moreira (1895) identificou pela primeira vez a existência do botão endêmico dos países quentes, o “botão da Bahia” ou “botão de Biskra”. Lindemberg, em 1909, encontrou formas de *Leishmania* idênticas à *L. tropica* em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamento para construção de rodovias no interior de São Paulo, onde houve a confirmação das formas de leishmânias em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas. Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico causador da “úlceras de bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir”. Em 1922, Aragão demonstrou, pela primeira vez, o papel dos flebotomíneos na transmissão da LT e Forattini, em 1958, encontrou o parasito em roedores silvestres em áreas de floresta no estado de São Paulo.

As teorias sobre a origem e expansão da LTA no continente sul-americano se iniciaram a partir de 1980, quando Juliano Moreira e Aguiar Pupo propunham a primeira teoria de origem Mediterrânea, comparando casos do “botão da Bahia” com os do “botão do Oriente”, inferindo que a doença teria sido introduzida pelos sírios ou fenícios que chegaram ao Nordeste na antiguidade. Estas viagens, porém, jamais foram comprovadas histórica ou arqueologicamente. A segunda teoria é de origem andina, que começou a se formular a partir do descobrimento de peças de cerâmica pré-colombiana ou *buacos* peruanos em 1895 (Rabello, 1925) e reforçados pelos documentos do século XVI, predominando esta teoria na literatura biomédica. Com base nas análises de fontes pré e pós-colombianas, Marzochi & Marzochi (1994) sugerem a partir de estudos epidemiológicos e de distribuição geográfica dos parasitos identificados como *L. (V.) braziliensis* em diferentes ecossistemas, envolvendo vetores e reservatórios diversos, que a doença humana tenha se

iniciado a partir da região ocidental amazônica, e admitem que o processo de dispersão para outras áreas do Brasil é recente, ocorrida principalmente através do ciclo econômico da borracha, entre 1890 e 1912, e se espalhou para outras regiões a partir de ciclos posteriores que implicaram mobilidades sociais. Altamirano-Enciso *et al.* (2003) sugerem, a partir desta teoria, que a doença humana é muito antiga, dispersando-se primeiro para a selva alta e posteriormente às terras quentes andinas, através dos limites da Bolívia e do Peru com o Brasil. As migrações humanas que interligam as regiões andina e amazônica teriam disseminado a infecção a partir de períodos arqueológicos como referem as cerâmicas pré-incaicas.

As leishmanioses já eram conhecidas desde antes do início do século XX como um grupo de doenças dermatológicas muito semelhantes entre si e com apresentação clínica associada a lesões cutâneas, ulcerosas e por vezes comprometendo também a mucosa oronasal (Rabello, 1925; Pessoa & Barretto, 1948; Pessoa, 1958).

A distribuição da LTA no continente americano vai desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Gontijo & Carvalho, 2003). No Brasil, pelos dados de notificação disponíveis, observa-se que a doença encontra-se em franco processo de crescimento, tanto em magnitude como em expansão geográfica. Atualmente é o país com a mais alta prevalência de LTA em que o parasito *L. braziliensis* é o agente etiológico principal, afetando quase 30.000 pessoas anualmente (Brasil, 2000; Marzochi, 2001).

A LTA tem sido assinalada em diversos municípios de todas as unidades federadas (UF), sendo, portanto, uma das afecções dermatológicas que merecem mais atenção (Saraiva *et al.*, 2006). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, o maior coeficiente de detecção da doença se dá na Região Norte, onde ela atinge quase 100 habitantes para cada 100.000. Em seguida, as regiões Centro-Oeste, com 41,85 e Nordeste, com 26,50 casos para cada 100.000 pessoas. A região Sudeste representa cerca de 10% dos casos notificados no Brasil.

A importância da doença reside não só no fato de ser amplamente distribuída e na sua alta incidência, mas pela capacidade de assumir formas desfigurantes e algumas vezes incapacitantes, com envolvimento psicológico e reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (Gontijo & Carvalho, 2003). No entanto, provavelmente devido à sua baixa taxa de mortalidade, ocorrendo somente em casos esporádicos associado

a infecções secundárias ou a problemas na medicação do paciente, a LTA é uma das doenças endêmicas que menos recebe atenção das autoridades públicas (Marzochi & Marsden, 1991; Sabroza, 2006).

Nas últimas décadas têm ocorrido mudanças no padrão de transmissão da LTA. Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, só acometia o homem que ocasionalmente adentrava as florestas. Hoje, a doença já ocorre em zonas rurais, matas remanescentes modificadas e regiões periurbanas, onde a adaptação dos reservatórios silvestres e dos flebotomíneos é evidente, propiciando a formação do ciclo do parasito nesses ambientes (Lima *et al.*, 2002).

Novos surtos da doença foram descritos em áreas de colonização antiga, como no estado do Rio de Janeiro, particularmente nas cidades de Jacarepaguá, Ilha Grande, Campo Grande e Parati (Marzochi, 1992), em São Paulo, no vale Mogi-Guaçu e no Vale da Ribeira (Bastos, 1978). No Espírito Santo, um grande foco foi detectado nas cidades de Viana e Cariacica (Sessa *et al.*, 1985). No Nordeste, a LTA persiste como uma doença endêmica, especialmente nas áreas montanhosas dos estados da Bahia, Ceará e Paraíba (Falqueto & Sessa, 1996).

Em Minas Gerais, na Região do Vale do Rio Doce, a LTA e a LVA têm sido relatadas e estudadas (Coelho & Falcão, 1966; Mayrink *et al.*, 1979). Neste estado, além da permanência dos antigos focos endêmicos na região de mata atlântica nos vales do Rio Doce e Mucuri, foram registrados numerosos casos fora dessas áreas, onde o ciclo periurbano de transmissão foi observado, como na região metropolitana de Belo Horizonte (Passos *et al.*, 1993, 2001) e na periferia de Manaus no Amazonas (Barrett & Senra, 1989). Com o desaparecimento das florestas primárias, roedores infectados e com hábitos sinantrópicos, circundando com maior frequência as casas, podem servir como fonte de infecção para flebotomíneos bem adaptados ao ambiente modificado como *L. whitmani* e *L. intermedia* (Gramiccia & Gradoni, 2005).

Na cidade de Governador Valadares, no Vale do Rio Doce, o número de casos de LTA vem aumentando nos últimos anos de forma preocupante. Segundo a Gerência de Epidemiologia da Secretaria Municipal da Saúde local, a maioria dos pacientes é residente na zona urbana, sendo a maior concentração dos casos nos bairros adjacentes ao Pico da Ibituruna.

No amplo contexto de diferentes regiões geográficas, atualmente são considerados 3 perfis epidemiológicos para a doença no Brasil (Brasil, 2007):

- Silvestre: considerada zoonose de animais silvestres, onde a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária. O homem pode ser acometido quando entra em contato com estes ambientes.

- Ocupacional e lazer: a transmissão está relacionada com a exploração desordenada de florestas, derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo.

- Rural ou periurbana: está relacionada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas residuais ou secundárias. Neste tipo, tem-se a adaptação do vetor ao peridomicílio.

O estabelecimento de ações de controle da LTA representa um grande desafio, uma vez que a doença apresenta grande diversidade de agentes, reservatórios, vetores, associados à ação do homem sobre o meio, sofrendo constantes mudanças no seu padrão epidemiológico de transmissão. Além disso, o conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos evidencia a complexidade do seu controle (Costa, 2005). Em focos domésticos e peridomésticos, intervenções com o objetivo de diminuir a abundância de flebotomíneos dentro e fora das casas, como a utilização de piretróides, pode reduzir a incidência da doença, mas em alguns casos, estas medidas não se mostram eficazes (Campbell-Lendrum *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2006).

O controle da LTA deve ser abordado levando em conta alguns aspectos: vigilância epidemiológica, que abrange a detecção do caso, sua confirmação, registro da terapêutica e variáveis básicas, e finalização com as análises de dados distribuídos em indicadores epidemiológicos; medidas de atuação no ciclo de transmissão, baseadas nas características epidemiológicas em particular, aliadas ao diagnóstico precoce e tratamento adequado, de redução vetorial nas áreas de colonização antiga ou periurbana, com o uso de inseticidas; medidas educativas, junto à comunidade e, aliadas a estas medidas, a capacitação continuada dos profissionais de saúde em todos os seus níveis (Basano & Camargo, 2004).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz seria uma outra alternativa para o controle da doença (Basano & Camargo, 2004). Contudo, é necessário haver uma adequação das atividades de controle às condições de cada local atingido pela doença, e um ponto que deve ser sempre abordado e tratado com prioridade é o desequilíbrio ambiental, que está intimamente ligado à expansão da mesma (Marzochi & Marzochi, 1994; Sabroza, 2006).

3.2 Agente etiológico

Os parasitos causadores da LT são protozoários do gênero *Leishmania*, e apresentam no seu citoplasma uma organela característica da ordem Kinetoplastida, o cinetoplasto, composto de uma rede de moléculas de DNA circulares (kDNA), que são divididos em maxicírculos e minicírculos (Simpson, 1987). Os minicírculos são as moléculas responsáveis pela estrutura da rede, sendo homogêneas em tamanho e usualmente heterogêneas em sequências, possuindo cerca de 10.000 a 20.000 cópias. Possui uma região conservada, que é compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos de kDNA (Rodgers *et al.*, 1990) e uma região variável. Já os maxicírculos, estão presentes em menor quantidade, são homogêneos em sequência, com cerca de 50 cópias e tamanho de 20 a 40 Kilobases, dependendo da espécie.

Segundo Lainson & Shaw (1987), as leishmânias são classificadas taxonomicamente de acordo com a localização do parasito no aparelho digestivo dos flebotomíneos. Os parasitos que se aderem à porção anterior e média do intestino são agrupados no subgênero *Leishmania* (comportamento suprapilário) e os que apresentam uma fase de divisão que se aderem à parede do intestino posterior (desenvolvimento peripilário), pertencem ao subgênero *Viannia*.

O gênero *Leishmania* possui muitas espécies e a classificação taxonômica baseia-se nas características do parasito nos animais de laboratório, nos vetores e no aspecto clínico e epidemiológico da doença que acomete o homem. O sistema de classificação é acrescentado com uma variedade de métodos bioquímicos e imunológicos, incluindo o mapeamento de peptídeos de DNA, reatividade imunológica a anticorpos monoclonais e padrões isoenzimáticos (zimodemas) (Grimaldi *et al.*, 1989; Duarte, 2009).

As principais espécies causadoras da LTA são assim classificadas:

QUADRO 1: Principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA

Subgênero	Complexo	Espécies
	Complexo braziliensis	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. peruviana</i>
<i>Viannia</i>	Complexo guyanensis	<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. panamensis</i>
		<i>L. naiffi</i>
		<i>L. lainsoni</i>
	Complexo donovani	<i>L. donovani</i>
		<i>L. infantum</i>
		<i>L. chagasi</i>
<i>Leishmania</i>	Complexo tropica	<i>L. tropica</i>
		<i>L. major</i>
		<i>L. aethiopica</i>
	Complexo mexicana	<i>L. mexicana</i>
		<i>L. amazonensis</i>

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar humana (Costa, 2005). No Brasil já foram identificadas sete espécies, seis destas do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste.

O agente etiológico responsável por causar a LV pertence ao subgênero *Leishmania*, com três espécies principais: *Leishmania (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *Leishmania (L.) chagasi* (Melo, 2004). Nas Américas a LV é causada pela *L. chagasi*, espécie considerada sinonímia de *L. infantum* (Mauricio *et al.*, 2001).

3.3 Ciclo Biológico do Parasito

Há dois estágios principais durante o ciclo de vida do parasito: promastigotas, que são formas flageladas e extracelulares, e amastigotas, formas não-flageladas e intracelulares obrigatórias, encontradas em monócitos e macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos injetam na pele do hospedeiro juntamente com a saliva, as formas promastigotas do parasito. As células do SMF (Sistema Mononuclear Fagocítico) do hospedeiro endocitam estas formas, que se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar no interior do fagolisossomo por divisão binária longitudinal, infectando novas células do SMF quando a célula hospedeira original se rompe. Ao se alimentar em um

hospedeiro infectado, o flebotomíneo ingere os macrófagos contendo as formas amastigotas, que sofrem divisão binária no seu intestino, transformando-se em promastigotas. Estas formas se dividem por divisão binária longitudinal, passando por mudanças morfológicas e fisiológicas. O primeiro estágio no vetor é chamado promastigota procíclica, que possui baixa motilidade e se replica no interior da matriz peritrófica, estrutura quitinosa que envolve o sangue ingerido, separando-o do epitélio intestinal (Secundino *et al.*, 2005). Após alguns dias, os parasitos se diferenciam em formas alongadas e com alta motilidade, chamadas nectomonas. Estas se dirigem para o exterior da matriz peritrófica e se aderem ao epitélio intestinal. As nectomonas se diferenciam em leptomonas, formas curtas que continuam a se replicar. A partir daí, alguns parasitos se diferenciam em formas haptomonas e outros em promastigotas metacíclicas, que são formas longas, apresentam um longo flagelo, alta motilidade e não mais se dividem, sendo estas as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado no momento do segundo repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo (Ashford, 2000; Choi & Lerner, 2001; Bates, 2007).

3.4 Os vetores

Os flebotomíneos são dípteros pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo o gênero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840 e *Lutzomyia* França, 1924 responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Velho Mundo e no Novo Mundo, respectivamente. O gênero *Lutzomyia* é subdividido em 15 subgêneros, 15 grupos e apresentam mais de 400 espécies (Young & Duncan, 1994).

São insetos de pequeno porte (2 a 3 mm), possuindo como característica o corpo com intensa pilosidade. São holometábolos, com ciclo vital composto de uma fase de ovo, fase larval (compreende 4 estádios), fase de pupa e o adulto. As larvas dos flebotomíneos são terrestres, bastante ativas e se deslocam com rapidez para buscar alimento, provável causa de dispersão na natureza (Sherlock, 2003). Os adultos podem ser facilmente reconhecidos pela posição de pouso, pois as asas se mantêm divergentes e em posição semi-ereta, conferindo-lhes um aspecto peculiar. Os olhos são proeminentes, arredondados e bem separados, e as antenas são longas, formadas por 16 segmentos. Nas fêmeas, a probóscide é desenvolvida, do tipo picador-pungitivo, constituída de labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e lábio. Os machos possuem mandíbulas rudimentares. As pernas

são longas e delgadas, o que os distinguem dos demais insetos desta família. As asas são bem desenvolvidas, grandes, hialinas e de aspecto lanceolado. A extremidade posterior do abdome se diferencia nos dois sexos: as fêmeas possuem estruturas internas, sobressaindo um par de espermatecas e nos machos é diferenciada em órgão copulador formado por 5 estruturas pares (Forattini, 1973) (FIGURAS 5 e 6).

A importância dos flebotomíneos para o homem e para os animais deve-se a seu papel como vetores naturais de alguns agentes etiológicos, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanosomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e vários arbovírus (Sherlock, 2003).

Muitas espécies têm sido incriminadas na transmissão da LTA, em associação com leishmânias dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, porém somente algumas têm sido consideradas importantes vetoras, com base nos seguintes critérios: grau de antropofilia, infecção natural por *Leishmania* e distribuição espacial coincidente com a da doença (Rangel & Lainson, 2003). Os principais flebotomíneos transmissores da LTA no Brasil são *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* Lutz & Neiva, 1912; *L. migonei* França, 1920; *L. (N.) whitmani* Antunes & Coutinho, 1939; *L. (Pintomyia) fischeri* Pinto, 1926; *L. (Pintomyia) pessoai* Coutinho & Barreto, 1940; *L. (N.) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977; *L. (Psychodopygus) wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson, 1971; *L. (Trichophoromyia) ubiquitous* Mangabeira, 1942; *L. (Psychodopygus) complexa* Mangabeira 1941; *L. (Psychodopygus) ayrozai* Barreto & Coutinho, 1940; *L. (Psychodopygus) paraensis* Costa Lima, 1941; *L. (N.) flaviscutellata* Mangabeira, 1942.

No ciclo de transmissão da *L. chagasi*, agente etiológico da LV no Novo Mundo, o principal vetor incriminado é *L. longipalpis* Lutz & Neiva, 1912. O encontro de fêmeas de *L. cruzi* Mangabeira, 1938 infectadas em área endêmica para LV em Corumbá, Mato Grosso do Sul, demonstrou a possibilidade desta espécie ser a transmissora da doença na área (Santos *et al.*, 1998).



FIGURA 5: Macho de flebotomíneo



FIGURA 6: Fêmea de flebotomíneo
ingurgitada

Fonte: http://fpslivroaberto.blogspot.com/2009_12_01_rchive.html

3.5 Hábitos alimentares

Os machos e fêmeas necessitam de suprimentos de carboidratos na alimentação, que adquirem da seiva de plantas, secreção açucarada de afídeos, néctar de flores, frutos e outros sucos de plantas. Esta fonte de alimentação, além de ser utilizada na obtenção de energia e amadurecimento dos ovários da maioria de espécies de flebotomíneos, pode afetar também o desenvolvimento e infectividade das leishmânias no tubo digestivo do vetor (Sherlock, 2003; Brazil & Brazil, 2003).

Somente a fêmea necessita de sangue para a maturação dos ovários. O ciclo gonotrófico varia; algumas espécies realizam o repasto sanguíneo apenas uma vez entre as posturas, enquanto outras podem se alimentar de diversos animais durante um único ciclo de oviposição, tornando-se assim vetoras mais importantes (Sherlock, 2003; Brazil & Brazil, 2003).

O estudo do conteúdo estomacal de insetos hematófagos é de grande importância para estudos ecológicos e epidemiológicos, pois permite descobrir a

fonte de alimentação dos flebotomíneos, por ocasião do repasto sanguíneo. Além disso, pode fornecer subsídios para identificar reservatórios potenciais de leishmânias e indicar o papel protetor que certos animais podem desempenhar em relação ao homem na área de transmissão do parasito (Ferreira, 1945). O estudo do padrão alimentar das espécies de flebotomíneos se faz necessário para avaliar a epidemiologia do comportamento das espécies em áreas de transmissão de leishmanioses e também do parasito, auxiliando no direcionamento das estratégias de controle (Dias *et al.*, 2003).

Em área de transmissão de LVA, a análise do sangue ingerido por flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* revelou uma ampla variedade de hospedeiros, inclusive o homem, evidenciando o caráter oportunista e antropofílico do vetor (Dias *et al.*, 2003; Barata *et al.*, 2005; Missawa *et al.*, 2008). Afonso *et al.* (2005) também observaram em Mesquita, RJ, área de transmissão de LTA, o caráter eclético de alimentação da espécie *L. intermedia*, e sua associação com hospedeiros tanto no peri como no intradomicílio.

A identificação da fonte alimentar dos vetores propicia informação sobre a preferência por hospedeiros em condições naturais. A intensidade da antropofilia é um dos fatores essenciais na avaliação da capacidade vetorial, enquanto a atração por outros hospedeiros pode dar respostas sobre a associação entre potenciais vetores e reservatórios naturais (Afonso *et al.*, 2005).

Atualmente, uma grande variedade de animais já foram identificados como fonte alimentar de flebotomíneos (Tesh *et al.* 1971; Boreham, 1975; Lainson & Shaw, 1979; Christensen *et al.* 1982), inclusive infectados por alguma espécie de *Leishmania*. A presença de animais sinantrópicos e domésticos no peridomicílio contribuem para a atração de flebotomíneos, possivelmente vetores de leishmanioses, e com isso, há maior risco de transmissão da doença (Forattini, 1953; 1960, 1976a, Gomes *et al.* 1983, Brazil *et al.*, 1991).

3.6 Métodos para identificação de repasto sanguíneo

Diversas metodologias são empregadas no estudo de identificação da fonte sanguínea de flebotomíneos, dentre elas, as observações visuais, capturas com isca humana, armadilhas contendo iscas animais, encontro em abrigos de animais silvestres e domésticos e mais usualmente, técnicas imunológicas (Marassá *et al.*, 2004). Estas têm sido utilizadas desde os primórdios de 1900, quando King & Bull (1923) e Rice & Barber (1935) adaptaram a técnica de precipitina para determinar a

fonte alimentar em mosquitos e outros insetos. Esta técnica é tradicionalmente empregada, e baseia na interação de proteínas presentes no soro proveniente do sangue digerido pelos artrópodes, confrontado com os antisoros adequados dos possíveis hospedeiros, caracterizando assim o grupo hierárquico, tais como ordens e classes de fontes alimentares envolvidas no hematofagismo (Weitz, 1953; Washino & Tempelis, 1983; Service *et al.*, 1986; Savage *et al.*, 1993).

Há algum tempo, a técnica imunoenzimática ELISA tem sido utilizada para a identificação do hábito alimentar de mosquitos (Burkot *et al.*, 1981; Savage *et al.*, 1993). Segundo Marassá, a utilização da técnica imunoenzimática de captura no sistema avidina-biotina (ELISA) apresenta vantagens ao obter um aumento na sensibilidade e especificidade e por permitir o processamento de um grande número de amostras, além de reconhecer a fonte sanguínea em amostras contendo quantidades reduzidas de sangue recém-ingerido (Marassá *et al.*, 2004). No entanto, ela apresenta alguns limites, como a possibilidade de reação cruzada entre as espécies, requer a produção de anticorpos específicos para uma ampla variedade de hospedeiros potenciais e a incapacidade de revelar reservatórios imprevisíveis (Haouas *et al.*, 2007).

Mais recentemente, técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para identificar as fontes de alimentação de alguns insetos vetores com alto grau de especificidade e sensibilidade. O primeiro método utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar a fonte alimentar de flebotomíneos foi realizado amplificando e sequenciando o gene prepronociceptin, recentemente descrito por Haouas *et al.* (2007). O primeiro ensaio foi realizado utilizando flebotomíneos alimentados em sangue humano; posteriormente foi testado em flebotomíneos capturados no campo, obtendo resultado satisfatório em 100% das amostras coletadas (Houas *et al.*, 2007). Sant'Anna *et al.*, 2008 através da tecnologia baseada em papel de filtro, seguida por PCR, conseguiu identificar as fontes alimentares, bem como a detecção do parasito em flebotomíneos alimentados. Na região sudeste do Irã, Oshagi *et al.* utilizaram o método molecular para diferenciar a alimentação sanguínea em humanos de outras fontes de alimentação em mosquitos, através da amplificação do gene do *Cytocromo b*. A técnica de PCR-RFLP foi utilizada para se chegar ao nível específico. As sequências do *cytocromo b* mostraram polimorfismos interespecíficos capazes de distinguir entre os hospedeiros: humano, vaca, ovinos, galinha e preá (Oshaghi *et al.*, 2006).

A PCR baseada em iniciadores que se alinham ao gene mitocondrial *cytochrome b* tem identificado hospedeiros mamíferos e aves de várias espécies de mosquitos (Kent & Norris, 2005; Kent *et al.*, 2006; Molaei *et al.*, 2006).

3.7 Influência das variáveis climáticas sobre os flebotomíneos

Os habitats naturais dos flebotomíneos possuem uma pequena variação na temperatura e umidade, sendo que esta característica favorece a presença dos mesmos e pode alterar a dinâmica das populações destes insetos (Dias *et al.*, 2007). Geralmente, nestes locais as fêmeas encontram os hospedeiros vertebrados e realizam seu repasto sanguíneo (Basimike *et al.* 1991; Comer & Brown, 1993).

As observações sobre o comportamento e a ecologia das espécies de flebotomíneos são imprescindíveis para a aplicação correta das medidas de controle da doença. Deve-se considerar aspectos como a variação na atividade estacional e horária, correlacionando-as com dados climáticos e fases lunares, a variação da distribuição vertical e horizontal, antropofilia e infecção natural e experimental por leishmânias (Sherlock, 1996).

Vários trabalhos sugerem que os fatores climáticos, como temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade podem influenciar, de maneira variável, a densidade de flebotomíneos em determinadas áreas (Scorza *et al.* 1968; Miscevic, 1981). A LTA apresenta uma evidente variação sazonal, sendo que as chuvas em níveis moderados, a temperatura, insolação e evaporação mais baixos e a umidade alta, favorecem o aumento da densidade de flebotomíneos (Dias-Lima *et al.*, 2003). Barata *et al.* (2004) na cidade de Porteirinha (MG) mostraram a interferência de fatores climáticos sobre a população de flebotomíneos, onde houve uma correlação significativa entre o número de flebotomíneos capturados e a umidade e pluviosidade. Outros autores observam que há um aumento na densidade desses insetos após o período de chuvas (Missawa & Dias, 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009).

O estudo da variação sazonal da fauna flebotomínica é importante para a compreensão da biologia, da relação entre a espécie e seu habitat, da possível importância epidemiológica dos vetores, assim como da dinâmica da transmissão da leishmaniose, visando propor medidas de controle que possam diminuir a densidade de flebotomíneos em determinados locais (Macedo *et al.*, 2008). Estudos destas variações têm originado dados sobre os riscos de transmissão de parasitos ao homem (Marcondes *et al.*, 2001).

3.8 Os reservatórios

Desde as primeiras décadas do século passado, pesquisadores em todo o mundo buscam descobrir os reservatórios “primários” das leishmanioses. Para que um animal seja considerado hospedeiro reservatório da doença, seu sistema deve ser capaz de manter populações do parasito que consigam sobreviver indefinidamente. A susceptibilidade do hospedeiro ao parasito depende de alguns fatores, como a densidade populacional do hospedeiro, a duração da infecção (e longevidade do hospedeiro), a localização do parasito no seu interior e o estado imunológico do hospedeiro após a cura (Ashford, 2000).

Vários pesquisadores, nos primórdios dos estudos da LTA, tiveram sua atenção voltada para a existência de um possível hospedeiro silvestre envolvido na transmissão da doença (Nery-Guimarães & Azevedo, 1964). Em 1955, Forattini e Santos viram formas “suspeitas” de *Leishmania* em lesões cutâneas de uma paca (*Cuniculus paca paca*). Em 1957, no Panamá, Hertig e colaboradores realizaram hemocultura em roedores e marsupiais, encontrando resultados positivos para *Leishmania* em alguns exemplares de espécies de ratos de espinho (*Proechimys semispinosus* e *Haplomys gymnurus*). A associação dos parasitos isolados em cultura à leishmaniose tegumentar foi comprovada pela inoculação em voluntário e subsequente produção de lesão leishmaniótica (Forattini, 1960).

No estado de São Paulo, em área endêmica para LTA, Forattini, no final da década de 50, capturou 928 animais, a maioria roedores, e encontrou positivos ao exame parasitológico de pele e hemocultura as seguintes espécies: *Cuniculus paca*, *Dasyprocta azarae* (cutia) e *Kannabateomys amblyonyx* (rato-da-taquara). Nery Guimarães *et al.* (1968) pesquisaram a infecção natural por *Leishmania* em roedores, na floresta de Utinga, município de Belém, Pará. Neste trabalho, foram analisados 334 espécimes do gênero, sendo que 34 (10,2%) foram encontrados infectados por *Leishmania* a partir de material de lesão de cauda (Nery Guimarães *et al.*, 1968). Na mesma região, Lainson & Shaw (1968) encontraram 16 exemplares infectados de um total de 89 *Oryzomys capito* examinados (provavelmente por *L. amazonensis*). O parasito foi isolado em 3 espécimes de *Proechimys guyanensis* capturados na mesma área. A alta incidência da infecção, aliada aos hábitos destas duas espécies com as do vetor *Lutzomyia flaviscutellata* indicaram a importância destes roedores como reservatórios na região do baixo Amazonas. Nesta região, os

mesmos autores demonstraram pela primeira vez a infecção em um marsupial, *Marmosa murina*, que apresentava lesão na cauda (Lainson & Shaw, 1969).

Em 1970, Lainson & Shaw detectaram pela primeira vez no estado do Mato Grosso, *Leishmania* em roedores do gênero *Oryzomys*. Foram observados nos isolados, duas cepas distintas do parasito: uma de crescimento rápido e outra de crescimento lento. Estas observações levaram os autores a suspeitar de se tratar de um complexo de espécies, até aquele momento, denominadas como uma única espécie: *Leishmania braziliensis* (Lainson & Shaw, 1970). Os mesmos autores, no norte do estado do Pará, encontraram o roedor *Proechimys guyannensis* frequentemente parasitado (15 de 57 espécimes capturados) pela espécie *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972). Eles concluíram que esta deveria ser a principal espécie hospedeira do parasito (Shaw, 1988). Em 1972, Forattini e colaboradores isolaram leishmânias, do tipo que apresentavam crescimento “lento”, em 3 de 137 animais capturados em área endêmica para LTA no estado de São Paulo: dois *Akodon arviculoides* e um *O. nigripes*. Os autores suspeitaram a possibilidade do gênero *Oryzomys* ser importante reservatório do parasito no estado. Estes mesmos autores, um ano mais tarde, isolaram o mesmo parasito em *O. capito laticeps*.

No Vale do Rio Doce, MG, as pesquisas de Mayrink *et al.*, 1979 com finalidade de encontrar infecção por *Leishmania* em animais silvestres, apresentaram resultados negativos para todos os animais examinados. Em contraste, Dias *et al.* (1977), nesta região, encontrou lesões de pele em 27 de 355 cães examinados, sendo que em 11 destes foram encontrados parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*.

É importante salientar a importância dos animais com hábitos sinantrópicos na epidemiologia da doença, pois a mesma começa a ser observada em ambientes peridomiciliares. Com a utilização de técnicas moleculares, roedores silvestres e sinantrópicos foram encontrados infectados por *L. (V.) braziliensis* em *Rattus rattus* no Ceará (Vasconcelos *et al.*, 1994). Brandão-Filho *et al.* (2003) no estado de Pernambuco, em área endêmica para LTA, capturaram 460 animais e conseguiram isolar *L. braziliensis* em 6 espécimes, dos quais 5 eram pertencentes à espécie *Bolomys lasiurus* e um *Rattus rattus*. Detectaram ainda, em 17,6% das espécies, kDNA de *Leishmania (Viannia)*. Em Araçuaí (MG), Oliveira (2005) detectou no roedor sinantrópico *Rattus rattus* DNA pertencente aos subgêneros *L. (Viannia)* e *L.*

(*Leishmania*), encontrado também nos roedores silvestres *Trichomys apereoides* e *O. subflavus* (Oliveira *et al.*, 2005).

O envolvimento de animais domésticos na epidemiologia da LTA é conhecido desde o início do século (Falqueto *et al.*, 1986). Brumpt & Pedroso (1913) foram os primeiros a observar a infecção natural em cães, no estado de São Paulo. Observações interessantes foram feitas por Herrer em áreas endêmicas de “Uta” (forma benigna da LT que ocorre no Peru). Na ocasião, dos 513 cães examinados, 11 foram encontrados infectados. Herrer & Christensen (1976), investigaram a ocorrência da doença em cães domésticos, encontrando 11 infectados entre 333 examinados.

No Brasil, alguns estudos têm mostrado ser relativamente comum a presença de cães infectados em áreas endêmicas de LTA, como observado por Falqueto *et al.* (1986) no Espírito Santo, que mostrou nítida relação entre a presença de cães infectados e o surgimento de novos casos da doença. A discussão do papel do cão na epidemiologia da LTA é ainda controversa. Alguns autores consideram o cão apenas um hospedeiro acidental, assim como o homem (Laison & Shaw 1970). Outros, entendem o papel do cão como elo de ligação da doença dos animais silvestres para o homem, no ciclo epidemiológico da doença (Coutinho *et al.* 1985; Pirmez *et al.*, 1988).

Apesar de aventada a possibilidade de animais domésticos e peridomésticos, em especial o cão, estarem funcionando como reservatórios, pouco se conhece sobre os aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos do curso da infecção pela *L. braziliensis* em cães. Vários questionamentos ainda permanecem quanto ao verdadeiro papel do cão na adaptação do novo ciclo de transmissão da LTA (Reithinger & Davies, 1999; Madeira, 2003).

3.9 A utilização da PCR para detecção de *Leishmania* spp.

3.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação da polimerase em cadeia (PCR), desenvolvida por Saiki *et al.* (1985), baseia-se na replicação *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. É usada para amplificar um segmento de DNA posicionado entre duas regiões de seqüência conhecida. Os oligonucleotídeos são usados como *primers* (iniciadores) para uma série de reações catalizadas pela enzima.

A reação se baseia na desnaturação do DNA (separação da fita dupla). Após a desnaturação, cada oligonucleotídeo ou iniciador se liga à sequência alvo. Assim, cada iniciador hibridiza para cada uma das duas fitas separadas, de forma que a extensão terminal 3' é diretamente direcionada à outra. Depois do anelamento, ocorre extensão do iniciador sobre a fita molde através da DNA polimerase.

A PCR se dá em repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão do iniciador. Cada ciclo é composto de uma desnaturação de DNA (92-95°C), ligação do iniciador (40-65°C) e síntese do DNA (70-75°C). Desta forma, a partir de uma única cópia, ao final de uma sucessão de ciclos, haverá a amplificação de milhões de vezes esse segmento.

Os métodos clássicos utilizados para detecção da presença de *Leishmania* spp. em insetos vetores, são o parasitológico após dissecação do trato digestivo do vetor e identificação dos parasitos *in situ* pela cultura do parasito, ou inoculação em animais de laboratório (Carvalho *et al.*, 2008). Os fatores limitantes destas técnicas estão no fato de elas serem demoradas, da dificuldade de processar um grande número de amostras e de sua baixa especificidade, pois as fêmeas de flebotomíneos também albergam outros tipos de parasitos, como algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por um estágio de promastigota indistinguível de *Leishmania*, dificultando o diagnóstico da doença (Paiva *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008).

Os métodos moleculares, como a PCR vêm sendo largamente utilizados nos estudos epidemiológicos a fim de incriminar animais silvestres e domésticos como hospedeiros da doença e detectar o parasito em flebotomíneos infectados experimental ou naturalmente. A sensibilidade e especificidade deste método são as principais vantagens, independente do número, localização e estágio do parasito no trato digestivo do vetor (Michalsky *et al.*, 2002). Além disso, para detectar a presença de infecção atual e não passada, nos inquéritos epidemiológicos, a PCR é o método mais indicado, uma vez que o DNA persiste apenas algumas horas após a morte do parasito, ao contrário da resposta imune celular ou humoral (Disch *et al.*, 2004; Prina *et al.*, 2007).

Podem ser usados como alvos o DNA nuclear e o DNA do cinetoplasto (kDNA), cujo minicírculo representa o alvo molecular ideal, pois apresenta um grande número de cópias por célula e sua sequência já é conhecida para a maioria da espécies de *Leishmania* (Aransay *et al.*, 2000). Outras sequências alvo têm sido utilizadas na PCR, como o SSUrRNA (Van Eys, 1992). A *Leishmania* Nested PCR

(Ln-PCR) é dirigida à região SSUrRNA e apresenta um alto grau de sensibilidade e especificidade, devido ao uso de um segundo alvo de iniciadores específicos para *Leishmania* a fim de amplificar o primeiro produto da PCR (Cruz *et al.*, 2002, 2006).

Como a PCR é um método extremamente sensível, seu maior inconveniente seria o risco de resultados falso-positivos ou contaminação por produtos previamente amplificados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Governador Valadares insere-se na Região Administrativa do Vale do Rio Doce, segundo a divisão estabelecida em 1997 pelo Estado de Minas Gerais. Conforme as divisões de Planejamento, situa-se na Microrregião do mesmo nome, pertencente à Região de Planejamento X - Rio Doce. Sua localização, segundo as coordenadas geográficas é 18°51'12" latitude sul e 41°56'42" longitude oeste. A área total do município é de 2349 km², segundo dados do Instituto de Geociências Aplicadas (IGA). É um importante ponto de ligação entre a capital mineira, o nordeste do Estado e do País, configurando-se como entroncamento de diferentes meios e vias de transporte. A zona urbana da cidade é atravessada pelo Rio Doce, que também tem um grande percurso pela zona rural (FIGURA 7). O município é ainda, banhado pelos rios Suaçuí Grande e Suaçuí Pequeno, além de outros córregos e rios de menor porte.

O município apresenta uma topografia caracterizada pela dominância de relevo colinoso, com níveis altimétricos compreendidos entre 191 metros (foz do Ribeirão Santa Helena) e 1 008 metros (cabeceira do Córrego Bananal), em relação ao nível do mar. O Pico da Ibituruna, conhecido como "Plataforma Mundial de Vôo Livre", é o principal atrativo de fomento do turismo Valadarense, com 1.123 metros de altitude acima do nível do mar e 990 metros em relação ao nível do Rio Doce. Tombado pela constituição do Estado de Minas Gerais desde 1989, o Pico da Ibituruna é constituído por uma APA (Área de Preservação Ambiental). A temperatura no Pico é mais baixa do que na cidade, apresentando durante o dia em torno de 25°C e à noite 12°C. O clima é determinado pelos ventos provenientes do nordeste e do sudeste. Outro fator que contribui para caracterizar o clima da cidade são as Serras do Espinhaço (a oeste do Estado) e a Serra da Mantiqueira (ao Sul). As duas cordilheiras freiam as frentes frias permitindo que se forme, na região, um bolsão de calor, que começa em Ipatinga e vai até Linhares, no Espírito Santo, fazendo com que o clima seja quente durante o ano todo.

O clima da região de Governador Valadares é classificado, segundo Köppen, como do tipo Aw - tropical subquente e subseco. Esta categoria é marcada por uma estação seca bem acentuada, coincidindo com o inverno. As médias térmicas anuais mostram-se em torno de 25,6°C e variam pouco no decorrer do ano. O índice

pluviométrico médio é da ordem de 1350 mm. O período tipicamente chuvoso ocorre durante o verão e outono (dezembro a maio), enquanto a estação seca é no inverno e primavera (junho a novembro).

A área de Governador Valadares insere-se nos ecossistemas da Região das Florestas Estacionais Semidecíduais. Eles compreendem uma faixa territorial de sentido nordeste/sudeste, localizando-se mais precisamente entre a Floresta Atlântica-Pinheirais e os cerrados; são de ocupação antiga e complexa, porque neles mesclam atividades tipicamente urbano-industriais com agrícolas e pecuárias.

A escolha de Governador Valadares se deve ao alto número de notificações de casos humanos de LTA nos últimos anos e ao crescente número de registros da LVA, além do fato da cidade ser pólo na região com uma população em torno de 260.000 habitantes. A cidade é cortada por extensa malha rodoviária. A intensa procura das populações vizinhas por serviços na cidade pode constituir um fator importante para o fenômeno da urbanização das leishmanioses.

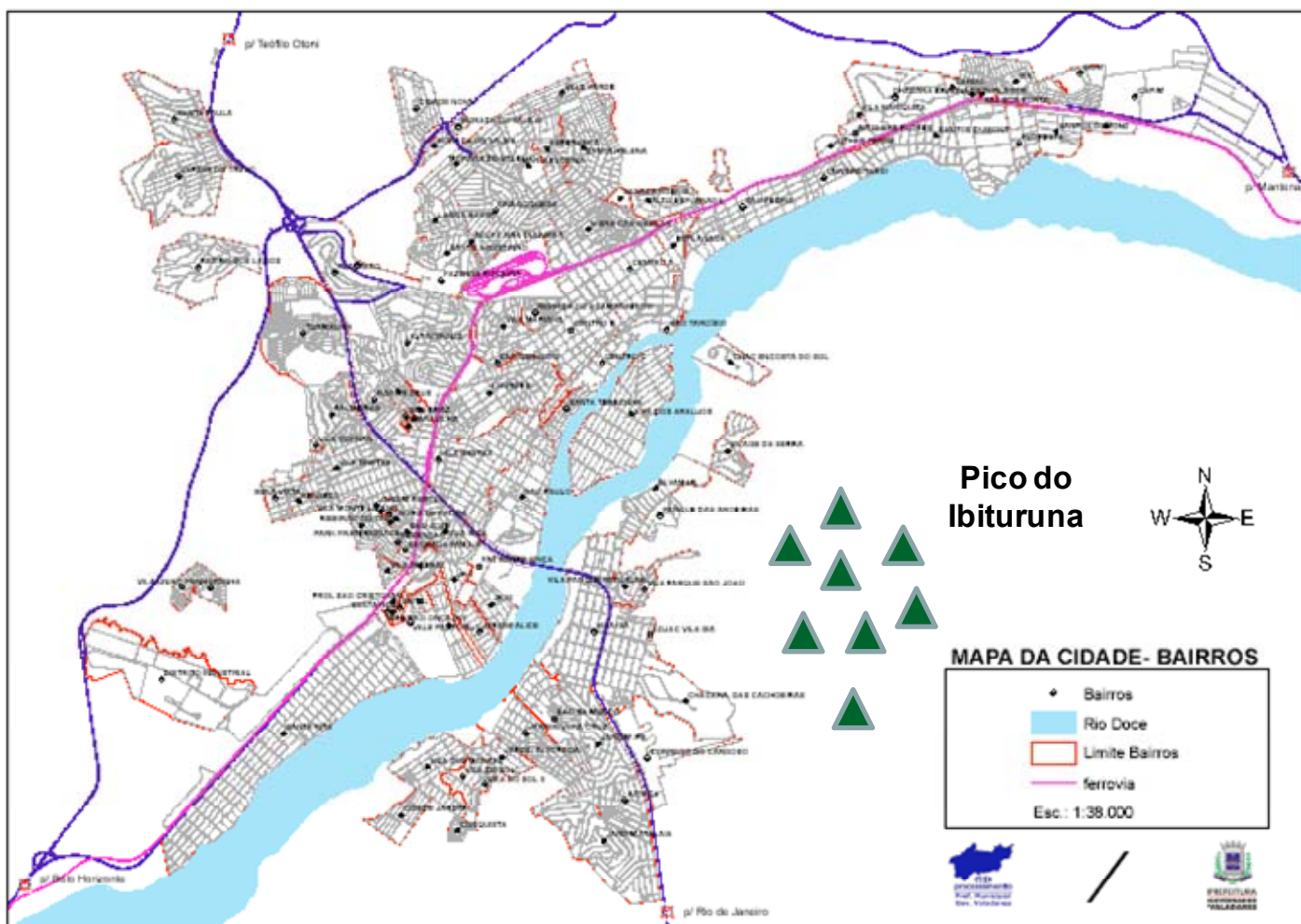


FIGURA 7: Mapa do Município de Governador Valadares (MG), mostrando a distribuição de bairros.

Fonte: Secretaria Municipal de Planejamento de Governador Valadares - MG.

1.1.1.1.1

4.2 Estudo de flebotomíneos

4.2.1 Captura de flebotomíneos

As capturas sistemáticas para o levantamento da fauna flebotomínica foram realizadas com armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo *et al.* 2005) (FIGURA 8), durante o período de janeiro a dezembro de 2008. Foram utilizadas 16 armadilhas em 4 bairros do município: Village da Serra, Elvamar, Vila Parque Ibituruna e Vila Isa, distribuídas em dois pontos por bairro, uma no intra e uma no peridomicílio. O critério para a escolha dos bairros se deu pelo registro de casos humanos de LTA nos mesmos, além de serem locais de transição entre a área urbana e área verde, como representado no mapa (FIGURA 9). Para a escolha do local de exposição das armadilhas, levou-se em consideração as condições favoráveis para o desenvolvimento de flebotomíneos, como presença de animais domésticos e terrenos com presença de matéria orgânica (FIGURA 10). Todas elas foram expostas das 16:00h às 8:00h da manhã seguinte, durante 3 dias consecutivos em cada mês, sempre na última semana. O acondicionamento dos espécimes capturados nestas armadilhas foi feito em tubos de hemólise contendo álcool 70%.

As fêmeas ingurgitadas capturadas durante este período foram acondicionadas a seco em “ependorfs” de 1,5 ml para os estudos de identificação do repasto sanguíneo. As capturas entomológicas não-sistemáticas para os estudos de detecção de infecção natural, foram realizadas durante 2 dias consecutivos em cada mês: março/abril/maio/outubro/novembro e dezembro de 2009 e janeiro/fevereiro e março de 2010. Até o mês de novembro, as capturas foram realizadas nos 13 bairros do município onde ocorreram casos humanos de LTA. São eles: Santa Helena, Altinópolis, Mãe de Deus, Village da Serra, Nossa Senhora das Graças, Santa Terezinha, São Pedro, Jardim Pérola, Sir, Lourdes, Santa Rita 2, Vila do Sol e Centro. Nos meses de dezembro/09, janeiro, fevereiro e março/10 as coletas foram realizadas nos mesmos bairros das capturas para o levantamento de fauna, cujo ambiente era de transição entre as áreas verdes e áreas modificadas pelo homem. Em todos os meses estudados foram utilizadas armadilhas luminosas HP. As fêmeas não alimentadas capturadas foram acondicionadas em tubos de criopreservação contendo dimetilsufóxido a 6%, sendo transferidos para o nitrogênio líquido para conservação do DNA, a fim de serem utilizadas no estudo de detecção de infecção natural. Todos os exemplares capturados foram transportados até o Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.



FIGURA 8: Armadilha luminosa tipo HP
Fonte: Pugedo *et al.*, 2005



FIGURA 9: Pontos de captura de flebotômíneos e roedores, georreferenciados, no município de Governador Valadares, MG. 1 e 2: Village da Serra; 3 e 4: Elvamar; 5 e 6: Vila Parque Ibituruna; 7 e 8: Vila Isa.



FIGURA 10: Exemplos de locais escolhidos para as capturas de flebotomíneos e roedores no período de janeiro a dezembro de 2008 no município de Governador Valadares, MG.

4.2.2 *Preparação, montagem e identificação dos espécimes*

Os flebotomíneos acondicionados em tubos de hemólise foram preparados de acordo com as técnicas padronizadas (TABELA 1) e montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se líquido de Berlese para machos e fêmeas de acordo com a técnica de Langeron (1949), modificada.

TABELA 1: Protocolo de preparação de flebotomíneos para montagem e identificação de machos e fêmeas, segundo normas preconizadas pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou.

Machos e fêmeas	
Potassa 10%	3 h
Ácido acético 10%	20 min
Água destilada	15 min
Água destilada	15 min
Água destilada	15 min
Lactofenol	24 h

Os flebotomíneos capturados foram identificados através do uso de descrições específicas, chaves taxonômicas e comparações com exemplares da coleção de referência (Laboratório de Leishmanioses do CPqRR). A classificação adotada foi a proposta por Young & Duncan (1994) (FIGURA 11). Parte do material não nos permitiu chegar à espécie, devido a não integridade de alguns exemplares, sendo então identificados apenas em nível de gênero.

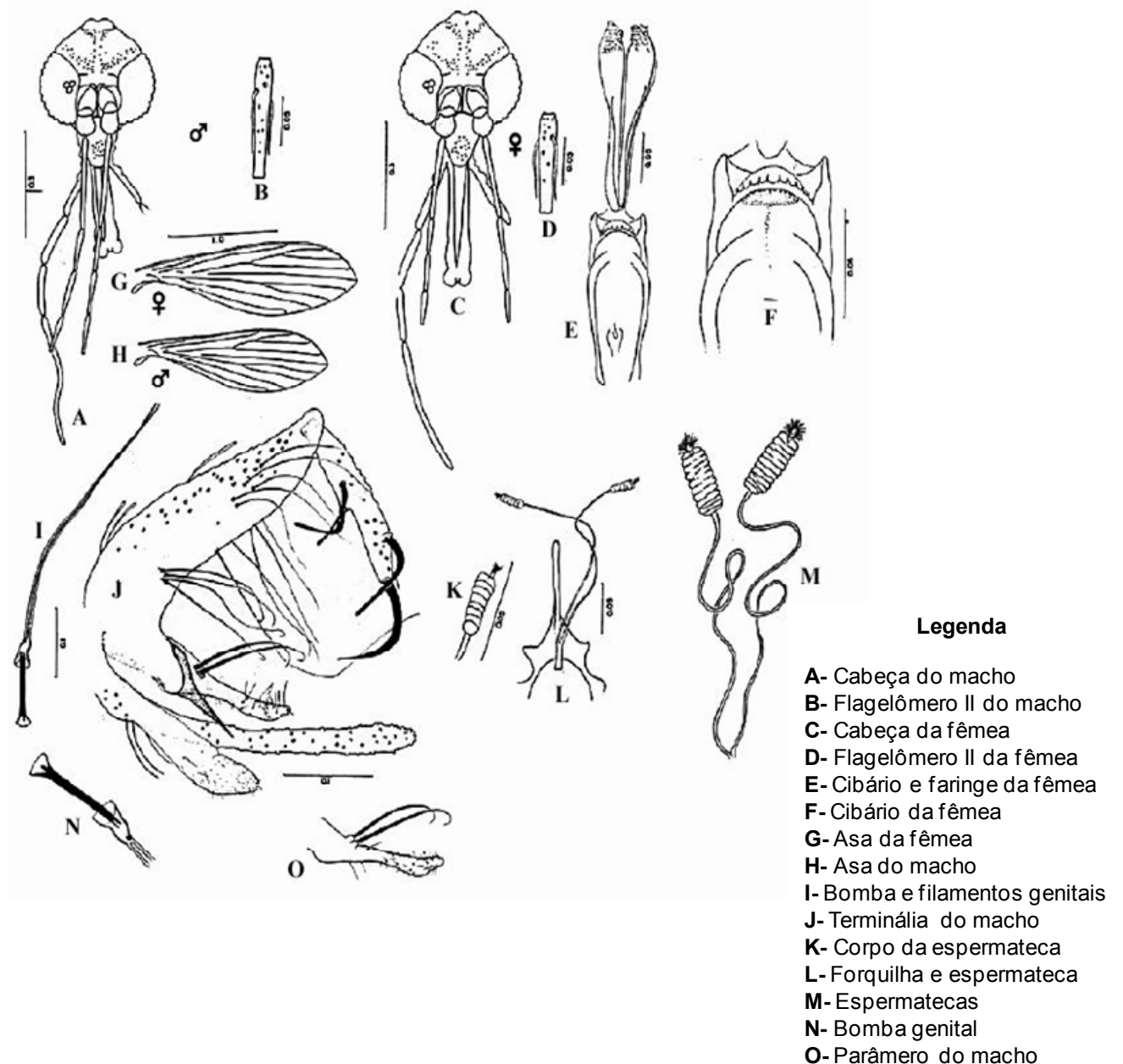


FIGURA 11: Principais estruturas morfológicas utilizadas na identificação de machos e fêmeas de flebotomíneos.
Fonte: Young e Duncan, 1994.

4.2.3 Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos

Para verificar a influência da variação mensal sobre a densidade de flebotomíneos no município, foram utilizados os dados bioclimáticos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm³) referentes ao período de janeiro a dezembro de 2008. As variáveis climáticas foram obtidas no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Foram considerados os valores das médias mensais para cada uma delas. A correlação entre as variáveis climáticas e a densidade populacional de flebotomíneos foi avaliada através do coeficiente de Spearman (p- valor ≤ 0.05).

4.2.4 Identificação do repasto sanguíneo de flebotomíneos através da reação de precipitina

Os flebotomíneos capturados foram transportados vivos até o laboratório, onde as fêmeas ingurgitadas foram sacrificadas por congelamento para total paralisação do processo digestivo. As fêmeas foram dissecadas para identificação da espécie e o teste de precipitina foi aplicado ao conteúdo intestinal. A técnica foi realizada no Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Executou-se a técnica com pequenas quantidades de reagentes para facilitar a leitura, e o conteúdo estomacal foi triturado em salina a 0,85%. Este macerado foi deixado por 12 horas à temperatura entre 4°C e 8°C e, logo após, centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm, e o sobrenadante foi confrontado com os anti-soros de ave, cavalo, boi, cão, homem, gambá e roedor (Lorosa & Andrade, 1998).

4.3 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos através da técnica de PCR

4.3.1 Extração de DNA de *Leishmania*

As fêmeas de flebotomíneos acondicionadas em DMSO 6% a -20°C foram primeiramente dissecadas para a determinação da espécie, retirando os dois últimos segmentos do abdômen e colocando-os entre lâmina e lamínula com uma gota de salina para a visualização da espermateca. Para a obtenção do DNA, os flebotomíneos foram transferidos em “pools” de número variável, de acordo com a espécie de flebotomíneo, para “ependorfs” de fundo oval e macerados a seco com pistilos previamente autoclavados. A extração de DNA foi realizada através do Quit

da GE Healthcare illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit. Realizou-se a maceração dos flebotomíneos no microtubo utilizando um pistilo de plástico. Posteriormente, foi adicionado 1 ml de PBS, com centrifugação por 2 min a 14.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Foi adicionado 50 µl de tampão de lise tipo I e 10 µl de proteinase K passando pelo vortex durante 15 seg. Em seguida, as amostras foram incubadas a 56°C “overnight”. Na etapa de purificação, foi adicionado 500 µl de tampão de lise tipo IV, agitando por 15 seg. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 10 min. Enquanto isto, foram preparadas alíquotas de tampão de eluição tipo V e colocadas no banho-maria a 70°C. As amostras foram transferidas para a mini-coluna “tissue & cells”, já acopladas ao tubo de coleta e centrifugadas durante 1 min a 12.000 rpm. Na etapa de lavagem, foram adicionados 500 µl de tampão de lise tipo IV centrifugando-se por 1 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem tipo VI. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, descartando-se o tubo de coleta. A coluna foi transferida para um “eppendorf” de 1,5 ml, adicionando-se 200 µl do tampão tipo V pré-aquecido. As amostras foram deixadas durante 1 min à temperatura ambiente e centrifugadas durante 1 min a 12.000 rpm. O DNA obtido foi estocado a -20°C.

4.3.2 PCR de gene constitutivo específico de flebotomíneo (cacofonia)

A amplificação de um gene constitutivo do DNA de flebotomíneos (cacofonia) teve como objetivo confirmar a presença do DNA de *Lutzomyia* spp., validando assim o processo de extração. Foi utilizado um par de iniciadores específicos da região IVS6 de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*: 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). Foi utilizado o Kit illustra pureTaq Ready- To- Go™ PCR Beads® (GE Healthcare), cujos reagentes são 2,5 U enzima (Taq Polimerase), 10mM Tris-HCL, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 200µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP. A estes reagentes foram acrescentados 1 µl de cada iniciador a 20 pmol/ µl e 2 µl de DNA para 25 µl de volume total.

A amplificação do DNA foi realizada em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneAmpPCRSytem 2400). O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por 12 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30

seg, 72°C por 30 seg e uma extensão final a 72°C por 10 min. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base.

A cada conjunto de reação de PCR foram incluídos um controle negativo e um controle positivo. Como controle negativo da reação, foi utilizado um tubo que continha todos os reagentes, exceto o DNA e no controle positivo, foi adicionado DNA purificado de flebotomíneo da espécie *L. longipalpis*.

4.3.3 Nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*

A detecção do DNA de *Leishmania* spp. nas amostras extraídas de flebotomíneos foi realizada através da técnica Nested PCR (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania*, que amplifica um fragmento menor deste gene, correspondendo a uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania* (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002, 2006).

Esta metodologia, adaptada e modificada de Cruz *et al.* (2002) foi realizada a partir de uma amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, utilizando-se os iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, utilizando-se os iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3' (FIGURA 12).

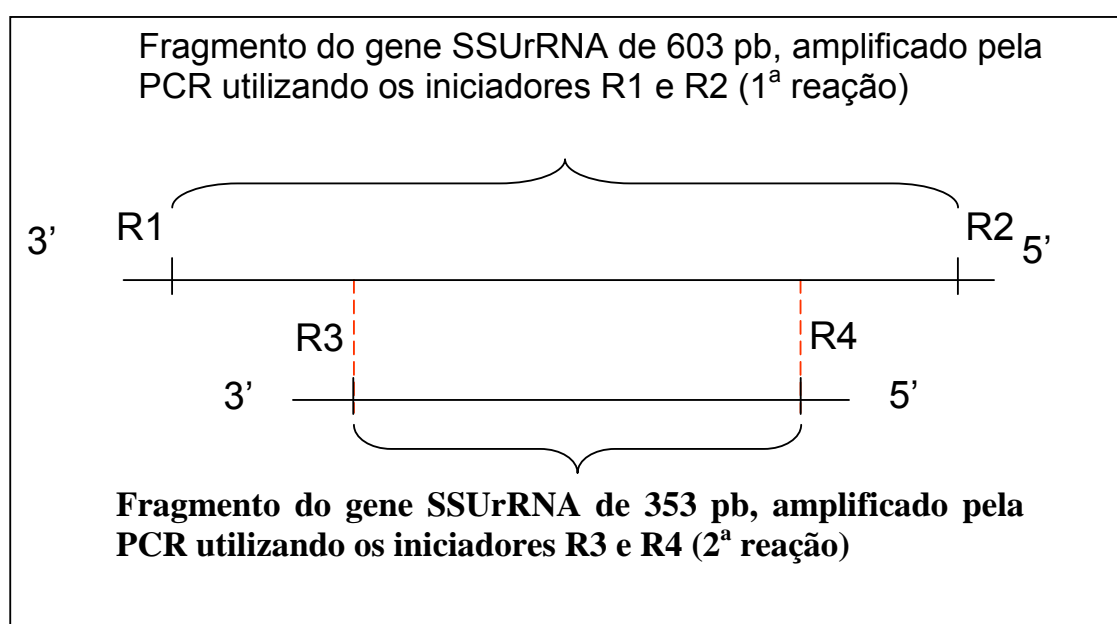


FIGURA 12: Desenho esquemático do resultado da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*.

A primeira reação foi preparada para um volume final de 50µl contendo 10µl de DNA da amostra a ser testada, 5 µl da solução tampão 10x - 15mM MgCl₂, 1 µl de dNTPs a 10mM, 1µl do iniciador R1 a 15µM, 1 µl do iniciador R2 a 15µM, 1,4 µl de Tth DNA polimerase a 1U/ µl (Biotools) e 30,6 µl de H₂O destilada estéril.

Em tubos contendo 1 ml de H₂O foram diluídos 25 µl de produto da primeira reação, para serem utilizados como molde da segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 µl contendo 10µl do produto amplificado diluído, 2,5 µl da solução tampão 10x - 15mM MgCl₂, 0,5 µl de dNTPs a 10mM, 0,5µl do iniciador R3 a 15µM, 0,25 µl do iniciador R4 a 15µM, 0,7 µl de Tth DNA polimerase a 1U/ µl (Biotools) e 10,55 µl de H₂O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, para a primeira reação e desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 65°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg para a segunda. A extensão final foi a 72°C por 5 min para ambas as reações. Foi utilizado como marcador de peso molecular φX174RF/HaeIII.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *L. braziliensis* (MHOM/BR/74/M2930), e como controle negativo foi utilizado H₂O destilada estéril.

4.3.4 Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados pela PCR utilizando iniciadores para o gênero *Lutzomyia* spp. e *Leishmania* spp. foram analisados através de eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%. O gel foi preparado com 2 g de agarose em 100 ml de TBE 1X (0,089 M Tris-HCl, 0,089 M ácido bórico, 0,02 M EDTA). Após fundida a agarose, foi adicionado 5µl de solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Em seguida, foi adicionado 25 µl do produto amplificado e 5 µl de corante Orange G (Promega) ao gel, e este foi submetido a uma voltagem de 100 V por aproximadamente 30 minutos. A amplificação dos produtos foi visualizada através de luz ultravioleta e os géis fotografados utilizando-se o Eagle Eye System (Stratagene, la Jolla, USA).

4.3.5 Sequenciamento para a identificação da espécie de *Leishmania* spp.

Foi realizado o sequenciamento do produto amplificado pela segunda reação da LnPCR (aproximadamente 353 pb), para a identificação da espécie de *Leishmania* spp.

Todas as bandas de 353 pb com intensidade considerável foram cortadas e purificadas utilizando o kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. O produto amplificado e purificado, eluído em 20 µl de H₂O destilada e estéril foi utilizado como molde para uma amplificação, anterior ao processo de sequenciamento.

A reação de PCR para o sequenciamento foi preparada para um volume final de 10 µl, formada por 4 µl do PREMIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl do iniciador na concentração de 3,2 pmol e 5 µl do produto de PCR. Este mix foi colocado em um termociclador (AB9800®) com o seguinte programa: 94°C por 3 min, seguido de 25 ciclos de: 96°C por 1 seg, 65°C por 5 seg (esta temperatura depende da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) e 60°C por 4 min. Posteriormente, procedeu-se à realização de precipitação do DNA e o sequenciamento propriamente dito foi posteriormente realizado em sequenciador automatizado.

A análise bioinformática das sequências obtidas foi realizada utilizando-se os programas *Lasergene® sequence analysis software* (DNASTAR) e o BIOEDIT. Estas análises incluem a edição, alinhamento e a busca de sítios de restrição das sequências estudadas. O alinhamento das sequências editadas com aquelas depositadas no GenBank nos permite a identificação de três espécies de interesse na área de estudo: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

4.3.6 Cálculo da taxa mínima de infecção natural

Por estarem acondicionados em “pools”, a taxa mínima de infecção natural para a espécie de flebotomíneo foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{TMI} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de "pools" positivos de cada espécie} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de indivíduos da espécie}}$$

4.4 Estudo dos hospedeiros sinantrópicos e silvestres

4.4.1 Captura de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais)

Foram realizadas seis capturas bimestrais, sempre na última semana, entre janeiro e dezembro de 2008, com a exposição de 40 armadilhas tipo Tomahawk (FIGURA 13), distribuídas em oito pontos (dois por bairro) no peridomicílio, durante três noites consecutivas. Nos meses de janeiro e março de 2010, as coletas foram realizadas novamente, seguindo a mesma metodologia. Foram montados transectos para a disposição das armadilhas de coleta, seguindo a metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos (Lacher & Alho, 1989; Paglia *et al.*, 1995; Fonseca, 1996). Todas as armadilhas foram expostas das 16:00h às 8:00h da manhã seguinte. Como isca alimentar foi utilizada banana e óleo de fígado de bacalhau para atração dos pequenos mamíferos.

Os exemplares de pequenos mamíferos coletados foram sedados com acepromazina (Assepram 0,05 mg/Kg de peso) e posteriormente eutanasiados utilizando-se barbitúricos, para posterior retirada de amostras de tecido e sangue.

O projeto obteve licença do órgão do Ministério de Meio Ambiente do Brasil, Instituto Brasileiro para o meio Ambiente (IBAMA) para a captura e eutanásia dos animais (licença 154/07) – ANEXO 1.



FIGURA 13: Armadilha tipo Tomahawk.

Fonte: <http://www.ecotonebrasil.com/armadilhas.html>

4.4.2 Identificação dos animais

A identificação das espécies capturadas foi feita utilizando-se a literatura específica (Fonseca *et al.* 1996, Eisenberg & Redford, 1999) analisando-se os caracteres morfológicos, comparando os indivíduos coletados com exemplares

referência depositados na Coleção de Mastozoologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.4.3 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras biológicas

4.4.3.1 Coleta das amostras

Entre janeiro e dezembro de 2008, foram coletadas amostras de tecido (pele de orelha e cauda), que foram acondicionadas em tubos *ependorfs* com solução de salina e antibiótico, e as amostras de sangue, acondicionadas em tubos de hemólise contendo EDTA. Nos meses de janeiro e março de 2010 foram coletadas amostras de tecido (pele de orelha e cauda, baço, fígado), colocadas em solução salina com antibiótico, e foram feitos “imprints” em lâminas a partir de biópsia destes tecidos e aspirado de medula óssea. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa para posterior visualização das amastigotas de *Leishmania* spp.. O sangue foi colocado em tubo de hemólise. As amostras coletadas foram transportadas em tubos de criopreservação no nitrogênio líquido até o Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, para posterior análise de presença de *Leishmania* spp. através da técnica de PCR.

4.4.3.2 Extração de DNA de sangue e tecido

Os fragmentos de pele de orelha e cauda, baço e fígado acondicionados em solução de salina com antibiótico foram submetidos à extração de DNA utilizando-se o kit *Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit*. Aproximadamente 20 mg de tecido foram pesados em balança de precisão e submetidos ao processo de extração, sendo o mesmo procedimento utilizado para extração de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos descrito anteriormente. A extração das amostras de sangue e medula óssea foi realizada utilizando o kit *Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit*, conforme especificação do fabricante.

4.4.3.3 PCR de gene constitutivo específico de mamíferos (IRBP)

Foi realizado o controle endógeno da PCR para diferentes espécies de mamíferos, hospedeiros de *Leishmania* spp. O objetivo da técnica utilizada foi constatar a presença da proteína Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) de 227 pb., comum a todas as espécies de mamíferos.

Os iniciadores utilizados foram IRBP _{fwd}: 5'TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3' e IRBP _{prev}: 5' GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3'. Foi utilizado o Kit illustra pureTaq Ready-To-Go™ PCR Beads® (GE Healthcare). Aos reagentes foi acrescentado 1,25 µl de cada iniciador a 20 pmol/ µl e 2 µl de DNA para 25 µl de solução final. O programa de amplificação foi iniciado a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg 72°C por 1 min) e encerrado a 72°C por 5 min. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base. Como controle negativo da reação, foi utilizado um tubo que continha todos os reagentes, exceto o DNA e no controle positivo, foi adicionado DNA purificado extraído de pele de cão.

Foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2% e corado pelo brometo de etídio para visualização dos produtos amplificados.

4.4.3.4 Nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de Leishmania

As amostras de DNA extraídas dos pequenos mamíferos foram submetidas à reação de LnPCR para detecção de DNA de *Leishmania* spp.. O procedimento foi idêntico ao descrito anteriormente para a detecção de DNA do parasito em flebotomíneos (item 4.3.3).

4.4.3.5 Sequenciamento para identificação da espécie de Leishmania spp.

O sequenciamento das amostras provenientes da segunda reação da LnPCR foi realizado segundo metodologia já descrita, para a identificação da espécie de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (item 4.3.5).

5 RESULTADOS

5.1 Flebotomíneos

5.1.1 Fauna

Durante o período de janeiro a dezembro de 2008 foram coletados 5.413 espécimes, sendo 2.851 fêmeas (52%) e 2.562 machos (48%).

A fauna flebotomínica encontrada no município foi composta por 2 gêneros (*Brumptomyia* e *Lutzomyia*), distribuída em 12 espécies: *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932), *B. nitzulescui* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia cortellezzii* (Brèthes, 1923), *L. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *L. ischyraantha* (Martins, Falcão & Silva, 1962), *L. lenti* (Mangabeira, 1938), *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *L. minasensis* (Mangabeira, 1942), *L. quinquefer* (Dyar, 1929), *L. sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), *L. termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964) e *L. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (TABELA 2). A espécie predominante foi *L. intermedia*.

No peridomicílio, foram capturadas 65% dos espécimes, enquanto 35% foram capturadas no intradomicílio (FIGURA 14). A relação dos flebotomíneos em relação ao ambiente e sexo está representada na TABELA 2.

O maior número de flebotomíneos foi observado no mês de fevereiro (33,1%) e nos bairros Village da Serra e Vila Isa, com os percentuais de 34% e 33%, respectivamente. A relação de flebotomíneos coletados mensalmente, de acordo com os bairros e sexo está representada na TABELA 3.

Em relação às capturas não sistemáticas, foram capturadas 608 fêmeas para a verificação da infecção natural, sendo distribuídas em 136 “pools”. Foi detectada a infecção natural em apenas 2 “pools” de flebotomíneos, correspondentes à espécie *L. longipalpis* (TABELA 4). Os “pools” formados variaram de 2 a 10 espécimes. Algumas espécies cujo número de captura foi reduzido foram analisadas individualmente.

TABELA 2: Flebotomíneos capturados em armadilha tipo HP segundo espécie, ambiente e sexo, no período de janeiro a dezembro de 2008 no município de Governador Valadares, MG.

Espécies	Intradomicílio		Peridomicílio		Total	%
	♀	♂	♀	♂		
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	-	1	-	-	1	0,01
<i>B. avellari</i>	-	4	-	13	17	0,31
<i>Brumptomyia</i> spp.	7	-	9	-	16	0,30
<i>Lutzomyia intermedia</i>	241	248	412	719	1620	29,93
<i>L. ischyraacantha</i>	141	62	292	125	620	11,46
<i>L. lenti</i>	17	23	197	217	454	8,39
<i>L. longipalpis</i>	43	190	61	355	649	11,99
<i>L. minasensis</i>	-	1	-	-	1	0,01
<i>L. quinquefer</i>	327	123	117	62	629	11,62
<i>L. sordellii</i>	-	-	2	1	3	0,05
<i>L. termitophila</i>	16	1	48	3	68	1,26
<i>L. whitmani</i>	17	42	44	131	234	4,33
<i>L. cortelezzii</i>	288	91	532	145	1056	19,51
<i>Lutzomyia</i> spp.	16	2	24	3	45	0,83
Total	1113	788	1738	1774	5413	100,00

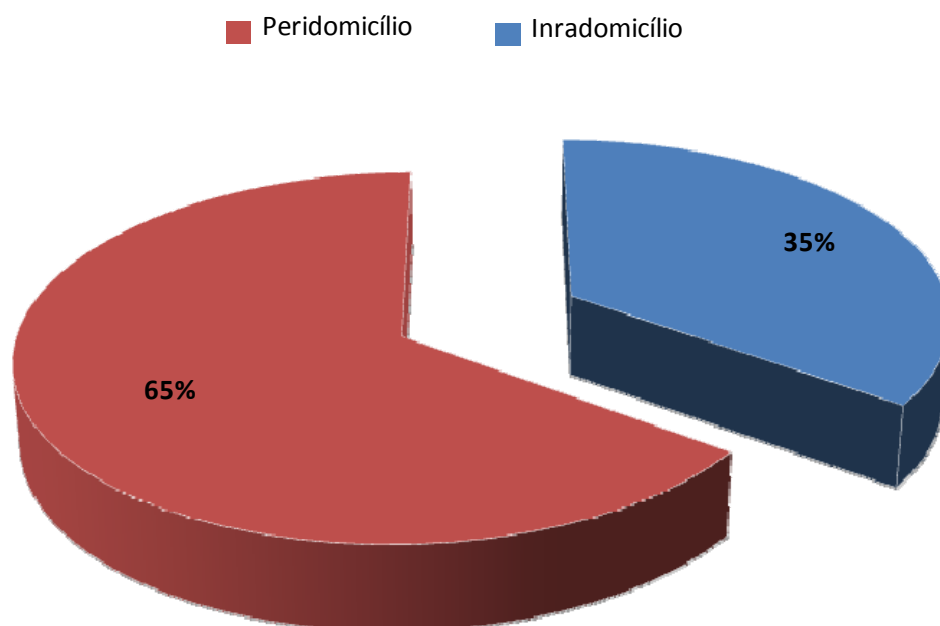


FIGURA 14: Comportamento de flebotomíneos capturados no município de Governador Valadares, no período de janeiro a dezembro de 2008, em relação à endofilia e exofilia

TABELA 3: Número mensal de flebotomíneos capturados com armadilha luminosa HP, segundo bairros e sexo no município de Governador Valadares, de janeiro a dezembro de 2008

Ano	Mês	Bairros								Total	
		Elvamar		Vila Isa		Vila Parque		Village da Serra		N	%
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
2008	jan	29	47	58	125	8	29	72	59	427	7.90
	fev	166	245	193	402	53	164	303	267	1793	33.13
	mar	45	72	85	143	24	62	169	179	779	14.40
	abr	29	39	103	99	19	32	154	90	565	10.44
	mai	13	19	70	107	23	36	89	72	429	7.93
	jun	9	11	40	35	11	10	21	14	151	2.80
	jul	9	7	13	13	6	7	8	3	66	1.22
	ago	25	11	89	62	57	49	4	1	298	5.51
	set	19	16	37	18	25	22	6	3	146	2.70
	out	20	19	18	19	23	25	8	25	157	2.91
	nov	5	8	8	16	7	11	68	28	151	2.79
	dez	133	41	26	17	14	15	149	56	451	8.34
Total		502	535	740	1056	270	462	1051	797	5413	100

TABELA 4: Espécies de flebotomíneos capturadas com armadilha luminosa tipo HP, nos meses de março/abril/maio/outubro/novembro e dezembro de 2009 e janeiro/fevereiro e março de 2010 (fêmeas capturadas, número de "pools" e número de "pools" positivos) no município de Governador Valadares, MG.

Espécies	Nº fêmeas capturadas	Nº "pools"	Nº "pools" positivos
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	63	27	0
<i>L. intermedia</i>	307	46	0
<i>L. ischyracantha</i>	42	11	0
<i>L. longipalpis</i>	78	21	2
<i>L. quinquefer</i>	65	18	0
<i>L. termitophila</i>	3	2	0
<i>L. whitmani</i>	50	11	0
Total	608	136	2

5.1.2 Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos

Os gráficos demonstrando a relação entre o número de flebotomíneos e os dados bioclimáticos de temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade estão demonstrados nas FIGURAS 15, 16 e 17, respectivamente. No período estudado, a população de flebotomíneos se mostrou mais elevada após o início da estação

chuvosa, nos meses de dezembro a abril, correspondendo a 74,21% dos espécimes coletados. O mês de fevereiro correspondeu ao maior número de espécimes capturados, 33,13%. Embora a umidade tenha apresentado uma pequena variação, nota-se que o número de flebotomíneos reduz nos meses em que ela é menor. De acordo com o coeficiente de correlação de Spearman, todas as variáveis climáticas apresentaram o coeficiente positivo em relação ao número de flebotomíneos, apesar de somente a pluviosidade e umidade mostrarem correlação significativa. A temperatura não mostrou relação significativa com o número de flebotomíneos (p -valor $> 0,05$). Os coeficientes de correlação de Spearman entre o número de flebotomíneos e as variáveis climáticas estão representados na TABELA 4.

Considerando-se apenas as três principais espécies vetoras capturadas, *L. intermedia*, *L. longipalpis* e *L. whitmani*, observa-se que após intenso período de chuvas (janeiro) há um aumento destas populações, sendo o seu pico observado no mês de fevereiro, com uma tendência a diminuir nos meses mais secos e frios (FIGURA 18).

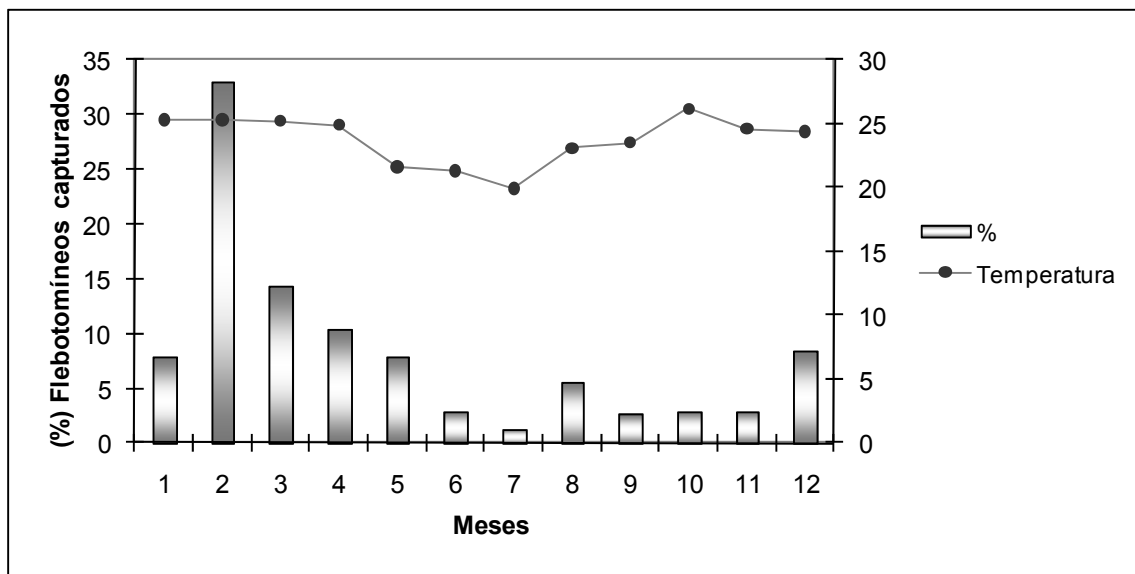


FIGURA 15: Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a temperatura em Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil, de janeiro a dezembro de 2008.

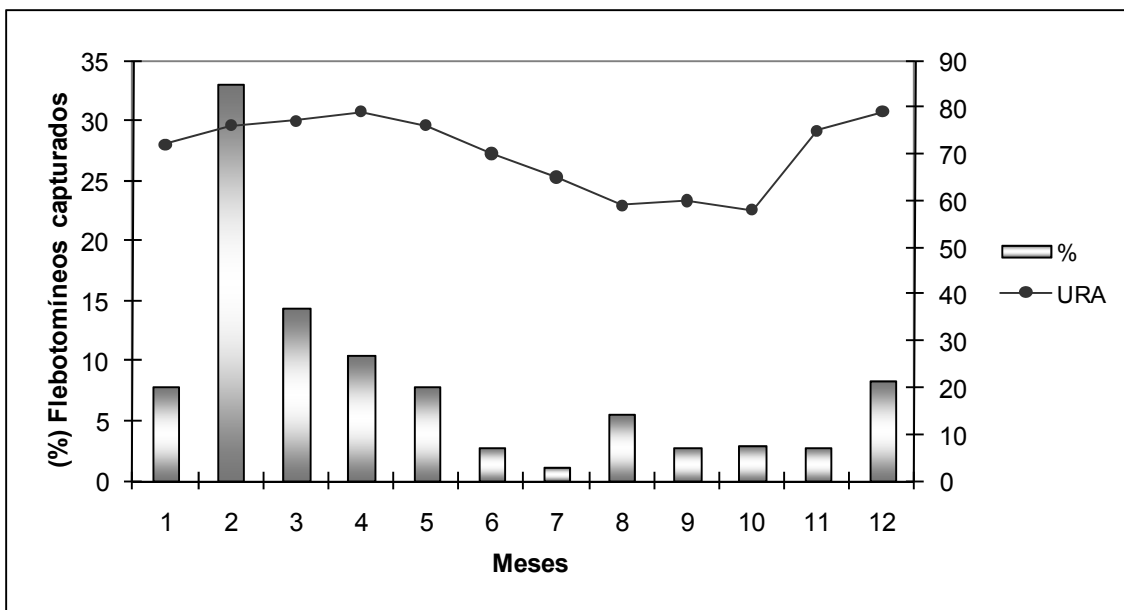


FIGURA 16: Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a umidade relativa do ar em Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil, de janeiro a dezembro de 2008.

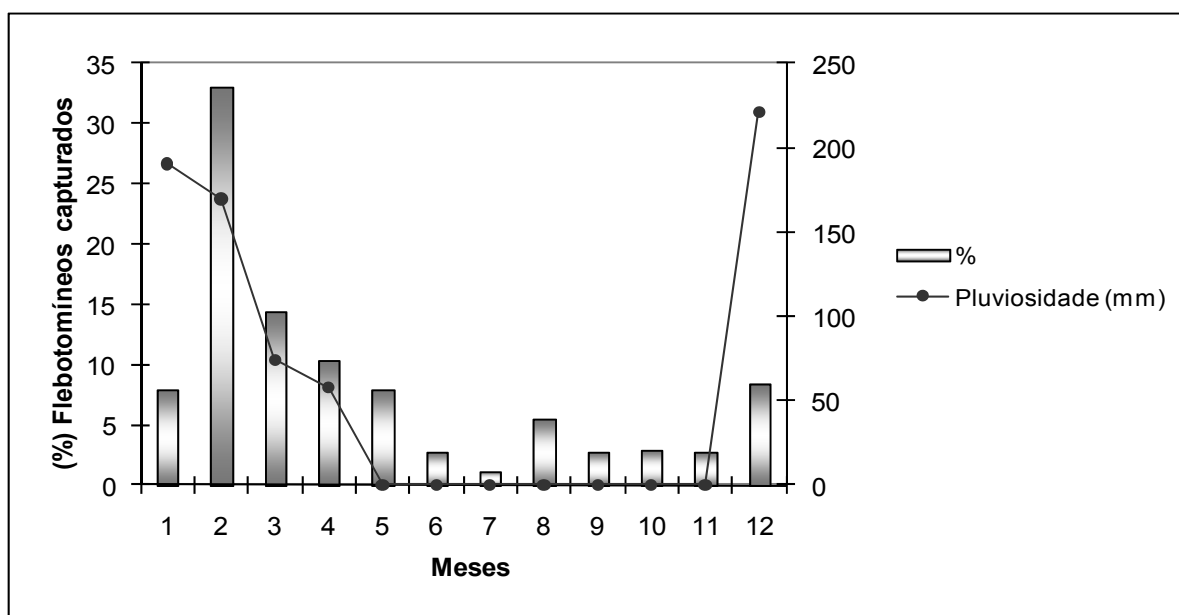


FIGURA 17: Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a pluviosidade em Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil, de janeiro a dezembro de 2008.

TABELA 5: Coeficiente de Correlação de Spearman entre o número de flebotomíneos e as variáveis climáticas (temperatura, umidade e pluviosidade), entre os meses de janeiro a dezembro de 2008.

Variável climática	Coef. Correlação	P-valor	N
Temperatura	0,550	0,064	12
Umidade	0,726	0,007	12
Pluviosidade	0,725	0,008	12

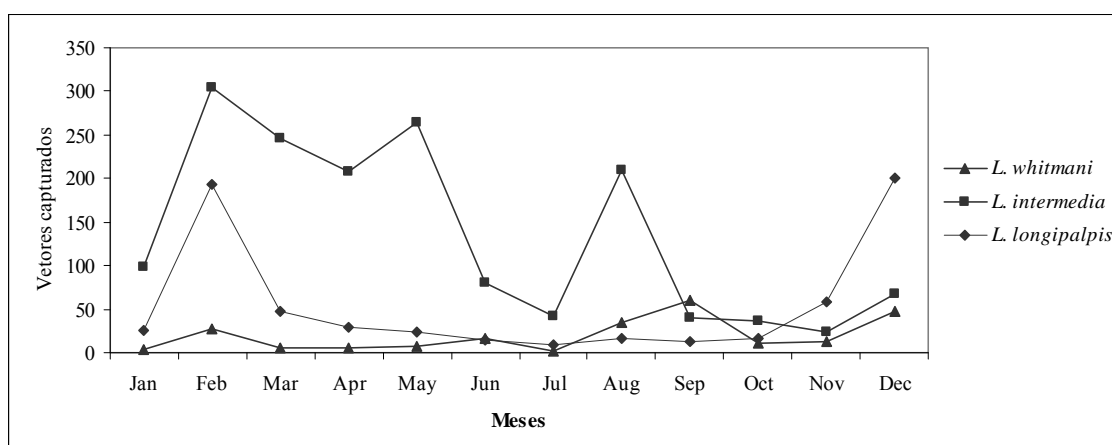


FIGURA 18: Distribuição mensal de espécies vetoras de flebotomíneos em Governador Valadares, no período de janeiro a dezembro de 2008.

5.1.3 Identificação do repasto sanguíneo de flebotomíneos

Foram capturadas 341 fêmeas ingurgitadas durante o período de estudo. Na TABELA 5, observamos a alimentação exclusiva em um determinado hospedeiro (76,8%), enquanto a TABELA 6 apresenta alimentação mista, em diferentes tipos de hospedeiros (23,2%). As fêmeas de flebotomíneos se alimentaram preferencialmente em aves (35,8%). Os demais percentuais dos tipos de alimentação em um único hospedeiro foram: boi (4,9%), cão (4,5%), cavalo (6,4%), gambá (1,9%), homem (4,5%), roedor (9,9%). Uma porcentagem de 31,6% do conteúdo estomacal dos flebotomíneos não reagiram frente aos anti-soros aplicados.

TABELA 6: Fêmeas de flebotomíneos capturadas que se alimentaram em apenas um hospedeiro, segundo o teste de precipitina com utilização de diferentes anti-soros, no período de janeiro a dezembro de 2008 em Governador Valadares, MG.

Espécies	Ave	Boi	Cão	Cavalo	Gambá	Homem	Roedor	Não reagente	Total
<i>L. capixaba</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>L. cortelezzii</i>	29	1	2	4	1	4	8	20	69
<i>L. intermedia</i>	22	2	2	3	1	5	3	13	51
<i>L. ischyracantha</i>	4	1	3	2	0	0	2	6	18
<i>L. lenti</i>	10	1	1	1	0	0	2	13	28
<i>L. longipalpis</i>	12	3	2	4	0	1	5	7	34
<i>L. quinquefer</i>	11	5	2	2	1	2	5	20	48
<i>L. termitophila</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>L. whitmani</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lutzomyia spp.</i>	5	0	0	1	0	0	1	4	11
Total	94	13	12	17	5	12	26	83	262

TABELA 7: Fêmeas de flebotomíneos capturadas que se alimentaram em mais de um hospedeiro, segundo o teste de precipitina com utilização de diferentes anti-soros, no período de janeiro a dezembro de 2008 em Governador Valadares, MG.

Hospedeiros	<i>L. ischyraantha</i>	<i>L. longipalpis</i>	<i>L. cortelezii</i>	<i>L. intermedia</i>	<i>L. quinquefer</i>	<i>L. lenti</i>	<i>L. whitmani</i>	<i>Lutzomyia</i> spp.	Total
Ave/boi	0	1	2	3	0	0	0	1	7
Ave/cão	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Ave/cavalo	0	0	3	3	1	0	0	0	7
Ave/gambá	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Ave/homem	0	1	5	0	0	0	0	0	6
Ave/roedor	1	1	0	1	0	0	1	0	4
Boi/cavalo	1	1	0	2	3	1	0	0	8
Cão/boi	0	0	3	0	0	0	0	1	4
Cão/cavalo	0	1	0	1	2	1	0	0	5
Cão/homem	2	1	3	2	0	2	1	1	12
Cão/roedor	1	0	3	1	0	0	0	0	5
Gambá/boi	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Homem/boi	0	1	0	1	0	0	0	0	2
Homem/cavalo	0	0	0	2	1	0	0	0	3
Roedor/boi	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Roedor/cavalo	0	1	0	0	1	1	0	1	4
Roedor/gambá	1	1	2	1	1	0	0	1	7
Total	6	10	22	20	9	5	2	5	79

5.2 Estudo de pequenos mamíferos

5.2.1 Fauna

A fauna de animais capturados no município no período entre janeiro e dezembro de 2008, compreendeu 5 espécies: *Calomys* sp., *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (FIGURA 19), totalizando 23 exemplares (TABELA 7); destes, 18 são roedores, sendo 13 fêmeas (56,5%) e 10 machos (43,5%). A espécie *Rattus norvegicus* apresentou a maior densidade capturada (65,2%). Nos meses de janeiro e março de 2010, foram capturadas 9 espécimes (TABELA 8) pertencentes às seguintes espécies: *Rattus rattus* (D), *Didelphis aurita* e *Mus musculus*. *D. aurita* e *R. rattus* apresentaram o maior número de espécimes capturados, com a proporção de 44,5% cada uma. Do total de animais capturados, 23 pertencem à ordem Rodentia e 9 à ordem Marsupialia. No primeiro e segundo períodos de coleta, o bairro Elvamar foi o que apresentou o maior número de espécimes capturados, correspondendo a 65,6% do total de animais (TABELA 9).

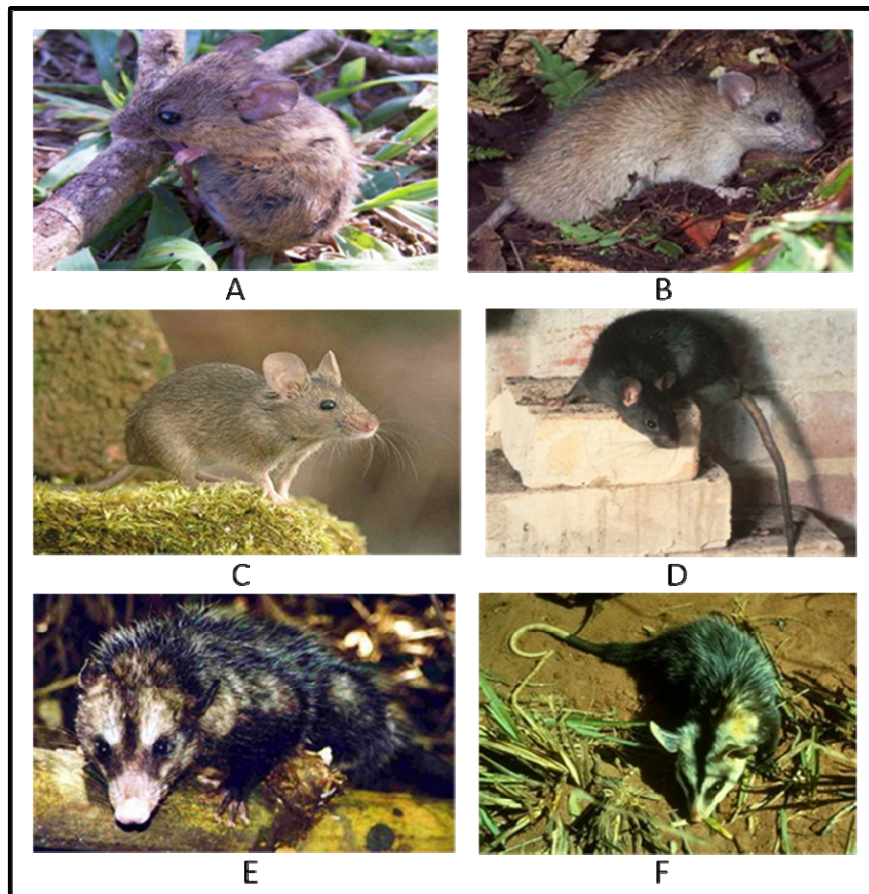


FIGURA 19: Pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) capturados no período entre janeiro a dezembro de 2008 e janeiro e março de 2010, no município de Governador Valadares, MG. **A:** *Calomys* sp.; **B:** *Rattus norvegicus*; **C:** *Mus musculus*; **D:** *Rattus rattus*; **E:** *Didelphis aurita*; **F:** *Didelphis albiventris*.

TABELA 8: Distribuição de espécies de mamíferos capturados no município de Governador Valadares, MG durante o ano de 2008.

Ano	Meses	<i>Calomys sp.</i>		<i>Didelphis albiventris</i>		<i>Didelphis aurita</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Rattus norvegicus</i>		Total
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
2008	jan	0	1	0	0	0	1	0	1	2	1	6
	mar	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	4
	mai	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	jul	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	set	0	0	1	1	0	0	0	1	2	3	8
	dez	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Total		1		2		3		2		15		23

TABELA 9: Distribuição de espécies de mamíferos capturados no município de Governador Valadares, MG nos meses de janeiro e março de 2010.

Ano	Meses	<i>Rattus rattus</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Didelphis aurita</i>		Total
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	
2010	jan	3	1	0	0	1	3	8
	mar	0	0	1	0	0	0	1
Total		4		1		4		9

TABELA 10: Distribuição de espécies de mamíferos capturados, segundo sexo e mês, capturados no município de Governador Valadares, MG durante o ano de 2008 e os meses de janeiro e março de 2010.

Espécies	Bairros								Total
	Elvamar		Vila Isa		Vila Parque Ibituruna		Vilage da Serra		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Calomys</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Didelphis albiventris</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>Didelphis aurita</i>	0	2	0	0	2	2	1	0	7
<i>Mus musculus</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	3
<i>Rattus norvegicus</i>	7	5	0	0	1	1	0	1	15
<i>Rattus rattus</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	4
Total	21		1		7		3		32

5.2.2 Diagnóstico parasitológico direto em lâminas

Foram analisados 39 “imprints” de aposições de tecidos (pele de orelha e cauda, baço, fígado, sangue) e aspirado de medula óssea, provenientes dos animais capturados nos dois últimos meses (janeiro e março/10), corados através de Giemsa. Em nenhum deles foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* spp.

5.3 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos e pequenos mamíferos

Foram analisadas 136 amostras (“pool” de flebotomíneos), e através da técnica de cacofonia (gene constitutivo do DNA de flebotomíneos), todas as amostras testadas se positivaram, apresentando um perfil de banda correspondente a 220 pares de base, validando tanto o processo de extração de DNA como os resultados negativos (FIGURA 20).

Um total de 119 amostras de tecido e sangue de pequenos mamíferos foram analisadas. Todas as amostras apresentaram a presença da proteína IRBP, correspondendo a 227 pb, indicando que a extração do DNA de mamíferos foi bem sucedida (FIGURA 21).

Com a realização da Nested PCR, o fragmento de 353 pb, característico do gênero *Leishmania* spp. foi observado em dois “pools” de flebotomíneos, capturados nos bairros Elvamar e Altinópolis, correspondendo à espécie *L. longipalpis*, ficando a taxa de infecção natural em 2,5%. O fragmento de 353 pb também foi encontrado

em uma amostra extraída de sangue de um roedor pertencente à espécie *Rattus norvegicus* (FIGURA 22).

Através do alinhamento das sequências de DNA encontradas nas amostras positivas para *Leishmania* spp. tanto de flebotomíneos como de mamíferos com as depositadas no GenBank, a caracterização da espécie de *Leishmania* spp. pôde ser realizada, confirmando ser a espécie *L. chagasi* presente nas três amostras analisadas (ANEXO 2).

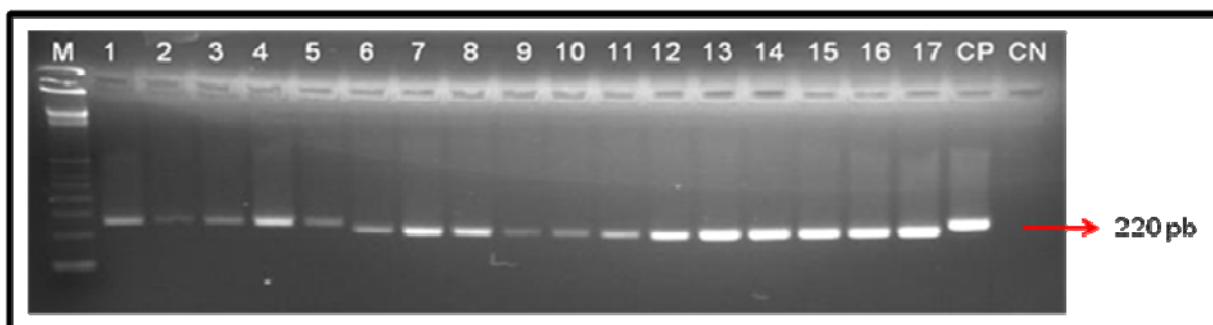


FIGURA 20: Produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos obtidos com iniciadores do gene da cacofonia IVS6 para *Lutzomyia* visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: **M**- marcador de peso molecular (100 pares de base). **1 a 17**- Amostras de DNA de flebotomíneos. **CP**- Controle positivo da Reação (*L. longipalpis*). **CN**- Controle negativo da reação (sem DNA).

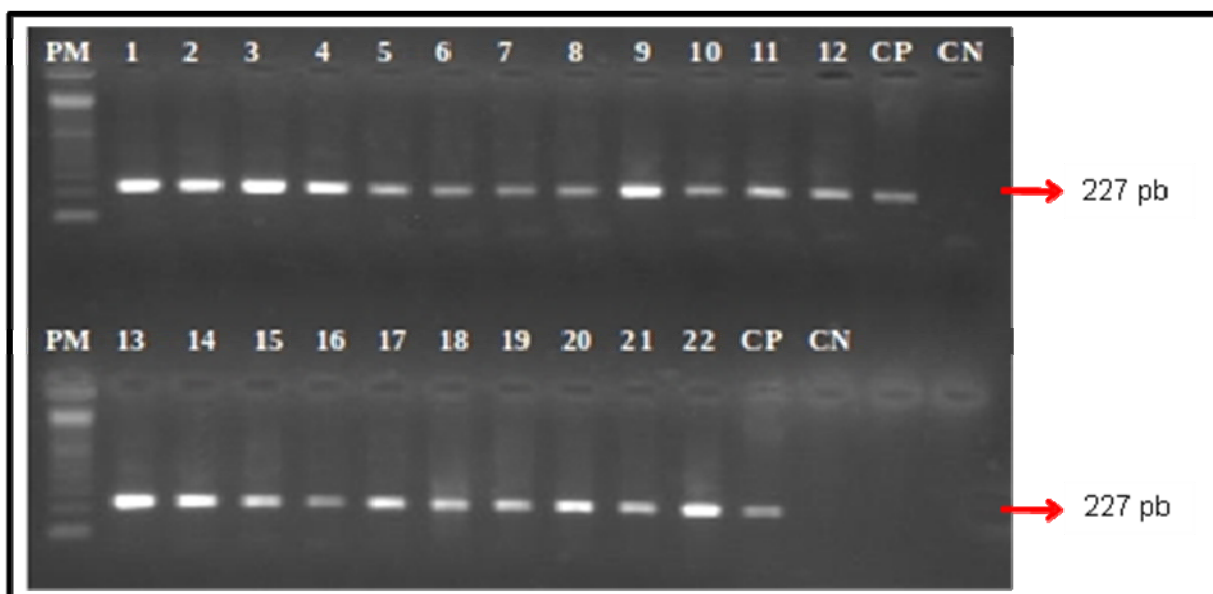


FIGURA 21: Produtos de amplificação de DNA de roedores, constatando a presença da proteína IRBP, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: **PM**- peso molecular 100 pb. **1 a 12**: Amostras de fígado, baço, pele de cauda e pele de orelha dos animais 1,2 e 3. **13 a 21**- Amostras dos mesmos tecidos dos animais 4 e 5 e pele de orelha do animal 6. **22**- Amostra de sangue de *Rattus norvegicus* (positiva para *Leishmania* spp.) **CP**- Controle positivo (DNA extraído de cão). **CN**- Controle negativo; **pb**- pares de base.

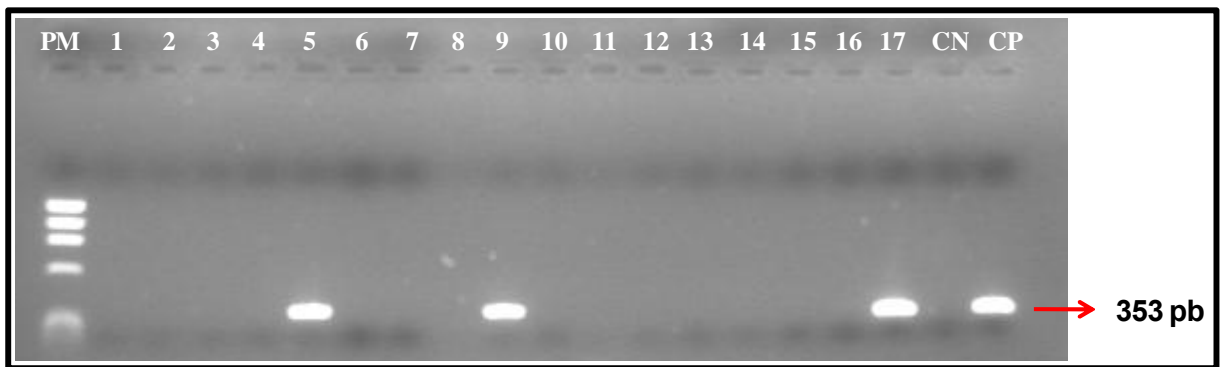


FIGURA 22: Produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos e roedores obtidos com iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb) visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: PM- peso molecular Φ x 174 pb. **5 e 9-** Amostras positivas de DNA de *L. longipalpis*. **17-** Amostra positiva extraída de sangue de *Rattus norvegicus*. **CN-** Controle negativo (sem DNA). **CP-** Controle positivo: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/74/M2930). pb: pares de base.

6 DISCUSSÃO

Até a década de 50, a leishmaniose tegumentar americana se disseminou praticamente por todo o território nacional, coincidindo com o desmatamento para a construção de estradas e instalação de aglomerados populacionais, atingindo principalmente os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco (Vale & Furtado, 2005). A partir da década de 80, verificou-se um aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 em 1980, a 37.710 em 2001, sendo os picos de transmissão observados a cada 5 anos (SVS/MS, 2007). No período de 2001 a 2006, em que houve um considerável crescimento de LTA no município de Governador Valadares, no Vale do Rio Doce, o número de casos em Minas Gerais também aumentou, porém em menor proporção, e o número de notificações em nível nacional diminuiu, durante o mesmo período.

Na região do Vale do Rio Doce, Mayrink *et al.* (1979) observaram que a transmissão da LTA era diferente de outras regiões endêmicas para a doença. Nestas, a doença atingia principalmente pessoas que tiveram contato com o ambiente florestal, por exemplo, na extração de madeira, construção de estradas, atividades de agricultura, enquanto no Vale do Rio Doce os pacientes acometidos não possuíam atividades relacionadas ao ambiente florestal, e alguns residentes relatavam ter pouco ou nenhum contato com estes ambientes.

O perfil de transmissão do município no período de estudo, se assemelha com a primeira descrição de Mayrink *et al.* (1979), pois, apesar do grande número de casos de LTA notificados serem de moradores de bairros pertencentes à zona urbana municipal, estes se encontram adjacentes ao Pico da Ibituruna, e mantém características rurais com pequenas porções florestais. Nestes bairros, além da transmissão domiciliar e peridomiciliar, acrescenta-se a possibilidade de transmissão rural e até mesmo florestal.

A fauna flebotomínica coletada em Governador Valadares apresentou-se diversificada, com a presença de 12 espécies, sendo três delas incriminadas como vetoras de leishmanioses no Novo Mundo: *L. intermedia* e *L. whitmani*, vetoras de *L. braziliensis* e *L. longipalpis*, principal vetora de *L. chagasi*. A ocorrência destas espécies no Vale do Rio Doce também foi registrada por Mayrink *et al.* (1979).

A espécie mais abundante capturada durante o período de estudo foi *L. intermedia* (29,9%), seguida por *L. cortelezzii* (19,51%). De acordo com o ambiente, o peridomicílio apresentou o maior número dos espécimes capturados (65%). O

encontro de 35% dos exemplares capturados no intradomicílio é importante do ponto de vista epidemiológico, pois sugere que a transmissão esteja ocorrendo também no interior das residências.

Em todos os bairros estudados, foi observado um número considerável de espécimes de flebotomíneos, podendo ser explicado pelas características semelhantes dos locais de captura, próximos aos remanescentes de mata e/ou peridomicílio com presença de matéria orgânica no solo. Os bairros Vila Isa e Village da Serra apresentaram o maior número dos exemplares capturados, provavelmente devido à presença de animais domésticos, como cão, galinha, cavalo, porco e boi, próximos aos locais de exposição das armadilhas.

Camargo-Neves *et al.* (2001) considera importante a análise da densidade do vetor e a correlação com aspectos ambientais do peridomicílio, como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando os possíveis criadouros dos vetores, e também a associação com animais domésticos, que são fonte de alimentação para os flebotomíneos. Neste, como em outros trabalhos, observa-se que a proximidade das moradias em relação às áreas verdes favorece o contato homem-vetor (Teodoro *et al.*, 1991, 1993; Condino *et al.*, 1998).

Um conjunto de características observadas nos bairros estudados e que provavelmente favorecem a ocorrência de flebotomíneos e de mamíferos reservatórios de *Leishmania* spp. no peridomicílio são abrigos de animais domésticos construídos muito próximo às habitações humanas, a ausência de boas condições de higiene no peridomicílio e a localização deste ao lado de remanescentes de mata (Teodoro *et al.*, 2001).

A espécie *L. intermedia* apresentou maior densidade tanto no intra como no peridomicílio em relação às demais. Esta espécie tem sido assinalada como a principal veiculadora do agente etiológico da LTA em diversas regiões do sudeste do Brasil (Aragão, 1922; Rangel *et al.*, 1984, 1986; Domingos *et al.*, 1998; Camargo-Neves *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2006). Ela está diretamente relacionada com a transmissão da LTA no domicílio e peridomicílio, como observado no Rio de Janeiro e em Ilha Grande (Aragão, 1922; Araujo-Filho, 1979). Em Minas Gerais, *L. intermedia* se apresenta bastante abundante em áreas afetadas pela LTA (Andrade-Filho *et al.*, 1997; Gontijo *et al.*, 2002). Saraiva *et al.* (2006) encontraram uma alta densidade de *L. intermedia* no Alto Caparaó e Caparaó, Minas Gerais, chamando a atenção para o fato de que as modificações antrópicas favorecerem o aparecimento da espécie, também observado no estudo de Rangel *et al.* (1986) em Vargem

Grande, onde descreveram elevada antropofilia de *L. intermedia*, abundante principalmente em ambientes artificiais.

A espécie *L. whitmani* foi capturada no município durante o período de estudo e, apesar de não ter sido encontrada em elevada densidade, apresenta um importante dado, pois a mesma é incriminada como vetora de *L. braziliensis* em algumas regiões do Brasil (Queiroz *et al.*, 1994; Luz *et al.*, 2000). Esta espécie foi a mais abundante em estudo realizado por Mayrink *et al.* (1979) no Vale do Rio Doce, no período de 1973 - 1974 e 1976 - 1977. No município de Sabará, Passos *et al.* (1993) encontraram esta espécie em elevada densidade tanto em áreas não urbanizadas como no ambiente doméstico, destacando a importância da mesma como vetor de LTA nesta região, e sugerindo sua adaptação ao ambiente domiciliar. No estado do Mato Grosso do Sul a espécie *L. whitmani* predominou, em muito, sobre as demais espécies e, através dos métodos de coleta, observou-se que esta espécie foi praticamente a única a manter contato mais estreito com o homem (Galati *et al.*, 1996).

Em Governador Valadares, a proporção de *L. intermedia* em relação a *L. whitmani* demonstra que a primeira é uma espécie melhor adaptada ao ambiente modificado e domiciliada, como observado por Souza *et al.* (2002). As fêmeas de flebotomíneos da espécie *L. intermedia* foram frequentemente capturadas no intra e peridomicílio, enquanto *L. whitmani* parece estar associada ao ambiente peridomiciliar e às áreas verdes.

O encontro da espécie *L. longipalpis*, vetora comprovada de *L. chagasi*, em elevada densidade, pode ter implicações importantes na transmissão da LV na região, visto que esta espécie está amplamente distribuída em todo o país e está presente em regiões onde a LV apresenta um problema para os programas de controle de saúde pública, como Teresina, Belo Horizonte, Araçatuba e São Luís (Santos *et al.*, 2003). A espécie está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados (Barata *et al.*, 2005), sendo frequentemente associada à presença de animais domésticos (Forattini, 1960).

A busca pelas fontes de alimentação é uma resposta comportamental que afeta a reprodução e a densidade populacional das espécies de flebotomíneos, e tem sido útil na compreensão da epidemiologia das leishmanioses, uma vez que permite a identificação dos hospedeiros sobre os quais os flebotomíneos se

alimentam e pode indicar os reservatórios potenciais de *Leishmania* spp. (Barata *et al.*, 2005).

Em Governador Valadares, a identificação do repasto sanguíneo foi maior em galinhas, como também assinalado em outros estudos (Aguiar *et al.*, 1987; Dias *et al.*, 2003; Barata *et al.*, 2005; Missawa *et al.*, 2008). O papel destes animais na epidemiologia da doença tem sido bastante discutido. Na literatura não há relatos de que as aves sejam reservatórios de *Leishmania* spp., e sim, refratárias à infecção (Dias *et al.*, 2003). Porém, servem como fonte de alimentação para os flebotomíneos e atraem potenciais reservatórios de *Leishmania* para próximo das habitações, possibilitando a instalação e manutenção do ciclo de transmissão (Rangel & Lainson, 2003). Sabe-se que os galinheiros próximos às casas servem como atrativos para os flebotomíneos, uma vez que este local é rico em matéria orgânica, torna-se propício ao desenvolvimento das formas imaturas, e assim, aumenta o contato dos vetores com os humanos, associação que possui grande importância epidemiológica, pois facilita a domiciliação do vetor (Afonso, 2008).

No presente trabalho, as espécies *L. intermedia* e *L. longipalpis* apresentaram hábitos ecléticos de alimentação, se alimentando em todos os animais cujos anti-soros foram testados: ave, cão, gambá, roedor, boi, cavalo e homem. Afonso *et al.* (2005) também observou, em área endêmica para LTA o perfil de alimentação eclético de *L. intermedia*, reforçando os dados já descritos de sua associação com o ambiente peridomiciliar e com reservatórios domésticos neste mesmo local (Rangel *et al.*, 1990). O caráter oportunista de *L. longipalpis*, podendo sugar ampla variedade de vertebrados já foi descrito em vários estudos (Passos-Dias *et al.*, 2003; Barata *et al.*, 2005; Missawa *et al.*, 2008). O fato destas espécies serem ecléticas quanto à fonte alimentar, pode explicar a baixa reatividade das mesmas ao anti-soro humano. A presença marcante das espécies *L. intermedia* e *L. longipalpis*, sua grande capacidade de adaptação aos ambientes modificados pelo homem, a capacidade destas se alimentarem em uma variedade de vertebrados, inclusive o homem, e seu registro como importantes vetoras da LTA e LVA, respectivamente, são de grande relevância epidemiológica.

A espécie *L. cortelezzii* foi a mais abundante nas capturas para preferência alimentar (26,6%) e demonstrou possuir hábitos ecléticos de alimentação. Estudos já mostraram que esta espécie é encontrada em diversos tipos de habitats, como raízes, troncos e copas de árvores, abrigos de animais e paredes internas e externas de habitações humanas (Aguiar & Medeiros, 2003). Em estudo no

município de Santa Luzia, MG, análises de PCR mostraram infecção de *L. cortelezzii* por *L. chagasi*, embora não seja possível inferir sobre a transmissão da LV nesta região pela espécie, já que outros estudos para analisar o potencial vetorial precisam ser realizados e não há evidências sobre o mesmo em outras regiões do Brasil (Carvalho *et al.*, 2008).

A captura de exemplares de *L. quinquefer* trouxe resultados interessantes no que diz respeito à preferência alimentar desta espécie, cuja alimentação se deu em uma variedade de animais de sangue quente. Galati (1990) assinalou que esta espécie pertence a um grupo que, provavelmente, se alimenta de animais de sangue frio. Brazil & Brazil (2003) também descreve este comportamento da espécie, dificultando sua criação em laboratório. Rangel *et al.* (1990) comentaram o encontro de *L. quinquefer* em equino em um foco de LTA em Mesquita, RJ. Em Corguinho, no Mato Grosso do Sul, Galati *et al.* (1996) observaram que na captura com isca humana foi encontrado um exemplar de *L. quinquefer* e consideraram se tratar de coleta acidental. Dando continuidade aos trabalhos realizados em Mesquita, Meneses *et al.* (2002) estudando a fauna local de flebotomíneos perceberam que a espécie *L. quinquefer* era atraída pelo homem em ambiente florestal. Salomón *et al.* (2009), na Argentina encontraram infecção natural por *Leishmania* nesta espécie, capturada no peridomicílio.

A não positividade de um considerável número dos exemplares de flebotomíneos analisados (não reagente), possivelmente tem relação direta com os anti-soros utilizados, pois os ensaios foram feitos somente com anti-soros dos animais mais comumente encontrados na região estudada.

Foi possível a detecção de espécimes alimentados em mais de uma fonte sanguínea. Este fato pode ser explicado pela dificuldade de se alimentar em um único hospedeiro devido aos seus movimentos de defesa ou devido à pouca ou quase nenhuma exposição na pele do mesmo ou dificuldade de localizar os capilares sanguíneos adequados na pele (Bongiorno *et al.*, 2003). O comportamento observado em flebotomíneos, de “provar” seus hospedeiros, até que se realize o repasto sanguíneo por completo, é um aspecto relevante no mecanismo de transmissão das leishmanioses.

Apesar da afinidade dos flebotomíneos a determinados tipos de hospedeiros, observou-se que há uma flexibilidade alimentar destes insetos, e as fêmeas ajustam seu padrão alimentar de acordo com a disponibilidade de fontes sanguíneas, evidenciado pelo ecletismo apresentado pelos mesmos. Outros estudos também

descrevem o comportamento oportunista desses dípteros (Christensen *et al.*, 1980; Bongiorno *et al.*, 2003; Muniz *et al.*, 2006).

Alguns fatores abióticos como temperatura, pluviosidade e umidade estão relacionados à ocorrência de flebotomíneos em determinadas áreas, seja por influência sobre os adultos ou pela modificação nos criadouros (Scorza *et al.* 1968; Miscevic, 1981).

Forattini (1960) analisando a influência da sazonalidade na densidade de flebotomíneos observou que nos meses mais quentes e úmidos há um aumento no número de espécies capturadas, enquanto nos meses secos e frios há uma redução considerável no número de exemplares, o que também foi verificado por Barata *et al.* (2004) e Dias *et al.* (2007). Nossos estudos corroboram com este padrão, apresentando maior densidade nos meses com altos índices pluviométricos e altas temperaturas. A umidade relativa do ar e a pluviosidade influenciaram significativamente no número de espécimes capturados em Governador Valadares, indicando que os flebotomíneos são sensíveis às variações de umidade e pluviosidade. A temperatura não foi um fator determinante da densidade de flebotomíneos, como demonstrado também em outros trabalhos (Missawa & Dias, 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009). O mesmo perfil foi observado por Barata *et al.* (2004) mostrando que estas duas variáveis influenciaram significativamente a densidade de flebotomíneos, enquanto a temperatura não teve efeito significativo sobre a população dos mesmos. No estado do Mato Grosso do Sul a densidade maior de flebotomíneos foi observada durante a estação chuvosa (Galati *et al.*, 1997). É importante salientar que não há uma regra; deve-se considerar que os fatores climáticos influenciam de modo variável a população de flebotomíneos, de acordo com a região estudada e com o padrão de distribuição de chuvas.

Considerando-se a densidade de *L. intermedia*, *L. whitmani* e *L. longipalpis* durante o período estudado, houve um aumento destas populações após o período chuvoso, com o pico de densidade no mês de fevereiro, apresentando tendência em reduzir nos meses mais secos e frios. Souza *et al.* (2004) observou em área de transmissão de LTA que as espécies *L. intermedia* e *L. whitmani* tiveram sua população sensivelmente aumentada após o período chuvoso, possivelmente devido às condições favoráveis encontradas nos microhabitats.

As mudanças drásticas ocorridas no ambiente, advindas das atividades humanas como o desmatamento, causam alterações no clima, modificando a

epidemiologia da LTA, o que culmina na invasão dos hospedeiros silvestres e dos vetores ao ambiente próximo ao homem, caracterizando a domiciliação do ciclo de transmissão (Costa *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2008). Neste sentido, há necessidade de uma reflexão sobre as implicações do quadro epidemiológico da LTA e o desenvolvimento de alternativas metodológicas mais eficientes para controlar esta doença. As atividades de controle de flebotomíneos têm sido baseadas na aplicação de inseticidas no domicílio e peridomicílio, apresentando eficácia variada (Marzochi & Marzochi, 1994). No entanto, o uso do controle químico continua sendo indispensável (Gomes & Neves, 1998).

Teodoro *et al.* (2003) no Paraná, avaliaram o impacto da reorganização e limpeza do peridomicílio e da aplicação de inseticidas nas residências e abrigos de animais domésticos visando o controle da LTA e observaram uma redução expressiva no número de flebotomíneos, o que pode ter contribuído para a diminuição do risco de transmissão para o homem e para os animais domésticos.

As investigações epidemiológicas sobre a ecologia dos flebotomíneos, como os estudos de variação sazonal são importantes, para melhor entender a interação da espécie com seu hábitat, assim como a dinâmica de transmissão da leishmaniose, e assim poder direcionar melhor os métodos de controle, como a aplicação de inseticidas (Macedo *et al.*, 2008). É importante salientar que o aprimoramento das ações de controle depende dos estudos dos vetores, de reservatórios, agentes, e outros determinantes epidemiológicos.

Considerando a distribuição de flebotomíneos e as variáveis climáticas no período de estudo, o uso de inseticidas nos bairros estudados é possível, visto que os mesmos se encontram em transição entre a área silvestre e o meio urbano. É recomendado que o controle químico seja feito nos meses em que a densidade de flebotomíneos está elevada e os índices pluviométricos estejam baixos, a fim de impedir a reprodução dos adultos e a consequente elevação dos índices de transmissão nos meses pós- chuva.

Os ciclos de transmissão das leishmanioses dependem do movimento de seus reservatórios e a identificação destes hospedeiros é de fundamental importância para o entendimento da epidemiologia e controle efetivo de transmissão da doença. O direcionamento das capturas de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) baseou-se em estudos anteriores que indicam espécies desses grupos como possíveis reservatórios de LTA (Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

No presente levantamento, foi registrada a ocorrência de seis espécies, sendo quatro pertencentes à ordem Rodentia e duas à ordem Marsupialia. As espécies *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*, pertencentes à família Muridae, subfamília Murinae, tem sua origem no Velho Mundo e foram introduzidos na colonização européia. São consideradas espécies sinantrópicas comensais e possuem distribuição cosmopolita. O primeiro possui hábito terrestre. Atualmente é encontrado predominantemente próximo a estabelecimentos humanos (Eisenberg & Redford, 1999). A segunda possui hábito semi-aquático, vivendo de preferência à beira de águas doces, salobras ou salgadas; frequenta geralmente instalações de animais domésticos. A espécie *Mus musculus* vive essencialmente nas habitações humanas e assim como *Rattus norvegicus*, cava galerias no solo principalmente onde há criação de animais, podendo formar numerosos complexos onde houver oferta de alimento. As espécies da subfamília Murinae, apresentam uma característica biológica marcante: a capacidade reprodutiva durante todo o ano. Isso pode explicar a maior abundância de indivíduos pertencentes à espécie *R. norvegicus*, capturados durante a primeira campanha neste estudo.

O gênero *Calomys* (Cricetidae: Sigmodontinae), inclui várias espécies encontradas na América do Sul (Póvoa & Brandeburgo, 2007). É mais frequentemente encontrado em áreas abertas, particularmente em vales e campos úmidos e ao longo de florestas ribeirinhas (Emmons, 1997; Lima, 2000).

Os exemplares pertencentes à ordem Didelphidae capturados, *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*, são consideradas espécies sinantrópicas, de hábitos onívoros e oportunistas e vivem tão bem em ambientes de florestas como em áreas urbanas e ambientes modificados pelo homem (Fonseca *et al.*, 1982; Gardner, 2005; Cerboncini *et al.*, 2009).

Dos quatro bairros pesquisados, verificou-se que o bairro Elvamar apresentou o maior número de exemplares capturados, com uma predominância de *R. norvegicus*, podendo ser explicado pelos locais de exposição das armadilhas no peridomicílio, próximos a remanescentes de mata com presença de corpos d'água e próximos a um curral onde havia presença de animais domésticos.

Em um estudo de caráter epidemiológico, a identificação das espécies vetoras e hospedeiros potenciais, o conhecimento da biologia e a determinação da taxa de infecção natural dos mesmos, principalmente nas áreas endêmicas para leishmaniose, são de fundamental importância para o entendimento da cadeia de

transmissão da doença e para a proposição de medidas de controle direcionadas à área de estudo.

A utilização de métodos moleculares como a PCR constitui-se atualmente a principal abordagem de diagnóstico molecular de pesquisadores e profissionais da saúde. A infecção de flebotômíneos por *Leishmania* spp. era mais frequentemente investigada através da dissecação do inseto e observação direta do parasito. Porém este método é laborioso e requer grande habilidade técnica, devido ao tamanho reduzido dos insetos (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006). O desenvolvimento da PCR constitui-se uma alternativa prática e vantajosa, devido à alta sensibilidade e especificidade, e tem sido utilizada na detecção de DNA de *Leishmania* spp. em amostras clínicas, de vetores e reservatórios animais (Rodrigues *et al.*, 2002; Oliveira-Pereira *et al.*, 2006; Brandão-Filho *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2007).

A sensibilidade da PCR pode ser aumentada pelo uso de iniciadores que apresentam mais de uma cópia por célula; no caso de *Leishmania* essas sequências incluem o cinetoplasto e famílias de genes de multicópias. Entre estes últimos, o mais estudado é o SSUrRNA. Van Eys *et al.* (1992) desenharam os pares de iniciadores R221 E R332 (R1 e R2 neste trabalho) que amplificam uma região menos específica de 603 pb e R223 E R333 (R3 e R4 neste trabalho) que amplificam uma região de 353 pb somente de espécies do gênero *Leishmania* (menos sensível). Em 2002, Cruz *et al.* sugerem a combinação destes dois pares de iniciadores em uma Nested PCR para detectar *Leishmania* em humanos, aumentando a sensibilidade e especificidade da reação.

Recentemente, o sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de diferentes genes alvo tem sido realizado e utilizado junto com o alinhamento das sequências obtidas como uma forma de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (Parvizi *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2008). Ferreira (2010), comparando diferentes técnicas de PCR em amostras de população canina e pequenos mamíferos oriundos da mesma área endêmica para diferentes formas de leishmanioses, observou que a partir do momento que se obteve o produto amplificado, a identificação da espécie de *Leishmania* por sequenciamento foi mais eficaz do que a análise pela digestão por enzimas de restrição (PCR RFLP).

A contaminação da PCR neste estudo pôde ser evitada pela utilização de controles negativos e controles internos da extração, tanto para flebotômíneos (cacofonia) quanto para os mamíferos (IRBP), validando assim tanto o processo de extração quanto a confirmação dos resultados negativos.

Dos 136 “pools” de flebotomíneos analisados, a infecção foi observada em dois pertencentes à espécie *L. longipalpis*, e através do sequenciamento, identificou-se a infecção pela espécie *L. chagasi*. O bairro Altinópolis, de onde os exemplares de um dos “pools” infectados foram capturados, possui a localização mais central, e o outro, Elvamar, está localizado próximo ao Pico da Ibituruna, e é considerado pertencente à zona urbana. Este dado mostra a adaptação desta espécie ao ambiente modificado pelo homem e a possibilidade de urbanização da transmissão da LV em Governador Valadares.

Neste estudo a taxa de positividade dos flebotomíneos foi de 2,5%. A baixa taxa de infecção destes insetos em áreas endêmicas é um fato descrito por vários autores. Miranda *et al.* (2002) e Oliveira-Pereira *et al.* (2006) observaram uma taxa semelhante a encontrada neste estudo na Bahia e na Amazônia Maranhense, respectivamente. Pita-Pereira *et al.* (2005) relatou taxa de positividade de 2% no Rio de Janeiro. Geralmente, as taxas de infecção natural de flebotomíneos nos focos endêmicos variam em torno de 0,2%, contrastando com a alta incidência da doença nestas regiões (Rodriguez *et al.*, 1999; Luz *et al.*, 2000). Em região endêmica para LTA no estado da Bahia, Vexenat *et al.* (1986) não encontraram infecção natural em 1.832 fêmeas dissecadas. No Vale do Rio Doce, Mayrink *et al.* (1979) dissecaram 1.194 fêmeas entre os anos de 1975-76 e não encontraram nenhum flebotomíneo infectado por *Leishmania*.

Com relação à pesquisa sobre a participação de possíveis hospedeiros no ciclo de transmissão da leishmaniose, as capturas foram direcionadas aos pequenos mamíferos, pois há relatos de encontro de diversas espécies destes servindo de fonte de infecção para flebotomíneos em áreas endêmicas para LTA, como é o caso de Governador Valadares. Assim, neste estudo epidemiológico, usando ferramentas moleculares (sequenciamento) foi possível identificar no sangue extraído de um roedor sinantrópico, *Rattus norvegicus*, a infecção pela espécie *L. chagasi*. Melo (2008) encontrou 2 exemplares deste roedor infectados com parasito *Leishmania* do subgênero *Viannia* em Belo Horizonte, considerada endêmica para LTA e LVA. Ferreira (2010) também encontrou infecção por *Leishmania* do complexo *braziliensis* neste roedor, nesta mesma área de estudo. Como *R. norvegicus* é um roedor sinantrópico, estando em contato próximo ao homem, pode servir como um elo na cadeia epidemiológica de transmissão da doença, da área silvestre para o meio urbano. A detecção de infecção natural por *Leishmania* sp. em um mamífero,

significa que é um hospedeiro, mas não é suficiente para incriminá-lo como reservatório.

No sudeste de Minas Gerais, a região do Vale do Rio Doce, juntamente com os vales do Aço e do Mucuri, foi considerada endêmica para LV e LTA (Mayrink *et al.*, 1979). Após o início do programa de controle para Leshmaniose Visceral Canina, o Vale do Rio Doce passou a ser considerado uma área controlada para LVC, servindo de modelo para o programa de controle da LV (Mayrink *et al.*, 1979). De acordo com Coelho & Falcão (1966), antes da aplicação das medidas de controle, foram diagnosticados 130 casos de LV humana principalmente em Governador Valadares e nas cidades vizinhas. Desde então, somente casos de LTA e poucos casos de LV não autóctones foram diagnosticados. Porém, no início da década de 90, o programa de controle da LVC foi interrompido e a vigilância epidemiológica não estava sendo realizada regularmente. A partir daí houve indícios da reemergência da LV, com focos novos e antigos em diversos municípios da região (Malaquias *et al.*, 2007).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de 2001 a 2006, 5 casos humanos de LV foram notificados em Governador Valadares. De 2007 até o início de 2008 não haviam sido registrados casos humanos da doença, mesmo com uma soroprevalência canina alta em alguns bairros do município. Contudo, até o final deste mesmo ano, foram confirmados 14 casos humanos de LV, com 3 óbitos. Já em 2009, 45 casos suspeitos foram notificados, sendo 27 confirmados. Destes, foram registrados 8 óbitos por LV, sendo motivo de preocupação dos órgãos de saúde responsáveis pela vigilância epidemiológica (SVS GV). A alta taxa de soroprevalência canina nos inquéritos sorológicos realizados nos anos de 2008 e 2009 em diversos bairros e o crescente número de casos humanos distribuídos por todo o município torna urgente a tomada de medidas por parte dos órgãos competentes do Município e do Estado.

O encontro da espécie *L. longipalpis* infectada pela espécie *L. chagasi* e se alimentando em diversas espécies de hospedeiros mamíferos, inclusive o homem, indica a urgência de uma vigilância entomológica rigorosa e de ações que visem diminuir o ambiente propício de contato dos flebotomíneos com os animais domésticos, pois provavelmente estes servem como fonte de infecção para o flebotomíneo e o homem se infecta acidentalmente. Apesar do foco do estudo ser a LTA, os achados foram surpreendentes, como o encontro de *L. longipalpis*, vetor comprovado da LV, infectado por *L. chagasi* e de um roedor sinantrópico infectado

pela mesma espécie do parasito em área urbana. Estas observações coincidiram com o surto da LV no município, comprovando a importância dos estudos envolvendo a biologia, ecologia, comportamento e análise de infecção natural de vetores e hospedeiros para o entendimento da epidemiologia da doença na área de estudo.

7 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínica de Governador Valadares apresentou exemplares pertencentes a 2 gêneros e 12 espécies, dentre elas, importantes espécies vetoras da LT e LV, sendo *L. intermedia* a espécie mais numerosa.

O encontro de *L. intermedia* em elevada densidade nos bairros estudados, tanto no intra como no peridomicílio, e sua implicação na literatura como importante vetora da LTA, sugere que esta seja a principal responsável pela transmissão da doença em Governador Valadares.

O grande número de exemplares de *L. longipalpis* capturados e o encontro de infecção natural por *Leishmania chagasi* incriminam esta espécie como vetora da LV na área.

O encontro de *R. norvegicus* infectado por *L. chagasi* e outros relatos da infecção deste roedor por *Leishmania* sp. levantam a hipótese de que este seja possivelmente um importante reservatório desta espécie de *Leishmania* em áreas urbanas.

A presença do vetor incriminado na transmissão de *L. chagasi* no município e de um hospedeiro infectado pela mesma espécie do parasito nos bairros estudados, sugere que o ciclo da LV em Governador Valadares tenha um perfil urbano de transmissão.

O encontro de importantes espécies vetoras, como *L. intermedia* e *L. longipalpis* se alimentando em várias espécies de animais e em mais de uma espécie ao mesmo tempo, demonstra o caráter oportunista de alimentação destes insetos.

De acordo com análises entre a densidade de flebotomíneos e os dados climáticos, os meses de março, abril e maio são os mais indicados para o controle químico vetorial no intra e peridomicílio dos bairros estudados no município.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de um hospedeiro e do vetor infectados por *L. chagasi* na área urbana oferece risco de transmissão para o homem. Assim, as medidas de controle, como aplicação de inseticidas nas casas e uma reorganização do ambiente, de modo a não oferecer um local propício para o desenvolvimento dos flebotomíneos, diminuindo também a disponibilidade de fontes sanguíneas, poderiam ser dirigidas para o controle tanto da LTA como da LV no município.

Santos *et al.* (2000) propõe a participação comunitária nas ações de controle de grandes endemias, uma vez que os programas direcionados à prevenção da LTA em relação aos reservatórios e vetores, tem esbarrado em dificuldades operacionais, representadas pelas condições ambientais em que a zoonose prevalece. Os conhecimentos sobre a circulação da LTA, assim como sua percepção pela população local, são de grande importância para o estabelecimento de campanhas de controle, pois mobiliza a comunidade em ações sanitárias (Uchôa *et al.*, 2004).

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1: Autorização do IBAMA para realização de atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 10077-1	Data da Emissão: 23/04/2008 10:35	Data de Validade: 23/04/2009
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 1812048	Nome: Ricardo Andrade Barata	CPF: 003.630.336-45
Título do Projeto: Estudo eco-epidemiológico da leishmaniose tegumentar no município de Governador Valadares, Vale do Rio Doce (Minas Gerais, Brasil)		
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Karla de Sena Guedes	Bióloga; execução de técnicas moleculares	046.161.886-96	11277372 SSP-MG	Brasileira
2	João Carlos França da Silva	Colaborador; veterinário responsável pela coleta de amostras	245.607.156-53	382639 SSP-MG	Brasileira
3	Gustavo Fontes Paz	Colaborador; veterinário; processamento das amostras	027.999.166-51	M7006563 SSP-MG	Brasileira
4	Edelberto Santos Dias	Vice-coordenador de pesquisa	311.276.736-53	447889 SSP-MG	Brasileira
5	Maria Olímpia Garcia Lopes	Bióloga; captura e identificação de pequenos mamíferos	031.874.296-96	M-8138842 SSP-MG	

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BELO HORIZONTE	MG	Centro de Pesquisas René Rachou	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Diptera, Rodentia, Siphonaptera, Ixodidae, Didelphimorphia
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Siphonaptera (*Qtde: 30), Ixodidae (*Qtde: 30), Rodentia (*Qtde: 40), Didelphimorphia (*Qtde: 20), Diptera (*Qtde: 500)

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 76191941



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 10077-1	Data da Emissão: 23/04/2008 10:35	Data de Validade: 23/04/2009
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 1812048	Nome: Ricardo Andrade Barata	CPF: 003.630.336-45
Título do Projeto: Estudo eco-epidemiológico da leishmaniose tegumentar no município de Governador Valadares, Vale do Rio Doce (Minas Gerais, Brasil)		
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de captura/coleta
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	SOCIEDADE MINEIRA DE CULTURA - PUC/MG	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 76191941



Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 10077-1	Data da Emissão: 23/04/2008 10:35	Data de Validade: 23/04/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1812048	Nome: Ricardo Andrade Barata	CPF: 003.630.336-45
Título do Projeto: Estudo eco-epidemiológico da leishmaniose tegumentar no município de Governador Valadares, Vale do Rio Doce (Minas Gerais, Brasil)		
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 76191941



Página 3/3

9.2 ANEXO 2: Alinhamento das sequências de DNA de flebotomíneos e roedores

GV 05: *L. longipalpis*
 GV 09: *L. longipalpis*
 GV 17: *R. norvegicus*

```

L_braziliensis(M80292) TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTGCCTCCGGTGC
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430) .....C.....~.....A.
GV 05 a .....c.....~.....A.
GV 05 b .....C.....~.....A.
GV 09 a .....C.....~.....A.
GV 09 b .....C.....~.....A.
GV 17 a .....C.....~.....A.
GV 17 b .....c.....~.....A.

```

```

L_braziliensis(M80292) GGGCTCCGGTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAG
L_amazonensis(M80293) .A.....
L_chagasi (M81430) .A.....
GV 05 a .A.....
GV 05 b .A.....
GV 09 a .A.....
GV 09 b .A.....
GV 17 a .A.....
GV 17 b .A.....

```

```

L_braziliensis(M80292) GGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGA
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430) .....
GV 05 a .....
GV 05 b .....
GV 09 a .....
GV 09 b .....
GV 17 a .....
GV 17 b .....

```

```

L_braziliensis(M80292) CGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGA
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430) .....
GV 05 a .....
GV 05 b .....
GV 09 a .....
GV 09 b .....
GV 17 a .....
GV 17 b .....

```

```

L_braziliensis(M80292) GATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCCACTGCAAACGATGACACCCATGAATTG
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430) .....
GV 05 a .....
GV 05 b .....
GV 09 a .....
GV 09 b .....
GV 17 a .....
GV 17 b .....

```

```

L_braziliensis(M80292) GGGATCTTATGGGCCCGCCTGCGGCAGGGTTTACCCTGTGTCCAGCACCGCGCCCGCTTT
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430) .....
GV 05 a .....
GV 05 b .....
GV 09 a .....
GV 09 .....
GV 17 a .....
GV 17 b .....

```


9.3 ANEXO 3: Artigo científico publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

**Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from Governador Valadares, a
Transmission Area of American Tegumentary Leishmaniasis in State of Minas Gerais,
Brazil**

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Governador Valadares, área de transmissão de
Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Minas Gerais, Brasil.

Ricardo Andrade Barata^{1,2}, Gustavo Fontes Paz², Marcela Cardoso Bastos², Roberta
Christiane Oliveira Andrade², Daniela Campos Mendes de Barros², Fabiana Oliveira Lara e
Silva², Érika Monteiro Michalsky², Aimara Costa Pinheiro³ and Edelberto Santos Dias²

1. Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri, 2. Centro de Pesquisas René
Rachou/Fiocruz, 3. Secretaria Municipal de Saúde/Governador Valadares.

Correspondence:

Dr. Ricardo Andrade Barata

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Departamento de Ciências Biológicas

Campus JK, BR 367, Alto da Jacuba, 39100-000, Diamantina, MG

e-mail: ricbarata@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction. A study of the phlebotomine sand fly fauna was carried out in an endemic area of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Governador Valadares County, in the state of Minas Gerais, Brazil. **Methods.** Captures were undertaken with HP light traps in four districts, three nights per month, during a year (from January to December, 2008). The correlation between climatic factors (temperature, humidity and rainfall) and the numbers of sandflies collected was observed. **Results.** Altogether 5,413 phlebotomine specimens were captured and identified as belonging to 12 species. Of those specimens, 2,851 (52%) were females and 2,562 (48%) were males. *Lutzomyia intermedia* predominated (29.93% of the species captured), suggesting that they are responsible for ATL transmission, together with *L. whitmani*, that was also found in the area (4.33%). The presence of *L. longipalpis* (11.99%), the main vector of visceral leishmaniasis in Brazil, is an important fact, calling for rigorous entomologic surveillance of the area.

Keywords American tegumentary leishmaniasis. Phlebotominae. *Lutzomyia*. Sandflies. Governador Valadares.

RESUMO

Introdução. Um estudo da fauna de flebotomíneos foi realizado em uma área endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no município de Governador Valadares, no estado de Minas Gerais, Brasil. **Métodos.** Capturas foram feitas com armadilhas luminosas HP em quatro bairros, três noites por mês, durante o período de janeiro a dezembro de 2008. A correlação entre fatores climáticos (temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade) e o número de flebotomíneos coletados foi avaliada. **Resultados.** Foram capturados 5413 espécimens de flebotomíneos, distribuídos em 12 espécies, sendo 2851 fêmeas (52%) e 2562 machos (48%). **Conclusões.** *Lutzomyia intermedia* foi predominante com 29.93% das

espécies capturadas, sugerindo ser a responsável pela transmissão de LTA, juntamente com *L. whitmani*, que também foi encontrada na região (4.33%). A presença de *L. longipalpis* (11.99%), principal vetor de LV no Brasil, é um dado relevante tornando-se necessário uma rigorosa vigilância entomológica na região.

Palavras-chave Leishmaniose Tegumentar Americana. Phlebotominae. *Lutzomyia*. Flebotomíneos. Governador Valadares.

In Brazil, American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a relevant public health problem due to the increase in the number of human cases. The infection can cause mutilating lesions and lead to a loss of working conditions and even death¹. During recent years, the significant increase in deforestation has favored the adaptation of vectors to anthropic environments and consequently increased human exposure to the parasite². The circulation of *Leishmania* in domestic environments has favored the emergence of a distinct profile of the transmission of the disease different from the classical pattern³ and associated with a wider range of activities.

Nowadays, in Minas Gerais state (MG), ATL is present in practically all counties, in areas where highways and hydroelectric power stations were built and where clusters of people were settled⁴. Besides the permanence in old endemic focuses in the Atlantic forest, in Rio Doce and Mucuri valleys⁵ numerous cases were also reported in urban areas of cities large and medium-sized, such as Belo Horizonte, Montes Claros and Governador Valadares.

Governador Valadares, in MG, was considered an endemic area, presenting 221 new cases of ATL between 2004 and 2007, with approximately 75% of cases in the urban area. In the 70's, Mayrink et al⁵ in an epidemiological study in county of Caratinga, near to Governador Valadares, recorded the presence of *Lutzomyia whitmani* and *L. intermedia*, know to transmit *Leishmania braziliensis* in southeast Brazil⁶.

The aim of the present study was to identify the phlebotomine fauna and some aspects of the population's behavior, such as frequency to peri and intradomiciliary environments, seasonal variation of the species implicated as vectors of leishmaniasis and the influence of climatic factors on the species density, seeking a better understanding of the transmission cycle of ATL in the municipality, as well as to associate the data obtained with the risk of *Leishmania* transmission to subsidize applicable controlling actions in the area.

1.1.2 MATERIAL AND METHODS

Study area - Governador Valadares county (18° 51' 12'' S and 41° 56' 42'' W) is included in the Administrative Area of Rio Doce valley. The total area of the county is 2,349 km², characterized by the predominance of hills, with altitude levels between 191 and 1,008 m above sea level. The climate is classified, according to Koppen, as the AW type - tropical sub warm and sub dry, with annual average temperatures of 25,6° C and annual average rainfall around 1,350 mm.

Capture sites - The systematic captures were carried out with luminous traps HP type⁷ from January to December 2008. Sixteen traps were distributed at 4 neighborhoods of the county (Elvamar, Vila Isa, Vila Parque Ibituruna and Village da Serra), 2 in intradomiciles and 2 in peridomiciles. These neighborhoods are characterized by being transitional environments between urban area and an area of environmental preservation. These traps were exposed from 4 00PM to 8 00AM, during 3 consecutive nights, every month, always on the last week of each month.

Phlebotomine identification - The taxonomic keys of Young and Duncan⁸ and Forattini⁹ were used for identification of the sand fly species. Specimens with missing or damaged characters that impaired the identification at the specific level were considered as *Lutzomyia* spp. The females belonging to *Brumptomyia* gender were not identified to the specific level.

Climate data - The climatic data regarding the study period was obtained through the address <http://www.inmet.gov.br/sim/sonabra/convencionais.php>. Average monthly values were used in our study.

Statistical analysis - The correlation between climatic variables (temperature, humidity of the air and rainfall) and population density of phlebotomines was evaluated through the coefficient of Spearman ($p\text{-valor} \leq 0.05$).

RESULTS

The phlebotomine fauna of Governador Valadares is constituted by 12 species: *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932), *B. nitzulescui* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia cortellezzii* (Brèthes, 1923), *L. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *L. ischyracantha* Martins, Falcão & Silva, 1962, *L. lenti* (Mangabeira, 1938), *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *L. minasensis* (Mangabeira, 1942), *L. quinquefer* (Dyar, 1929), *L. sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), *L. termitophila* Martins, Falcão & Silva, 1964 and *L. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), totaling 5,413 specimens, from which 2,851 are females (52%) and 2,562 are males (48%). In the peridomiciles and intradomiciles, respectively, 64% and 36% of the specimens were captured. *Lutzomyia intermedia* was the predominant species (29.93%) of the total number of phlebotomines collected (Table 1).

The monthly averages of climate variables, considering rainfall, temperature and relative humidity of the air, can be observed in Table 2. The correlation between the number of phlebotomines captured and the climatic conditions is represented in Graph 1. All the appraised variables showed a positive Spearman correlation coefficient with the phlebotomines' density, but only the rainfall and humidity showed significant ($p=0,008$ e $p=0,007$, respectively), while the variable temperature showed a $p\text{-valor}=0.064$.

Graph 2 shows the monthly distribution of vectorial species in Governador Valadares County. Table 3 displays the monthly distribution of phlebotomines captured in each

neighborhood, in Governador Valadares, from January to December, 2008. It was observed that in all neighborhoods located in the transitional area between the sylvatic environment and the urban one, the number of insects captured was considerable, with larger success in Village da Serra and Vila Isa, probably due to presence of domestic animals (dog, chicken, cow, horse and pig) next to the sampling sites.

TABLE 1 - Phlebotomines captured in HP light traps according to the species, environment and gender, in Governador Valadares county, State of Minas Gerais, from January to December, 2008.

Species	Intradomicile		Peridomicile		Total		%
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	4	0	13	0	17	0.3
<i>B. nitzulescui</i>	0	1	0	0	0	1	0.1
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	288	91	532	145	820	236	19.5
<i>L. intermedia s.l.</i>	241	248	412	719	653	967	29.9
<i>L. ischyraantha</i>	141	62	292	125	433	187	11.4
<i>L. lenti</i>	17	23	197	217	214	240	8.3
<i>L. longipalpis</i>	43	190	61	355	104	545	11.9
<i>L. minasensis</i>	0	1	0	0	0	1	0.1
<i>L. quinquefer</i>	327	123	117	62	444	185	11.7
<i>L. sordellii</i>	0	0	2	1	2	1	0.1
<i>L. termitophila</i>	16	1	48	3	64	4	1.2
<i>L. whitmani</i>	17	42	44	131	61	173	4.3
<i>Brumptomyia</i> spp.	7	0	9	0	16	0	0.3
<i>Lutzomyia</i> spp.	16	2	24	3	40	5	0.9
sub-total	1,113	788	1,738	1,774	2,851	2,562	
total	1,901		3,512		5,413		100.0

TABLE 2 - Monthly averages for climate variables (temperature, relative humidity and rainfall) in Governador Valadares, State of Minas Gerais, from January to December, 2008.

Month	Temperature (°C)	Relative humidity (%)	Rainfall (mm)
January	25.3	72.0	190.4
February	25.3	76.0	169.6
March	25.2	77.0	74.4
April	24.9	79.0	57.6
May	21.6	76.0	0
June	21.3	70.0	0
July	19.9	65.0	0
August	23.1	59.0	0
September	23.5	60.0	0
October	26.2	58.0	0
November	24.6	75.0	0
December	24.4	79.0	221.4

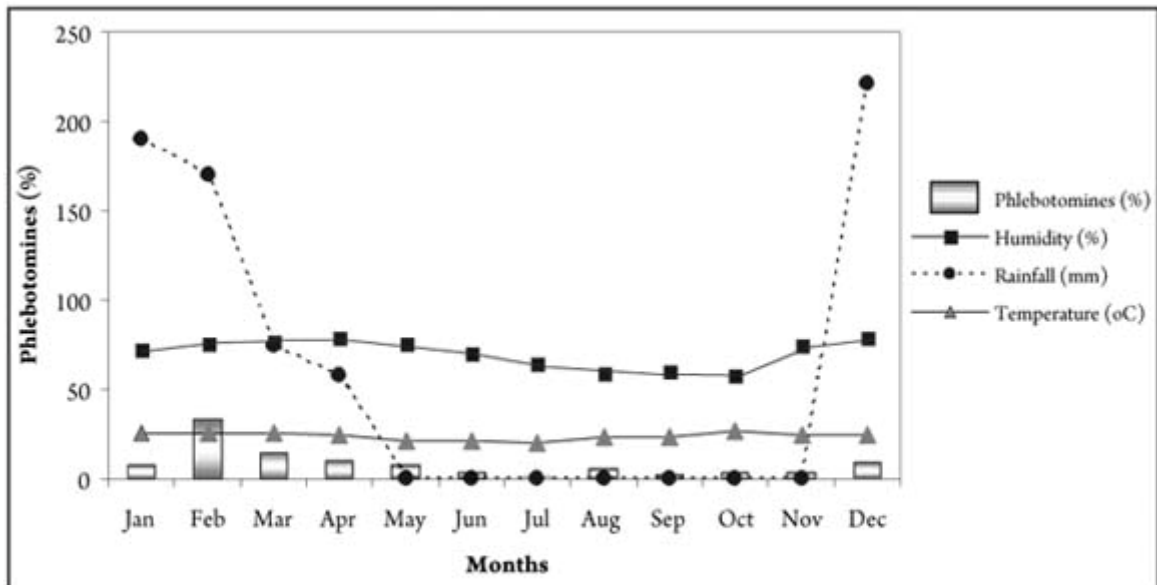


FIGURE 1 - Correlation between population density of phlebotomines and climatic variables (rainfall, temperature and relative humidity of the air) in Governador Valadares County, State of Minas Gerais, Brazil, from January to December, 2008.

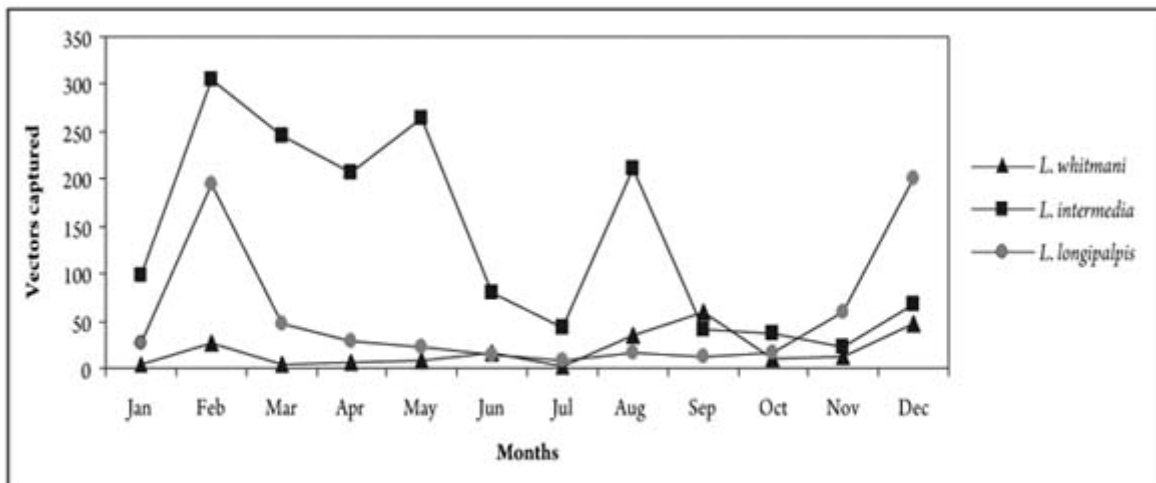


FIGURE 2 - Monthly distribution of vectorial species in Governador Valadares County, State of Minas Gerais, from January to December, 2008.

TABLE 3 - Monthly number of phlebotomines captured in HP light traps according to the neighborhood and gender, in the municipality of Governador Valadares, State of Minas Gerais, from January to December, 2008.

Month	Districts								Total	
	Elvamar		Vila Isa		Vila Parque Ibituruna		Village da Serra			
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	n	%
January	47	29	125	58	29	8	59	72	427	7.9
February	245	166	402	193	164	53	267	303	1793	33.1
March	72	45	143	85	62	24	179	169	779	14.4
April	39	29	99	103	32	19	90	154	565	10.4
May	19	13	107	70	36	23	72	89	429	7.9
June	11	9	35	40	10	11	14	21	151	2.8
July	7	9	13	13	7	6	3	8	66	1.2
August	11	25	62	89	49	57	1	4	298	5.5
September	16	19	18	37	22	25	3	6	146	2.7
October	19	20	19	18	25	23	25	8	157	2.9
November	8	5	16	8	11	7	28	68	151	2.8
December	41	133	17	26	15	14	56	149	451	8.4
Total	535	502	1,056	740	462	270	797	1,051	5,413	100.0

DISCUSSION

The results showed that the phlebotomine fauna in Governador Valadares County is diversified, having some species of epidemiological interest. The presence of *L. intermedia* and *L. whitmani* suggests the participation of these species as vectors of ATL in the area, as well as in other Brazilian endemic areas^{10,11,12}

In Governador Valadares, the larger proportion of *L. intermedia* in relation to *L. whitmani*, indicates that the first one is a better adapted and domiciled species, as evidenced by Souza et al¹¹. Females of *L. intermedia* were frequently found in intra and in the peridomicile, while *L. whitmani*, was predominantly captured in the peridomicile, characterized by the presence of domestic animals and banana plantations. The presence of both species in these environment increases the risk of *Leishmania* transmission.

Forattini¹³, when studying the seasonal variation of phlebotomines, verified that in the hottest and most humid months (December to February) there was an increase in number of the captured species, while in the coldest and driest months (June and August) the population density of these insects reduced considerably, what was also verified by Dias et al¹⁴ and Barata et al¹⁵. Our results support this pattern of population distribution, with high density in periods of high rainfall indexes and high temperatures.

In the present study, the climatic variables, rainfall and relative humidity, were statistically significant ($p \leq 0.05$). This observation agrees from several studies which show that the temperature doesn't present a positive correlation with the phlebotomines' density^{14,15,16}. In fact, this finding is not a rule, and therefore we must take into account the climatic characteristics of each region, essential for the knowledge of the disease epidemiology.

If only the vectorial species are considered (Graph 2), it is noticed that after an intense period of rains (January), *L. intermedia*, *L. whitmani* and *L. longipalpis* had their populations increased during the following month (February), with a tendency to decrease during the coldest and driest months. Souza et al¹⁷ observed in endemic area for tegumentary and visceral leishmaniasis, that *L. longipalpis* and *L. whitmani*, tend to increase their populations sensibly after rainfall periods (March and April), explained possibly due to the favorable

environmental conditions of the microhabitats. Michalsky et al¹⁸ showed similar results reinforcing this hypothesis.

Another finding that deserves special attention is the high density of *L. longipalpis* in the neighborhoods studied. The presence of the vector of *Leishmania infantum* makes an intense entomologic surveillance for visceral leishmaniasis prevention necessary in the area. Besides, the high phlebotomine percentage inside residences increases the synanthropy index and the possibility of *Leishmania* sp. transmission.

In Brazil, the use of residual insecticides against phlebotomines is feasible in situations of peridomiciliary and domiciliary transmission. In the particular case of Governador Valadares, the use of insecticide in the worked neighborhoods is possible because they are a transitional area between sylvatic and urban environments. It is recommended, therefore, the use of insecticides in the months of March, April and May, seeking a reduction in the number of phlebotomines.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the residents, to Valéria de Oliveira Ambrósio and Edson Cândido Pereira. This research was funded by the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

1.2 REFERENCES

1. Oliveira MC, Amorim RFB, Freitas RA, Costa ALL. Óbito em caso de leishmaniose cutaneomucosa após o uso de antimônio pentavalente. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 258-260.

2. Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. Rev Bras Dermatol 1992; 67: 55-60.
3. Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Silans LN, Desjeux P. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 159-62.
4. Furtado T, Vieira JBF. Geografia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. An Bras Dermatol 1982; 57: 135-140.
5. Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. Ann Trop Med Parasitology 1979; 73: 1-14.
6. Peterson AT, Shaw JJ. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. Int J Parasitol 2003; 33: 919-931.
7. Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 70- 72.
8. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Ent Inst 1994; 54: 1-881.
9. Forattini OP. Entomologia Médica, São Paulo, Ed. Edgard Blücher, Ed. USP, 1973.
10. Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB et al. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31: 339-345.

11. Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 759-765.
12. Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade-Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 56-63.
13. Forattini OP. Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera: Psychodidae). *Arch Hyg Saúde Publ* 1960; 25: 209-215.
14. Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Michalsky EM, Paula KM, Macedo CG, Barata RA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose tegumentar no estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 49-52.
15. Barata RA, França-Silva JC, Fortes-Dias CL, Costa RT, Silva JC, Vieira EP, Prata A, Michalsky EM, Dias ES. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 481-487.
16. Missawa NA, Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 913-8.
17. Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 795-803.
18. Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Lara e Silva FO, Loureiro AM, Fortes-Dias CL, Dias ES. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 56-61.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso MMS, Gomes AC, Meneses CRV, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 2005; 21(6): 1816-1820.

Afonso MMS. Estudos sobre algumas populações brasileiras de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): morfologia, morfometria e hábitos alimentares [dissertação]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2008.

Aguiar GM & Medeiros WM. Distribuição Regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF & Lainson R., editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 207-255.

Aguiar GM, Vilela ML, Lima, RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1987; 82: 583-584.

Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas e pré e pós-colombianas. *Hist. Cienc. Saúde Manguinhos*. 2003; 10(3): 853- 82.

Andrade-Filho JD, Carneiro APS, Lima MLN, Santiago RM, Gama MA, Santos CA *et al.* Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Cad. Saúde Pública*. 1997; 13(4): 767-770.

Aragão HB. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brasil-Médico*. 1922; 36:129-130.

Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(5):1933-8.

Araújo-Filho NA. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Estudos sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1979.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol. 2000; 30: 1269- 81.

Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med.Trop. 2005; 38(5): 421-425.

Barata RA, França-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paula EV, et al. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, na Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004; 99: 481-487.

Barbosa, AF, Oliveira SMP, Bertho AL, Franco AMR, et al. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2006; 101(8): 851- 856.

Barral A & Barral-Neto M. Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). Gaz. Méd. Bahia. 2009; 79 (3): 35-39.

Barrett TV & Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. Parasitol. Today. 1989; 5(8): 235-257.

Basano AS & Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Bras. Epidemiol. 2004; 7 (3): 328-337.

Basimike M, Mutinga MJ, Kumar R. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) in three vegetation habitats in the Marigat area, Baringo district, Kenya. J. Med. Entomol. 1991; 28: 330-333.

Bastos JMCMG. Observações à margem de surto epidêmico de leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira (São Paulo). Bol. Div. Nac. Dermatol. Sanit. 1978; 37: 73- 86.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int. J. Parasitol. 2007; 37(10): 1097-106.

Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. Acta Trop. 2003; 88: 109-116.

Boreham PF. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. J. Trop. Med. Hyg. 1975; 78: 83-91.

Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito MEF, Almeida FA, Nascimento LA. American Cutaneous Leishmaniasis in Pernambuco, Brasil: Eco-epidemiological Aspects in 'Zona da Mata' Region. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89(3): 445-449.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2003; 97: 291-296.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5. ed. revisada. Brasília: FUNASA, 2000. 62 p. ilus. (Vigilância Epidemiológica). Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_leishman.pdf >. Acesso em: 28 abr. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ed.MS, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-0742-4. Disponível em: <

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf >.

Acesso em: 28 abr. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atualizada. Brasília: Ed.MS, 2007.180 p. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1270-5. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_lta_2ed.pdf >. Acesso em: 28 abr. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos e Notificação. Proporção e Listagem de casos de doença de notificação compulsória (DNC) encerrados oportunamente. Brasília: MS, [s.d]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>

Acesso em: 14 dez. 2010.

Brazil RP & Brazil BG. Biologia de flebotômíneos neotropicais. In: Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotômíneos do Brasil. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 257-274.

Brazil RP, Almeida DC, Brazil BG, Mamede SMPO. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitologia. 1991; 33: 113-117.

Brumpt E & Pedroso A. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no estado de São Paulo. An. Paul. Med. Cir. 1913; 1: 97-136.

Camargo LMA & Barcinsky MA. Leishmanioses, feridas Bravas e Kalazar. Cienc. Cult. 2003; 55(1): 34-37.

Camargo-Neves VLF; Gomes AC; Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2002; 35(4): 299-306.

Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de

leishmaniose visceral americana- Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad. Saúde Pública. 2001; 17(5): 1263-1267.

Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Silans LNMP et al. Domestic and Peridomestic Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis: Changing Epidemiological Patterns Present New Control Opportunities. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96(2): 159-162.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Lima ACMR, Gontijo CMF Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*- Endemic Area of Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8(3): 407-414.

Cattand P. Tropical Diseases Lacking Adequate Controle Measures: Dengue, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. In: Jamison T, editor. Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd ed. Oxford University Press and the World Bank; 2006. p. 451–466.

Cerboncini RAS, Passamani M, Braga TV. Área de vida de *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) pelos métodos de radiotelemetria e de carretéis de rastreamento. In: Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil; 2009. 13-17 set; São Lourenço: Minas Gerais; 2009. p. 1-3.

Chaves LF, Cohen LM, Pascual M, Wilson ML. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. Negl. Trop. Dis. 2008; 2.

Choi CM & Lerner EA. Leishmaniasis as an Emerging Infection. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 2001; 6: 175-182.

Christensen HA, Arias JR, Vasquez AM, Freitas RA. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1982; 31: 239-242.

Christensen HA, Herrer A. Panamian *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) host attraction profiles. J Med Entomol. 1980; 17:522-8.

Coelho MV, Falcão AR. Aspectos epidemiológicos do calazar em Minas Gerais.

J. Bras. Med. 1966; 10(3): 259-62.

Comer JA & Brown J. Use of hollow trees as diurnal resting shelter by *Lutzomyia shannoni* (Diptera, Psychodidae) on Ossabaw Island, Georgia. Environ. Entomol. 1993; 22: 613-617.

Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região Sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998; 31(4): 355-360.

Costa JML. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. Gaz. Med. Bahia. 2005; 75(1): 3-17.

Costa SM, Cechenel 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. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007; 102(2): 149-53.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? Vet. Parasitol. 2007;147: 320–325.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A., et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. . 2005. 128: 149–155.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. A survey for American cutaneous and visceral Leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human disease occur. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1985; 80: 17-22.

Cruz IC, Canavate JM, Rubio MA, Morales C, Chicharro F, Laguna M, et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96: 185-189.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC et al. Comparison of New Diagnostic Tools for Management of Pediatric Mediterranean Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(7): 2343-47.

Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *O Hospital.* 1954; 45: 419-421.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 27: 305-318.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001; 95: 239-243.

Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Paula KM, Gonçalves CM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40(1): 49-52.

Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae: Phlebotominae). *Cad. Saúde Pública.* 2003; 19(5): 1373- 1380.

Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I – Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1977; 19 (6): 403-410.

Dias-Lima AG, Castellon EG, Sherlock I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amaz.* 2003; 33(2): 303-316.

Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004; 92: 279-283.

Domingos MF, Carreri-Bruno GC, Ciaravolo RMC, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro Toledo, região sul do estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31(5): 425-432.

Duarte CS. "Leishmaniose: que futuro nos reserva?" [dissertação]. Porto, Portugal: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto; 2009.

Eisenberg JF & Redford KH. *Mammals of the Neotropics: the Central Neotropics.* Chicago: University of Chicago Press; 1999.

Emmons LE. *Neotropical rainforest mammals. A field guide.* University of Chicago, Chicago. 1997; 307p.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi G, Sessa PA, Carias VRD, et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1986; 81:155-163.

Falqueto A & Sessa PA. Leishmaniose tegumentar americana. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. *Tratado de Infectologia.* São Paulo: Atheneu; 1996. P:1221-33.

Ferreira, Eduardo de Castro. *Estudo dos hospedeiros de Leishmania em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo, Co-orientação: Aristóbolo Mendes da Silva. Belo Horizonte: [s.n.], 2010. 131 p. Capa dura, 30 cm., il. Tese(Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias)-Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: < http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_20.pdf >. Acesso em: 28 abr. 2011.

Ferreira ESC. A reação das precipitinas aplicadas aos dípteros do gênero *Phlebotomus*. An. Inst. Med. Trop. 1945; 2: 187-196.

Ferreira, Pablo. Glossário de Doenças: epidemiologia das leishmanioses. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. Disponível em:

< <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=355&sid=6> >. Acesso em: 12 nov. 2010.

Fonseca GAB, Redford KH, Pereira LA. Notes on *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) of Central Brazil. Ciênc. Cult. 1982; 34(10):1359-1362.

Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton JL. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Occ. Pap. Conserv. Biol. 1996; 4: 1-38,

Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. Arq. Faculdade Hig. Saúde Pública. Univ. São Paulo. 1953; 7: 158-167.

Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1960; 2: 195-200.

Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: Ed. Blücher, 658p.; 1973.

Forattini OP. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública. 1976a; 10: 31-43.

Galati EAB. Sistemática dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/USP; 1990.

Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr. FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Saúde Pública. 1996; 30(2): 115-28.

Gardner AL. Order Didelphimorphia. In: Wilson DE & Reeder DM, editors. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3 ed. Baltimore: John Hopkins University Press. 2005. P. 3-18.

Gomes AC & Camargo-Neves VLF. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998; 31(6): 553-558.

Gomes AC, Coutinho SG, Paim GV, de Oliveira SMO, Galati EAB, Nunes MP *et al.* Aspectos Ecológicos da leishmaniose Tegumentar Americana. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1990; 32(2): 105-115.

Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extra-florestal. Rev Saúde Pública. 1983; 17: 23-30.

Gontijo B & Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; 36 (1): 71-80.

Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Souza MCA, Pacheco RS, Dias ES, et al. Epidemiological studies of na outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Trop. 2002; 81(2): 143-150.

Gramiccia M & Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control (Invited review). Int. J. Parasitol. 2005; 35; 1169-80.

Grimaldi G, Tesh RB, MacMahon-Pratt D. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 41(6): 687-725.

Grimaldi G. & Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Review. 1993; 6: 230-250.

Guimarães FN, Azevedo M, Damasceno R. Leishmaniose tegumentar- zoonose de roedores silvestres na Amazônia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1968; 66(2): 151-168.

Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C. Development of a Molecular Tool for the Identification of Leishmania Reservoir Hosts by Blood Meal Analysis in the Insect Vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007; 77(6): 1054-1059.

Herrer A & Christensen HA. Natural Cutaneous Leishmaniasis among Dogs in Panama. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1976; 25(1): 59-63.

Kent RJ, Coetzee M, Mharakurwa S, Norris DE. Feeding and indoor resting behaviour of the mosquito *Anopheles longipalpis* in an area of hyperendemic malaria transmission in southern Zambia. Med. Vet. Entomol. 2006; 20: 459-463.

Kent RJ & Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005; 73: 336–342.

Lacher TE & Alho CJR. Microhabitat use among small mammals in the Brazilian pantanal. J. Mammal. 1989; 70(2): 396-401.

Lainson R, Ready PD, Shaw JJ. Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian “uta”, as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. Proc. Royal Soc. of London Series B. Biological Science. 1979; 206 (1164): 307-318.

Lainson R & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: III. Cutaneous leishmaniasis in an opossum, *Marmosa murina* (Marsupialia, Didelphidae) from the lower Amazon region. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1969; 63 (6): 738-740.

Lainson R & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1970; 64(5): 654-667.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomia problems. Brit. Med. Bull. 1972; 28: 44-48.

Lainson R & Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WAR & Evans, editores. Biology of the Kinetoplastida. London: Academic Press; 1979. P. 1-116.

Lainson R & Shaw JJ. New World leishmaniasis. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections, parasitology. London: Auckland; 2005. P. 313-49.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RS, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1985; 79: 223-226.

Lima AP, Minelli L, Teodoro U, Comunello E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento orbital remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. An. Bras. Dermatol. 2002; 77(7): 681- 692.

Lima, José Fernando de Souza. Diversidade cariológica de roedores de pequeno porte do estado do Tocantins, Brasil [tese]. Rio Claro (SP): Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de mesquita Filho; 2000.

Lorosa ES & Andrade RE. Identificação de fontes alimentares de mosquitos no município de Nova Iguaçu, RJ, Brasil, pela técnica da reação de precipitina. Entomol Vect. 1998; 5: 85-92.

Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong E, Dedety A, et al. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. Ann. Trop. Med. Parasitol. 2000; 94: 623- 631.

Macedo ITF, Bevilaqua CML, Morais NB, Souza LC, Linhares FE, Amóra SSA, et al. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. Ciência Animal. 2008; 18(2): 67-74.

Malaquias LCC, Romualdo RC, Anjos Jr JB, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitol. Res.* 2007; 100: 233-239.

Marassá AM, Consales CA, Galati EAB. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37(6): 441-446.

Marcondes CB, Santos- Neto LG, Lozovei AL. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34(3): 255- 260.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *J. Bras. Med.* 1992; 63: 82-104.

Marzochi MCA. Epidemiologia e possibilidade de controle das leishmanioses no Brasil. *Perspectivas Tecnológicas em saúde: os desafios da leishmaniose e da febre amarela.* Fiocruz. Bio-Manguinhos. 2001; 1: 24-6.

Marzochi MCA & Marsden PP. Ecologia e controle de vetores: Leishmanioses. In: *Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente (Fiocruz); 1991, Rio de Janeiro; 1991.* p. 31-36.

Marzochi MCA & Marzochi KB. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Cad. Saúde Pública.* 1994; 10(2): 359-75.

Marzochi MCA, Sabroza PC, de Toledo LM, Marzochi KBF, Tramontano NC, Filho FBR. Leishmaniose Visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 1985; 1(1): 5-17.

Maurício IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitol.* 2001; 122: 393-403.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Annals of Trop. Med. Parasitol.* 1979; 73(2): 123-37.

Medeiros AR, Silva Jr WA, Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in american tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Clinics.* 2008; 64: 451-6.

Melo, Lutiana Amaral de. Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG. Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo. Belo Horizonte: [s.n.], 2008. 90 p. Capa dura, 29 cm., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em:

< http://netra.cpqrr.fiocruz.br/download/Dissertacao_Lutiana_Amaral_de_Melo.pdf >.

Acesso em: 28 abr. 2011.

Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2004; 23 (1): 41-45.

Meneses CRV, Azevedo ACR, Costa SM, Costa WA, Rangel EF. Ecology of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Vector Ecol.* 2002; 27(2): 207-214.

Michalsky EM, Fortes-Dias C, Pimenta PFP, Secundino NFC, et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sand flies (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2002; 44(5): 255-259.

Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Lara-Silva FO, Loureiro AMF, Fortes-Dias CL, et al. Phlebotomine diistribution in Janaúba, na area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104(1):56-61.

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97(2): 185-188.

Miscevic Z. Dependence of the flight of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in artificial light on the temperature and relative humidity. Acta Vet. 1981; 31: 32-39.

Missawa NA & Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007; 102(8): 913-918.

Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008; 41(4): 365-368.

Molaei G, Oliver J, Andreadis TG, Armstrong PM, Howard JJ. Molecular identification of blood- meal sources in *Culiseta melanura* and *Culiseta morsitans* from an endemic focus of eastern equine encephalitis virus in New York. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 75: 1140-1147.

Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. Rev. Saúde Pública. 2006; 40(6): 1087-93.

Nascimento JC, Paiva BR, Malafronte RS, Fernandes WD, Galati EAB. Natural Infection of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a Visceral Leishmaniasis Focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Int. Med. Trop. São Paulo. 2007; 49(2): 119-122.

Nery- Guimarães F & Azevedo M. Roedores silvestres (*Oryzomys goeldii*) da Amazônia com infecção natural por *Leishmania*. Mem. Inst. Evandro Chagas. 1964; 66(2): 279-285.

Nery- Guimarães F, Azevedo M, Damasceno R. Leishmaniose Tegumentar: zoonose de roedores silvestres na Amazônia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1968; 66(2): 151-168.

Nunes AG, de Paula, EV, Teodoro R, Prata A, Silva-Vergara ML. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Pública. 2006; 22(6): 1343-1347.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR- based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet. Parasitol. 2005; 129: 219-227.

Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39(6): 540-543.

Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. Exp. Parasitol. 2006; 114: 259-264.

Paglia, AP, Júnior PM, Costa FM, Pereira RF, Lessa G. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata secundária de Minas Gerais, Brasil. Rev. Bras. Zool. 1995. 12(1): 67-79.

Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, et al. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cad Saúde Pública. 2007; 23:87- 94.

Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, et al. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol. Res.* 2008; 103:1273-1278.

Passos VMA; Barreto, SM, Romanha, AJ, Krettli AU, Volpini AC, Gontijo CMF, et al. Leishmaniose Tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34(1): 5-12.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, et al. Epidemiological Aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a Periurban Area of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1993; 88(1): 103-110.

Passos-Dias FO, Lorosa EL, Rebelo JMM. Fonte alimentar sanguínea e peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saúde Pública.* 2003; 19: 1373-1380.

Paz GF, Ribeiro MFB, Michalsky EM, Lima ACVMR, França-Silva JC, Barata RA, et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 2010; 106: 523-528.

Pessoa SB. *Parasitologia Médica*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1958.

Pessoa SB & Barreto MP. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Educação e Saúde, Centro de Documentação. 1948.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MCA, Nunes MP, Grimaldi Junior G. Canine american cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38: 52-58.

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

Póvoa CP & Brandeburgo MAM. Study of the hierarchy and territoriality of *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia: Cricetidae). *Braz. J. Biol.* 2007; 67(3): 429-432.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007; 9: 1307-1315.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005; 38(1): 70-72.

Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa FAC, Souza RN, David JR. Cutaneous Leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50: 693-698.

Rabello E. Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil. I. Histórico e sinonímia. *An. Bras. Dermatol. e Sifilogr.* 1925; 1(1): 3-31.

Rangel EF. Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in peridomestic foci in Rio de Janeiro State and other similar situations compared to the classical epidemiology in Amazon region. In: *Proceedings from a Research Seminar on Tropical Diseases, Society and the Environment*; 1995; Geneva: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/SAREC; 1995. p. 103-10.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa AF, Andrade CA. Flebótomos de Vargem Grande, foco de Leishmaniose Tegumentar no estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1986; 81(3): 347-349.

Rangel EF, de Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Infecção Natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar no estado do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1984; 79(3): 395-396.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of Cutaneous Leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro state, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990; 85(1): 39-45.

Rangel EF & Lainson R. Ecologia das Leishmanioses: transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana In: Rangel EF & LAINSON R, editores. Flebotomíneos do Brasil. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fliocruz; 2003. P. 291-309.

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

Rioux JA, Lanoie G, Serres F, Prailong F, Bastian P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann. of Parasitol. and Human Compendium. 1990; 65: 111-125.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp. Parasitol. 1990. 71: 267- 275.

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

Rodrigues EHG, Brito MEF, Mendonça MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an área of endemicity in northeastern Brazil. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 3572-3576.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985; 230: 1350-1354.

Salomón OD, Acardi SA, Liotta DJ, Fernández MS, Lestani E, López D, et al. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazú falls área f Argentina. *Acta Trop.* 2009; 109(1): 5-11.

Sant' Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Souza AF, Dillon RJ, Cavalcante RR, et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory –fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop.* 2008; 107: 230-237.

Santos SO, Arias JR, Hoffmann MP, Furlan MBG, Ferreira WF, Pereira C, et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36(5): 633-634.

Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 1998; 12(3): 315-317.

Santos RL, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet. Parasitol.* 2009; 165(3-4): 327-31.

Santos JB, Lauand L, Souza GS, Macêdo VO. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 2000; 16(3): 701-708.

Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade Filho, JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, estado de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(1): 56-63.

Saravia NGL, Valderrama M, Labrada AF, Holguín C, Navas G, Palma A, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in new World leishmaniasis. J. Infect. Dis. 1989; 159: 725-735.

Scorza JV, Ortiz I, Gomez I. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 6- Sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomofauna de "Rancho Grande". Acta Biol. Venez. 1968; 6: 76-83.

Secundino NFC, Eger Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. J. Med. Entomol. 2005; 42(6): 928-938.

Sessa PA, Coelho CC, Falqueto A, Delmaestro D, Barros GC, Mattos EA, et al. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Espírito Santo, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1985; 18: 237- 41.

Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1988; 83: 486- 490.

Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF & Lainson R., editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2003. P. 15- 21.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral Leishmaniasis in the state of Bahia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1996; 91: 671-683.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96 (3): 285- 291.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 2009; 160(1-2): 55-9.

Simpson L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genome Organization, Transcription, Replication and Evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987; 41: 363-82.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of Cutaneous Leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002; 97(6): 759- 765.

Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8): 795-803.

Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1971; 20:150-6.

Teodoro U, La Salvia Filho V, Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEMC, Silveira TGV. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região Norte do Estado do Paraná, Brasil: variação sazonal e atividade noturna. *Rev. Saúde Pública.* 1993; 27:190-194.

Teodoro U, Silveira TGV, Santos AR, Santos DR, Santos ES, Oliveira O, et al. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Rev. Patol. Trop.* 2001; 30: 209-24.

Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O. Influência da organização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 2003; 19(6): 1801-1813.

Teodoro U, La Salvia Filho V, Lima EM, Misuta NM, Verginassi TG, Ferreira MEMC. Leishmaniose tegumentar americana: Flebotomos de área de transmissão no Norte do Paraná, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 1991; 25: 129-133.

Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of Habitat Degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of Tropical Dry Forests in Northern Colombia. *J. Med. Entomol.* 2002; 39 (3): 451-456.

Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. *Int. J. Dermatol.* 2008; 47: 109-24.

Uchôa CMA, Serra CMB, Magalhães CM, Silva RMM, Figliuolo LP, Leal CA, *et al.* Educação em Saúde: ensinando sobre a leishmaniose tegumentar americana. *Cad. Saúde Pública.* 2004; 20 (4): 935-941.

Vale ECS & Furtado T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An. Bras. Dermatol.* 2005; 80: 421-8.

Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 51: 133- 142.

Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, *et al.* The Identity of *Leishmania* Isolated from Sand Flies and Vertebrate Hosts in a Major Focus of Cutaneous Leishmaniasis in Baturité, Northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50(2): 158-164.

Vexenat JA, Barreto AC, Cuba CC, Marsden PD. Características Epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna Flebotomínica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1986; 81(3): 293-301.

World Health Organization. Lucha contra las leishmaniasis. Geneva: WHO; 1990. (Informe Técnico, 793).

World Health Organization. Report of the Consultative Meeting on Cutaneous Leishmaniasis. Geneva: WHO; 2007. (Leishmaniasis Control Program).

Young DG & Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem. of the American Entomol. Inst. 1994; 54: 1-881.