

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

YURY YZABELLA DA SILVA

DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. EM *Lutzomyia* spp. EM UM FRAGMENTO DE
MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

RECIFE
2018

Yury Yzabella da Silva

**DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. EM *Lutzomyia* spp. EM UM FRAGMENTO DE
MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em biociências e biotecnologia em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientador: Dr. Filipe Dantas Torres

RECIFE

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

S586d Silva, Yury Yzabella da.
Detecção de *Leishmania* spp. em *Lutzomyia* spp. em um fragmento de mata Atlântica no estado de Pernambuco, Brasil/ Yury Yzabella da Silva. — Recife: [s. n.], 2018.
67 p.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Filipe Dantas Torres.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. *Leishmania*. 3. Psychodidae. I. Torres, Filipe Dantas. II. Título.

CDU 613.993.161

Yury Yzabella da Silva

**DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. EM *Lutzomyia* spp. EM UM FRAGMENTO DE
MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em biociências e biotecnologia em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Data de aprovação: / /

BANCA EXAMINADORA

Dr. Filipe Dantas Torres - Orientador
Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ

Dr. Christian Robson de Souza Reis – Titular Interno
Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ

Dra. Maria Sandra Andrade – Titular Externo
Universidade de Pernambuco – UPE

À minha querida mãe, Mariluce Pereira de Lima, que com carinho e compreensão sempre me incentivou em todas as situações ao longo do curso e da vida. Ensinou-me a ter fé na vida, amor pelo trabalho e pelas pessoas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre, por guiar e iluminar minha caminhada.

À minha mãe, exemplo de perseverança e força, agradeço o apoio e amor incondicional e por compartilhar todos os momentos felizes e difíceis vividos ao longo de mais uma trajetória. Não há palavra alguma que expresse a minha tamanha gratidão e amor por você.

Ao meu orientador Dr. Filipe Dantas Torres, pela oportunidade de trabalhar nessa instituição e pela orientação no desenvolvimento desse trabalho, por ter me permitido estar na hora certa, com pessoas certas e poder aproveitar a oportunidade para crescer pessoal e profissionalmente.

Agradeço as minhas queridas Débora Miranda, Joanna Almeida e Kamila Gaudêncio, que de alguma forma me auxiliaram ao longo do desenvolvimento do projeto de mestrado, além de tornar agradável o nosso ambiente. Meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço a algumas pessoas especiais que terão sempre um lugar no meu coração: Marcela Melo, Derciliano Cruz, Fernando Freitas, Diego Lira, Neide Xavier e Carol Simões. A estes que me acompanharam durante minha aventura no mestrado, além de serem excelentes ouvintes e conselheiros. A espontaneidade e alegria contagiante de todos que estiveram sempre dispostos a me ajudar. Sou muito grata a todos que estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma forma com a execução e finalização deste trabalho.

À Dr. Fábio Melo e Walter Lins por ceder gentilmente os reagentes utilizados nas análises por enzima de restrição, contribuindo para a finalização dos experimentos.

E, por fim, agradeço a Lucas Aguiar, pelo companheirismo, carinho, dedicação, amizade, paciência e incentivo. Pelas doses diárias de otimismo e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças à Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo (<i>Lutzomyia</i> sp.) durante o repasto sanguíneo.	20
Figura 2 – Metamorfose dos flebotomíneos.	21
Figura 3 – Ovos de flebotomíneo da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	22
Figura 4 – Larvas do quarto estágio larval (quarto instar) da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	23
Figura 5 - Pupas recém-formadas da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	23
Figura 6 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp	28
Figura 7 - Distensão abdominal decorrente de hepatoesplenomegalia, causada pela leishmaniose visceral.	30
Figura 8 - Países com maior ocorrência de casos de leishmaniose visceral.	31
Figura 9 – Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras entre os anos de 2006 a 2015.	32
Figura 10 - Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> causadoras da leishmaniose tegumentar americana no Brasil	33
Figura 11 - Formas clínicas da leishmaniose cutânea (leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose cutâneo difusa).	34
Figura 12 - Leishmaniose mucocutânea.	34
Figura 13 - Casos de leishmaniose tegumentar americana por regiões brasileiras entre os anos de 2000 a 2015.	35
Figura 14 - Vista aérea da sede do Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti, CIMNC.	43
Figura 15 - Curva de amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> proveniente de amostra individual de <i>Lutzomyia choti</i> (amostra F3004).	49

Figura 16 - Curva de amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> proveniente de <i>pools</i> de <i>Lutzomyia complexa/Lutzomyia wellcomei</i> (amostras F207 e F293).	49
Figura 17 - Curva de amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> proveniente de <i>pools</i> de <i>Lutzomyia longispina</i> (amostras F217, F51 e F170).	50
Figura 18 - Curva de amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> proveniente de <i>pools</i> de <i>Lutzomyia longispina</i> (amostras F157, F71 e F9).	50
Figura 19 - Curva de amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> proveniente de <i>pools</i> de <i>Lutzomyia sordellii</i> (amostras F144, F39 e F52).	51
Figura 20 - Curva de amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> proveniente de amostra individual de <i>Lutzomyia umbratilis</i> (amostra F630).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de fêmeas e de <i>pools</i> utilizados para a realização da extração de DNA genômico das fêmeas do gênero <i>Lutzomyia</i> sp.	46
Tabela 2 - Número total de amostras testadas, positivas e taxa mínima de infecção por espécie.	49
Tabela 3 - Resultados as análise por enzima de restrição, de acordo com a espécie de flebotomíneo e <i>cycle threshold</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
CIMNC	Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa
LCL	Leishmaniose cutâneo localizada
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose visceral
MIR	<i>Minimum Infection Rate</i>
MP	Matriz peritrófica
MS	Ministério da Saúde
NTC	<i>No template control</i>
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
qPCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
SMF	Sistema mononuclear fagocitári

SILVA, Yury Yzabella da. **Detecção de *Leishmania* spp. em *Lutzomyia* spp. em um fragmento de mata Atlântica no estado de Pernambuco, Brasil.** 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose de grande relevância, sendo uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas nas Américas. A LTA é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). No Brasil, a doença ocorre em todas as regiões geográficas, porém sua incidência é maior nas regiões norte e nordeste do país. Em Pernambuco, surtos de LTA foram registrados no Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), um campo de treinamento militar localizado em remanescente de mata atlântica. Estudos sugerem que uma grande diversidade de espécies de flebotomíneos que poderiam atuar como vetores de *Leishmania braziliensis*, principal agente etiológico da LTA no Brasil. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo detectar a presença de *Leishmania* spp. em fêmeas de *Lutzomyia* spp. coletadas no CIMNC entre os anos de 2012 a 2014. Para esse fim, foram testadas fêmeas de flebotomíneos (individualmente ou em *pools* de até 10 fêmeas) pertencentes a cinco diferentes espécies coletadas em diferentes datas e pontos de coleta. Posteriormente, foram realizadas a extração de DNA e a PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania* spp. Os produtos positivos da PCR em tempo real foram digeridos com a enzima de restrição HaeIII e os padrões de bandas analisados por eletroforese. No total, 42 *pools* (2-10 fêmeas) e 23 fêmeas individuais foram positivas para a presença de DNA de *Leishmania* spp. Na análise por enzima de restrição, 13 amostras (pertencentes às espécies *Lu. longispina*, *Lu. complexa/wellcomei* e *Lu. sordellii*) apresentaram um padrão de bandas sugestivo de *L. braziliensis*. Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que *Lu. choti* possa estar atuando como vetor de *L. braziliensis*, além de relatar, pela primeira vez, a presença de DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de *Lu. longispina* e *Lu. sordellii*. Esses resultados indicam que diferentes espécies de flebotomíneos podem estar atuando como vetores de *L. braziliensis* em remanescentes de mata atlântica em Pernambuco.

Palavras chave: *Lutzomyia* spp., *Leishmania*, leishmaniose tegumentar americana

SILVA, Yury Yzabella da. **Detection of *Leishmania* spp. in *Lutzomyia* spp. in a fragment of Atlantic forest in the State of Pernambuco, Brazil.** 2018. Dissertation (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a zoonosis of great relevance, being one of the most important neglected tropical diseases in the Americas. The ATL is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted by sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). In Brazil, the disease occurs in all geographic regions, but its incidence is higher in the north and northeast of the country. In Pernambuco, ATL outbreaks were recorded at the Marechal Newton Cavalcanti Military Training Camp (CIMNC), a military training camp located in Atlantic forest remnants. Studies suggest that a great diversity of sandfly species could act as vectors of *Leishmania braziliensis*, the main etiological agent of ATL in Brazil. Therefore, the present work aimed to detect the presence of *Leishmania* spp. in females of *Lutzomyia* spp. collected at the CIMNC between the years of 2012 to 2014. For this purpose, females of sand flies (individually or in pools of up to 10 females) belonging to five different species collected at different dates and points of collection were tested. Subsequently, DNA extraction and real-time PCR were performed to detect *Leishmania* spp. The real-time PCR positive products were digested with the restriction enzyme HaeIII and the band standards analyzed by electrophoresis. In total, 42 pools (2-10 females) and 23 individual females were positive for the presence of *Leishmania* DNA. In restriction enzyme analysis, 13 samples (belonging to the species *Lu. longispina*, *Lu. complexa/wellcomei* and *Lu. sordellii*) presented a band pattern suggestive of *L. braziliensis*. The results of the present study reinforce the hypothesis that *Lu. choti* may be acting as a vector of *L. braziliensis*, besides reporting for the first time the presence of *Leishmania* DNA in *Lu. longispina* and *Lu. sordellii* females. These results indicate that different species of sand flies may be acting as vectors of *L. braziliensis* in remnants of Atlantic forest in Pernambuco.

Keywords: *Lutzomyia* spp., *Leishmania*. American tegumentary leishmaniasis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	18
2.1 Flebotomíneos	18
2.1.1 Histórico	18
2.1.2 Taxonomia	19
2.1.3 Biologia e ecologia	19
2.2 As leishmânias	25
2.3 As leishmanioses	29
2.3.1 Etiologia	29
2.3.2 Leishmaniose visceral (LV)	30
2.3.3 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)	32
2.4 LTA no Brasil	35
2.5 LTA em Pernambuco	37
3 JUSTIFICATIVA	39
4 PERGUNTA CONDUTORA	40
5 HIPÓTESE	41
6 OBJETIVOS	42
6.1 Objetivo geral	42
6.2 Objetivos específicos	42
7 MATERIAL E MÉTODOS	43
7.1 Área de estudo	43
7.2 Flebotomíneos	44
7.3 Extração de DNA	45

7.4 PCR em tempo real (qPCR)	46
7.5 Análise por enzima de restrição	46
7.6 Análise dos dados	47
8 RESULTADOS	48
8.1 Detecção de <i>Leishmania</i> spp.	48
8.1.1 <i>Lutzomyia choti</i>	48
8.1.2 <i>Lutzomyia complexa/wellcomei</i>	49
8.1.3 <i>Lutzomyia longispina</i>	50
8.1.4 <i>Lutzomyia sordellii</i>	51
8.1.5 <i>Lutzomyia umbratilis</i>	51
8.2 Análise por enzima de restrição	52
9 DISCUSSÃO	54
10 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores (*Vector Borne Diseases* - VBDs), a exemplo das arboviroses, como as leishmanioses e malária, estão entre os motivos de grande preocupação em vários países, por causar um grande impacto na saúde pública, sobretudo em países em desenvolvimento. Além disso, alterações ambientais, sendo as variações do clima a principal delas, têm favorecido a expansão da distribuição geográfica, e desenvolvimento dessas doenças em diferentes regiões do mundo. Essas alterações também causam mudanças na dinâmica de vetores e dos agentes patogênicos que eles transmitem (CAMPBELL-LENDRUM *et al.*, 2015; GITHEKO *et al.*, 2000).

As leishmanioses são apontadas como importantes doenças tropicais negligenciadas globalmente (ALVAR *et al.*, 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses são endêmicas em 98 países, com 12 a 15 milhões de pessoas atualmente infectadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Ainda de acordo com a OMS, estima-se que 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de contrair a doença e 1,5 a 2 milhões de novos casos são estimados ocorrerem anualmente (BRASIL, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Existem duas principais formas clínicas da leishmaniose: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (GONTIJO; CARVALHO, 2003), comumente denominada no Brasil leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Pertencentes a um grupo de doenças parasitárias, as leishmanioses são causadas por protozoários que estão inseridos no gênero *Leishmania* (SAPORITO, 2013; (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017), o qual se inclui taxonomicamente na ordem Kinetoplastida e na família Trypanosomatidae. Devido às diferenças observadas em relação aos sítios anatômicos do desenvolvimento dos parasitos no tubo digestivo dos insetos vetores, o gênero *Leishmania* é classificado em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987) e, em cada um deles estão incluídas várias espécies. Os parasitos, por sua vez, são transmitidos por vetores conhecidos como flebotomíneos. Esses insetos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (LAINSON; SHAW, 1998).

No Brasil, os flebotomíneos são conhecidos por diferentes nomes populares, de acordo com sua ocorrência geográfica. Assim como a maioria dos dípteros, são insetos holometábolos e em todo o mundo são conhecidas, aproximadamente, 1000 espécies, das quais 530 ocorrem na região neotropical (BRAZIL; BRAZIL, 2003; SHIMABUKURO *et al.*, 2017). A distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos é influenciada por fatores ambientais e também pela presença de hospedeiros vertebrados, sendo mais comuns em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (BARCELLOS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Em 2015, dez países registraram o maior número de notificações de casos de LT (Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe Síria, Tunísia e Iêmen), juntos representam 87% da incidência global (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Embora seja considerada endêmica em todas as regiões geográficas brasileiras, é possível observar uma alta incidência da LTA, principalmente nas regiões norte e nordeste. Só em Pernambuco, foi registrado um total de 4.855 casos de LTA entre os anos de 2001 a 2010, o que equivale a uma média de 485 casos por ano (BRITO *et al.*, 2012).

Áreas com resquícios de mata atlântica ou que possuam predominância de mata secundária e/ou diversos tipos de plantações, estão propícias à colonização dos flebotomíneos (MARZOCHI, 1992). Por isso, existe um risco permanente de adquirir a LTA nessas áreas, sendo uma doença bastante frequente entre trabalhadores rurais, populações indígenas e militares, como é o caso dos militares que realizam treinamentos noturnos no Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), com sede no município de Paudalho, região da Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco.

Os surtos de LTA têm sido relativamente frequentes no CIMNC. Entre os anos de 1996 a 2005 no CIMNC foram registrados 123 casos autóctones (ANDRADE *et al.*, 2005a). Em 2006, um estudo descritivo realizado por Andrade *et al.* (2009), relatou a ocorrência de um novo surto no CIMNC, em que, 2.295 militares participaram de treinamentos no local nos meses de julho e agosto, destes, 74 apresentaram lesões suspeitas de LTA, sendo 71 (95,9%) casos da doença confirmados pelo critério clínico, epidemiológico e laboratorial.

Esta região situa-se em uma área preservada de mata atlântica, onde é mantido o ciclo enzoótico da *Leishmania braziliensis* (ANDRADE, 2004; ANDRADE *et al.*, 2005a, 2005b; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998), principal agente etiológico da LTA na região.

Suspeita-se que *L. braziliensis* possa estar sendo transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos, atuando assim, em diferentes ciclos de transmissão, nos ambientes domésticos e silvestres. Estudos mostraram uma grande diversidade de espécies de flebotomíneos presentes no CIMNC, reforçando a hipótese de que várias dessas espécies poderiam estar atuando como vetores de *L. braziliensis* na região.

Para um maior entendimento das características da transmissão de LTA na localidade e dos possíveis ciclos de transmissão, reforça-se a necessidade de mais estudos relacionados aos flebotomíneos vetores, para o desenvolvimento de estratégias e ferramentas mais efetivas de prevenção e controle.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Flebotomíneos

No Brasil, a depender da região geográfica, os flebotomíneos possuem vários nomes vulgares, como por exemplo, “asa-branca”, “tatuquira”, “asa-dura”, “arrepido” e “pula-pula” (MIRANDA; DIAS, 2011; MARTINS *et al.*, 1978). Apesar de serem distintos da família Culicidae por apresentarem diferenças morfológicas e biológicas, os flebotomíneos são chamados, ainda que erroneamente, de “mosquito-palha”. Na literatura internacional, são geralmente referidos como “*phlebotomine sand flies*” (“*sand*” = areia e “*flies*” = moscas) (MIRANDA; DIAS, 2011).

2.1.1 Histórico

Na Itália, no ano de 1786, Giovanni Antonio Scopoli descreveu pela primeira vez um flebotomíneo. Scopoli descreveu a espécie como *Bibio papatasi*, que foi alterada anos depois para *Phlebotomus papatasi* (DEDET; VIGNES; RANGEL, 2003). No novo mundo (Américas), os primeiros flebotomíneos foram descritos por Coquillett por volta de 1907, mas só no ano de 1912, Lutz e Neiva realizaram a primeira descrição de flebotomíneos no Brasil. No novo mundo, as espécies pertencentes ao gênero *Lutzomyia* são predominantes e apresentam características biologicamente diferentes do gênero *Phlebotomus* (predominante no velho mundo) (ALEXANDER, 2000; DESJEUX, 2004). Os flebotomíneos possuem uma ampla distribuição geográfica, alcançando as cinco regiões do país e ainda não há estratégias eficientes de controle vetorial (QUARESMA, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2012).

A relação entre a transmissão de *Leishmania* spp. e a picada dos flebotomíneos só foi estabelecida no ano de 1921, no Velho Mundo (ARAGÃO, 1922; SERGENT *et al.*, 1921). Um ano depois (1922) após essa comprovação, Henrique de Beurepaire Aragão atribuiu a transmissão da espécie *L. braziliensis* à *Phlebotomus intermedius* (atualmente *Lutzomyia intermedia*) em uma área endêmica na cidade do Rio de Janeiro (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003) Ele conseguiu reproduzir a lesão experimentalmente em um focinho de cão a partir da inoculação desses insetos macerados (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003; RANGEL;

LAINSON, 2003). No estado de São Paulo, em um estudo no ano de 1940, foram encontradas infecções naturais de promastigotas em *Lutzomyia migonei*, *Lu. whitmani* e *Lu. pessoai* (PESSOA; PESTANA, 1940).

As incertezas referentes à distribuição geográfica exata dos agentes etiológicos causadores das leishmanioses dificultam a identificação de todos os seus vetores. Atualmente, no Brasil, a espécie *L. braziliensis* encontra-se amplamente distribuída em todos os estados, ficando evidente que várias espécies de flebotomíneos estão envolvidos em sua transmissão. Várias espécies são consideradas envolvidas na transmissão de LTA em todo território brasileiro, incluindo *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. complexa/wellcomei*, *Lu. migonei* (MAROLI *et al.*, 2013).

2.1.2 Taxonomia

Os flebotomíneos são dípteros pertencentes à subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (FORATTINI, 1973). Tradicionalmente, a subfamília Phlebotominae tem sido dividida em três gêneros no Velho Mundo (*Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*) e três gêneros no Novo Mundo (*Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*) (YOUNG; DUNCAN, 1994). Essa classificação tradicional de flebotomíneos no Novo Mundo, a mais utilizada pela maioria dos taxonomistas, foi proposta por Young e Duncan (1994). Mais recentemente, uma classificação proposta por Galati (1995, 2003, 2014) dividiu os flebotomíneos em tribos, subtribos e vários gêneros. Essa classificação também vem sendo utilizada, mas existem controvérsias em relação a sua validade formal. Atualmente, são conhecidas aproximadamente 530 espécies de flebotomíneos no Novo Mundo (SHIMABUKURO *et al.*, 2017).

2.1.3 Biologia e ecologia

Os flebotomíneos são dípteros relativamente pequenos (medem geralmente de 2 a 4 mm de comprimento) (KILLICK-KENDRICK, 1999; MIRANDA; DIAS, 2011). Como característica, esses insetos apresentam um corpo piloso e uma tonalidade “cor-de-palha” semelhante à palha vegetal, sendo identificados pela posição que adotam quando pousados (as

asas entreabertas e ligeiramente levantadas) (BRAZIL; BRAZIL, 2003; MARTINS *et al.*, 1978) (Figura 1).

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo (*Lutzomyia* sp.) durante o repasto sanguíneo.



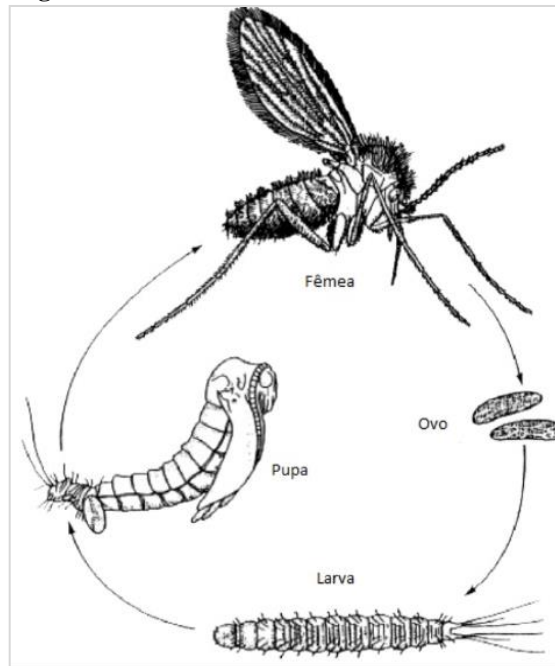
Fonte: Naskrecki (2017).

Os flebotomíneos possuem asas de forma lanceolada, que são densamente revestidas de cerdas longas (REY, 2013). Além disso, possuem cabeça pequena e forma alongada refletida para baixo. Possuem os palpos maxilares com cinco segmentos, e são mais longos que a probóscide. O aparelho bucal é do tipo picador-sugador e compreende em: labro, um par de mandíbulas, hipografinge e um par de maxilas (MIRANDA; DIAS, 2011; REY, 2013). O macho possui a probóscide mais curta, o que impede a penetração na pele dos vertebrados. Já nas fêmeas, a probóscide é mais longa e está adaptada para o ato de picar e sugar (ALEXANDER, 2000; BRAZIL; BRAZIL, 2003; MIRANDA; DIAS, 2011).

Outros elementos morfológicos também possuem grande importância e são utilizados na taxonomia de flebotomíneos: cabeça (número e comprimento de espinhos geniculados); cibário (apresentam dentes posteriores nas fêmeas e dentes vestigiais nos machos); tórax (presença ou ausência de espinhos no nível posterior e nervuras das asas); abdômen (morfologia e dimensões do par de espermatecas); aparelho genital externo do macho, que é formado por três pares de apêndices: gonóstilos (gonapófises superiores), parâmetros e lobos laterais (inferiores) (MIRANDA; DIAS, 2011; REY, 2013).

Assim como a generalidade dos dípteros, os flebotomíneos são holometábolos, ou seja, possuem metamorfose completa com estágios de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adultos (Figura 2) (BRAZIL; BRAZIL, 2003; SHERLOCK, 2003; VOLFF; VOLFOVA, 2011). Geralmente, cada fêmea põe entre 40 a 70 ovos por desova (REY, 2013), porém a literatura explana que a quantidade de ovos produzidos estará relacionada com a quantidade de sangue ingerida (READY, 1979).

Figura 2 – Metamorfose dos flebotomíneos.



Fonte: Adaptado de Hernández (2001).

Nota: O ciclo de vida de um flebotomíneo compreende as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto, por isso os flebotomíneos são classificados como insetos holometábolos (metamorfose completa).

Entre 3 a 8 dias após a hematofagia, as fêmeas realizam a deposição dos ovos em um ambiente terrestre e úmido (MIRANDA; DIAS, 2011). Os ovos de flebotomíneos possuem forma elipsoide ou ovoide e sua medida varia de acordo com a espécie (BRAZIL; BRAZIL, 2003; REY, 2013) (Figura 3). No momento da postura, os ovos possuem coloração branca, mas posteriormente escurecem devido à oxidação que ocorre ao entrar em contato com o ar (MIRANDA; DIAS, 2011). A postura pode acontecer de forma isolada ou em pequenos grupos, porém permanecendo sempre aderidos ao substrato. Isso acontece devido a uma

substância produzida por glândulas acessórias (BRAZIL; BRAZIL, 2003). A eclosão das larvas ocorre geralmente entre 7 a 17 dias. Esse número pode variar dependendo da quantidade de sangue ingerido pelo vetor e das condições do ambiente a qual estão expostas (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Figura 3 – Ovos de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*.



Fonte: Ferro (2017).

As larvas são terrestres, pequenas, de tonalidade branca e possuem uma aparência vermiforme (Figura 4). Alimentam-se da matéria orgânica que fica depositada no solo ou do local onde estiverem abrigadas. São bastante ágeis e deslocam-se com facilidade à procura de alimento. Seu corpo é dividido em cabeça, três seguimentos torácicos e nove seguimentos abdominais. No último segmento, existem estruturas responsáveis pela fixação da larva no momento da muda (LEITE; WILLIAMS, 1997). O segmento abdominal é coberto por cerdas, podendo variar de acordo com o estágio larval e espécie. As pupas formam-se entre um período de 15 a 20 dias (BRAZIL; BRAZIL, 2003; MIRANDA; DIAS, 2011).

Figura 4 – Larvas do quarto estágio larval (quarto instar) da espécie *Lutzomyia longipalpis*.



Fonte: Ferro (2017)

As pupas formam-se entre um período de 15 a 20 dias (BRAZIL; BRAZIL, 2003; MIRANDA; DIAS, 2011) e permanecem aderidas ao substrato até a emergência dos adultos (BRAZIL; BRAZIL, 2003; REY, 2013; SHERLOCK, 2003). Em seu ambiente natural, as pupas se aderem a substratos como folhas mortas ou até pedras (YOUNG; DUNCAN, 1994). As pupas possuem cefalotórax e abdômen, fixam-se imóveis ao substrato, esbranquiçadas, ficando escuras à medida que se aproxima a chegada do adulto (MARCONDES, 2011) (Figura 5). As pupas de *Lutzomyia longipalpis* têm aproximadamente 2,5 mm de comprimento (LEITE; WILLIAMS, 1996).

Figura 5 – Pupas recém-formadas da espécie *Lutzomyia longipalpis*.



Fonte: Ferro (2017)

Ao tornarem-se adultos (entre uma ou duas semanas após o estágio de pupa), os flebotomíneos apresentam características distintas entre os sexos e ambos necessitam de carboidratos, geralmente obtido de néctares de flores e plantas encontradas na natureza provenientes de seiva vegetal e secreções açucaradas de afídeos (Hemiptera: Aphididae). Tais carboidratos são utilizados como fonte de energia e amadurecimento dos ovários da maioria das espécies (REY, 2013; SHERLOCK, 2003). Além da alimentação com açúcares, o hábito hematofágico é exclusivo da fêmea que se alimenta de sangue de uma grande variedade de animais, incluindo mamíferos, aves e répteis (BAUM *et al.*, 2015; BRITO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2008). O sangue tem um papel fundamental para a maturação dos ovos (FORATTINI, 1973). A depender da espécie, o repasto sanguíneo pode acontecer apenas uma vez entre as posturas, enquanto outras, em um único ciclo, pode alimenta-se mais de uma vez (SHERLOCK, 2003).

A fecundação das fêmeas pode ocorrer antes ou depois do repasto sanguíneo, copulando no ato do voo ou quando pousado. A atividade de hematofagia é crepuscular e/ou noturna, porém, algumas espécies de flebotomíneos podem desempenhá-la durante o período vespertino e matutino em ambientes tranquilos, sombrios, úmidos, com pouca luminosidade como as áreas florestais. Em geral, o repasto sanguíneo dura entre 3 a 5 minutos (DIAS; MIRANDA, 2011). Ainda sobre a hematofagia, é válido ressaltar que algumas espécies se alimentam de forma exclusiva determinados tipos de hospedeiros (p. ex. roedores), enquanto outras podem realizar o repasto em inúmeros tipos vertebrados (p. ex. aves e mamíferos) (SHERLOCK, 2003).

A distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos é influenciada pelas barreiras físicas, pela própria vegetação, luminosidade e, principalmente, pela presença/ausência dos hospedeiros vertebrados (ARIAS *et al.*, 1985). Além disso, mudanças ambientais que ocorrem por intervenção humana ou fenômenos naturais podem alterar os habitats naturais e afetar as populações desses insetos, bem como a interação deles com seus hospedeiros (PESSOA *et al.*, 2007). O desmatamento, por exemplo, além de provocar a fragmentação da floresta, altera o número de hospedeiros que são utilizados como fonte de alimentação para os flebotomíneos. Conseqüentemente, essas modificações ambientais podem favorecer o contato entre flebotomíneos e outros hospedeiros como, por exemplo, o homem (PATZ *et al.*, 2000), aumentando o risco de transmissão de patógenos, como as leishmânias.

Os fatores socioeconômicos também podem interferir na distribuição dos flebotomíneos vetores e, por consequência, na transmissão de leishmânias, de várias formas. Por exemplo, as habitações precárias e condições sanitárias deficientes podem favorecer a proliferação de flebotomíneos no ambiente doméstico e a exposição dos seres humanos a esses insetos. Da mesma forma, as mudanças no padrão demográfico das cidades, que ocorrem de forma desordenada, também podem contribuir para a aproximação entre flebotomíneos e seres humanos (AZEVEDO *et al.*, 2011; ELNAIEM *et al.*, 2003; MADEIRA *et al.*, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2012).

De fato, muitas espécies de flebotomíneos se encontram, adaptadas aos mais diversos ambientes (silvestre, rural e urbano) e condições climáticas. Deste modo, muitas populações que vivem em regiões tropicais e subtropicais estão sob o risco de infecção por patógenos transmitidos por flebotomíneos (ALVAR *et al.*, 2012; MAROLI *et al.*, 2013)

2.2 As leishmânias

Os flebotomíneos possuem grande importância médica e veterinária, principalmente pelo papel deles como vetores de *Leishmania* spp., protozoários intracelulares que pertencem a ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Esses protozoários são organismos unicelulares, heteroxênicos e possuem uma organela especializada denominada cinetoplasto (PETERS; KILLICK-KENDRICK, 1987). A dispersão das espécies de *Leishmania* em vários ambientes se deve, em parte, à adaptação dessas aos diferentes tipos de hospedeiros. No que diz respeito à relação parasito-hospedeiro, sabe-se que o mesmo parasito pode se comportar de maneira diferente em regiões distintas (LAURENT *et al.*, 2007). Por exemplo, a espécie *Leishmania infantum*, principal agente causador da LV, já foi identificada causando LT no homem (CAMPINO *et al.*, 2005; LYRA *et al.*, 2015). Da mesma forma, *L. braziliensis* já foi identificada em casos de LV em humanos (SILVA *et al.*, 2002). Similarmente, em determinadas regiões, o mesmo hospedeiro (vertebrado e/ou invertebrado) pode ser infectado por diferentes espécies de *Leishmania* (AZPURUA *et al.*, 2010; SARAVIA *et al.*, 1998).

O ciclo de vida das leishmânias é complexo e envolve vários estágios de desenvolvimento (KILLICK-KENDRICK, 1979; SACKS; PERKINS, 1984). Essas mudanças durante o desenvolvimento vão ocorrer de acordo com as condições ambientais encontradas

pelo parasita dentro dos hospedeiros, vertebrado e invertebrado (WALTERS *et al.*, 1987). A leishmânia tem duas fases durante o seu ciclo de vida: uma extracelular (no hospedeiro invertebrado) e uma intracelular (dentro do hospedeiro vertebrado). Morfológicamente, elas apresentam duas formas principais: amastigotas (intracelulares, ovoides, imóveis, sem flagelo evidente, sendo encontradas no sistema fagocítico mononuclear – SFM – dos hospedeiros vertebrados) e promastigotas (células alongadas, flageladas, móveis, encontradas extracelularmente no trato digestivo do vetor) (DESJEUX, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REY, 2013).

As formas amastigotas (que se multiplicam obrigatoriamente dentro das células) quando visualizadas na microscopia possuem formato ovoides ou arredondado, medindo entre 2 a 6 μm de diâmetro, contendo um núcleo grande e circular, ocupando às vezes um terço do corpo do parasito, próximo ao cinetoplasto em forma de um pequeno bastonete. O cinetoplasto (característico da classe Kinetoplastida) se estende ao longo do corpo celular e em determinada porção se mostra como uma estrutura mitocondrial, rica em DNA. Sua localização é perpendicular à base do flagelo, e as relativas posições destas duas estruturas é o principal modo de classificação dos diferentes estágios de ciclo de vida da leishmânia (CAVALCANTI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 1997; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002).

As formas promastigotas são alongadas, contendo um flagelo, livre e longo, emergindo do corpo do parasito em sua porção anterior. Apresentam ainda um núcleo central e um cinetoplasto em forma de bastão que está localizado na posição mediana entre a extremidade anterior e o núcleo (LAINSON; SHAW, 1972; NEVES, 2011). Na microscopia eletrônica, as organelas citoplasmáticas, estrutura das membranas e o cinetoplasto das diferentes formas das leishmânias são semelhantes, portanto, as formas flageladas se diferenciam da forma amastigota pela posição do núcleo, cinetoplasto e também pelo prolongamento do flagelo que se expõe além da bolsa flagelar (NEVES, 2011).

De uma maneira geral, no hospedeiro vertebrado, o ciclo inicia-se quando o flebotomíneo inocula, durante o repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas. A saliva dos flebotomíneos possui um importante repertório de substâncias (tais como, vasodilatadores, imunossuppressores, anti-agregadores de plaquetas, entre outras), que exercem papel importante no estabelecimento das leishmânias no hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2000; SOARES; TURCO, 2003). As formas promastigotas são então

internalizadas pelas células do SFM (pelo processo chamado de endocitose, que é mediado por receptores na superfície dos macrófagos). Após a incorporação, o parasito é detectado inicialmente dentro do vacúolo fagocitário.

Em seguida, o parasito evolui para formas amastigotas. Essa nova forma está adaptada ao meio e por isso tem a capacidade de resistir à ação digestiva dos lisossomos. Posteriormente, a célula hospedeira sofre apoptose e morte celular, resultantes da intensa multiplicação dos parasitos, e como consequência, as formas amastigotas são liberadas, podendo ser interiorizadas por outras células fagocíticas (NADERER; MCCONVILLE, 2008). No caso da LV, o baço, o fígado e a medula óssea são os principais órgãos agredidos pela *L. infantum* (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVEZ, 2014).

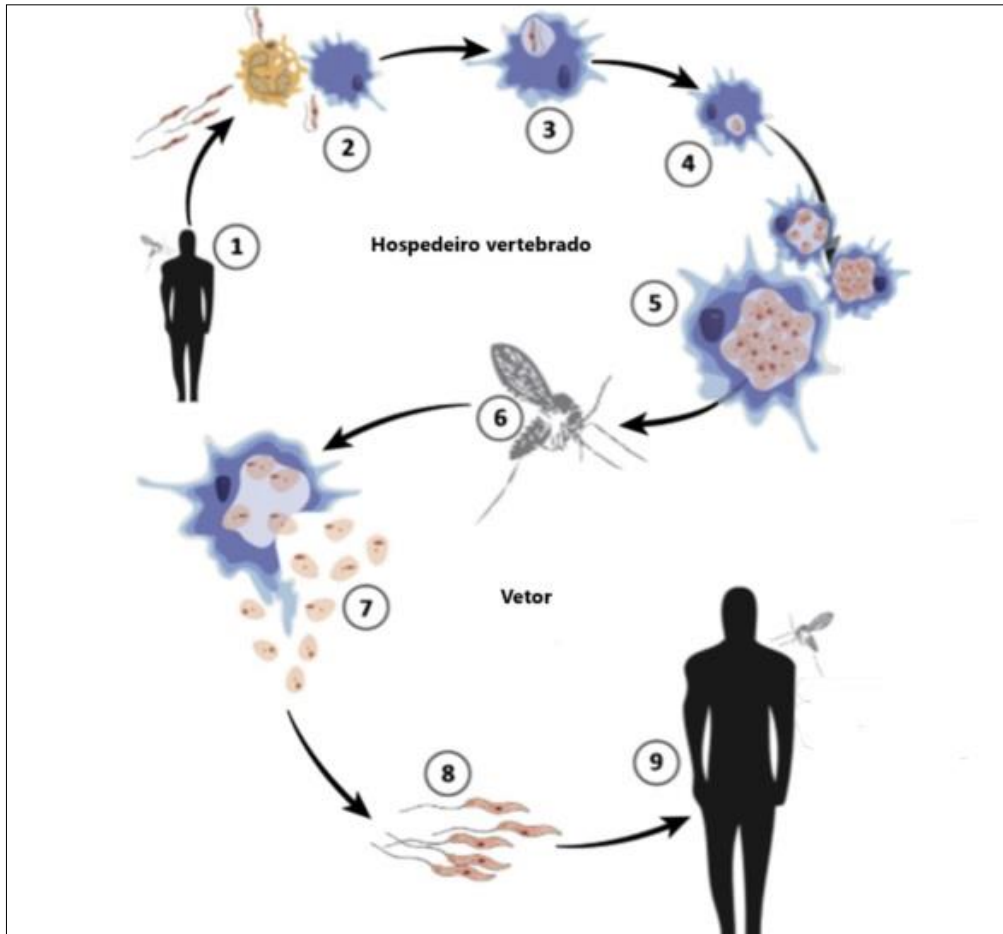
Quando ocorre a transição do hospedeiro vertebrado para vetor, os parasitos enfrentam mudanças bem distintas (BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006; KILLICK-KENDRICK, 1990) e, para que eles possam sobreviver as variações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, eles se diferenciam em formas promastigotas (BESTEIRO *et al.*, 2007; MCCONVILLE; HANDMAN, 2007; SACKS; KAMHAWI, 2001). No vetor, o ciclo tem início quando a fêmea de flebotômíneo se alimenta de sangue de um hospedeiro infectado, ingerindo, assim, macrófagos parasitados, que por sua vez, no intestino do vetor, rompem-se e liberam as formas amastigotas (LAINSON; SHAW, 1987).

Chegando ao intestino médio do flebotômíneo, as amastigotas são envoltas, juntamente com o alimento, pela matriz peritrófica (MP). No interior dessa matriz, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas, pouco móveis que se multiplicam intensamente. Após esse processo, ao final da ingestão do sangue, a MP se rompe, liberando os parasitos (LAINSON; SHAW, 1987).

Dependendo da espécie do parasito, as promastigotas habitarão em diferentes regiões do tubo digestivo do vetor (LAINSON; SHAW, 1987). Nesses locais, ainda em processo de multiplicação, os parasitos permanecerão aderidos (através do flagelo) ao epitélio do intestino do vetor. Posteriormente, continuaram o processo chamado de metaciclogênese, que dará origem as formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) (DESCOTEAUX; TURCO, 1999; SACKS; PERKINS, 1984). Durante esse processo, as promastigotas sofrem uma série de mudanças na expressão gênica, na morfologia e no lipofosfoglicano (LPG) presente na sua superfície (SARAIVA *et al.*, 1995). Os parasitos migram para o intestino anterior do inseto

vetor, podendo então, durante um novo repasto sanguíneo, regurgitar as formas infectantes em novo hospedeiro (Figura 6). Desta maneira, os vetores desempenham um papel importante no ciclo de vida das leishmânias, tanto durante o desenvolvimento (uma vez que necessitam do vetor para completar o seu desenvolvimento), quanto na sua transmissão a um hospedeiro vertebrado susceptível.

Figura 6 – Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Cantacessi *et al.* (2015).

Nota: Durante o repasto sanguíneo o hospedeiro vertebrado é infectado através da picada do inseto com a forma promastigota metacíclica (1). Os parasitos invadem macrófagos e granulócitos (2, 3), e evoluem para formas amastigotas intracelulares (4). As amastigotas se replicam dentro do fagolisossomo (5). A célula hospedeira sofre apoptose e morte celular, resultantes da reprodução por divisão binária, liberando as amastigotas que são internalizadas por outros macrófagos (6). Os macrófagos contendo as amastigotas são ingeridos pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. Os parasitos são liberados dos macrófagos infectados dentro do intestino médio do vetor onde (7), se transformam em promastigotas, passando por várias fases de multiplicação e diferenciação (8). Os parasitos migram para o estomodeu (intestino médio anterior) e se transformam em promastigotas metacíclicas (forma infectante). As formas infectantes são transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (9).

2.3 As leishmanioses

2.3.1 Etiologia

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania*. Esses agentes possuem uma ampla distribuição geográfica e estão associados a diferentes espécies de vetores e hospedeiros. Cada espécie possui suas próprias características em termos genéticos, de vetores e de hospedeiros associados, bem como na manifestação clínica da doença que elas causam. As leishmanioses ocorrem em 98 países de quatro continentes (América, Europa, Ásia e África) e são estimados em aproximadamente 1,6 milhões de casos novos por ano (ALVAR *et al.*, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Inicialmente, diferentes espécies de *Leishmania* foram identificadas com base em critérios clínicos (formas visceral, cutânea e mucocutânea), bioecológicos (espécies de vetores e hospedeiros) e epidemiológicos (p. ex., distribuição geográfica). Porém, análises imunológicas, bioquímicas, moleculares e análises filogenéticas têm sugerido a existência de uma grande diversidade de espécies no gênero *Leishmania*.

Dois subgêneros (*Viannia* e *Leishmania*), por exemplo, foram definidos com base nas diferenças observadas em relação ao sítio anatômico de desenvolvimento dos parasitos no tubo digestivo dos flebotomíneos (LAINSON; SHAW, 1987). O subgênero *Leishmania* ocorre em grande parte da América Latina, sendo que a espécie *L. infantum* ocorre desde o norte da Argentina até o sul do Canadá (apenas relatos em cães, não em humanos). Da mesma forma, o subgênero *Viannia* apresenta ampla distribuição, estando à espécie *L. braziliensis* presente da Argentina ao México.

A expressão clínica das leishmanioses varia de acordo com uma série de fatores, entre eles, a espécie do agente etiológico, e da resposta imunológica (inata e adaptativa) do hospedeiro frente à infecção estabelecida (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVEZ, 2014).

2.3.2 Leishmaniose visceral (LV)

A LV foi registrada pela primeira vez na América do Sul no ano de 1913 e sua identificação no Brasil só ocorreu no ano de 1934. Tem ampla distribuição mundial, ocorre em países da Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas (BRASIL, 2006). Estima-se que 200–400 mil casos de LV sejam notificados anualmente (ALVAR *et al.*, 2012), porém esses números podem ser subestimados, uma vez que as leishmanioses não são notificadas em todos os países onde elas ocorrem.

O espectro clínico da LV pode variar desde formas assintomáticas até quadros graves, potencialmente fatais. Baço, medula óssea e fígado são os principais órgãos acometidos e os principais sinais/sintomas clínicos são febre, hepatoesplenomegalia (Figura 7), anemia, linfadenopatia e pancitopenia (BADARÓ; DUARTE, 2015). Na maioria dos casos são fatais se o indivíduo não receber tratamento adequado, em tempo hábil (BRASIL, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

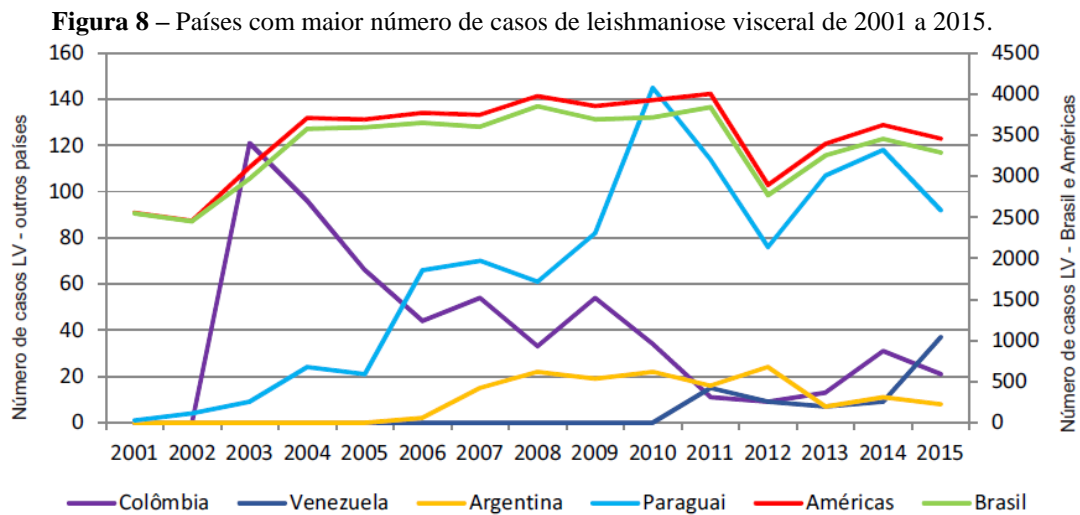
Figura 7 - Caso de leishmaniose visceral em criança de quatro anos de idade apresentando distensão abdominal decorrente de hepatoesplenomegalia.



Fonte: Silveira *et al.* (2016).

Nas Américas, no período de 2001 a 2015 foram notificados 52.176 casos de leishmaniose visceral em humanos. Ainda referente às Américas, os casos de LV estão presentes em 12 países (REPORT LEISHMANIASIS, 2014).

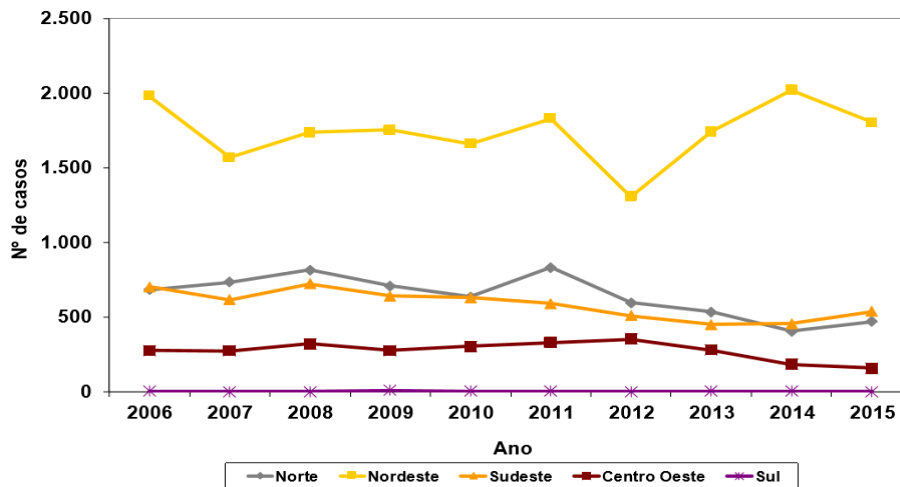
No Brasil, no período entre 2004 e 2011 há uma estabilidade no número de casos, com média anual de 3.835 notificações (Figura 8). Em 2012 os casos reduziram para 2.892 porém, em 2013, o número de casos voltou a crescer, seguindo o padrão das Américas. Uma média de 96,5% dos casos são relatados no Brasil com uma incidência de 5,1 casos/100.000 habitantes, seguido de Paraguai (2,4%), Argentina (0,7%), Colômbia (0,3%) e México (0,1%) (REPORT LEISHMANIASIS, 2014).



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2017).

A LV nas Américas está relacionada principalmente à espécie *L. infantum*, cuja transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre primariamente através da picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* (LYRA *et al.*, 2015). A LV era restrita às áreas rurais, porém houve uma expansão significativa para as áreas urbanas nas últimas décadas (BRASIL, 2006). Segundo o Ministério da Saúde, a forma visceral ocorre em 23 dos 27 dos estados brasileiros (BRASIL, 2015), destacando-se principalmente a região nordeste, onde ocorre a maior parte dos casos notificados, como mostra a Figura 9.

Figura 9 - Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras entre os anos de 2006 a 2015.



Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2015).

Em Pernambuco, a LV não se restringe apenas nos municípios do Sertão e do Agreste. Casos de LV também têm sido registrados na Zona da Mata e Região Metropolitana do Recife, em municípios como Itamaracá, Paulista e Goiana (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Os casos de LV estão associados ao fluxo migratório, más condições de infraestrutura e saneamento básico, e as crianças têm sido constantemente afetadas (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

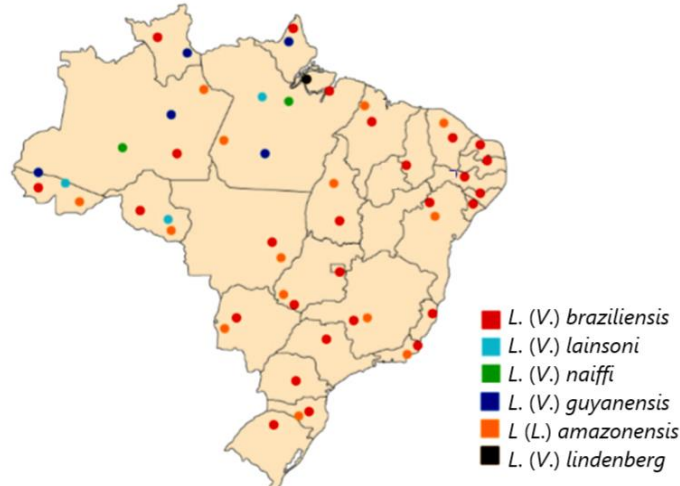
A expansão da doença está associada, principalmente, aos programas de controles, que são ineficientes (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). De acordo com a OMS (2012), esses programas são difíceis de serem implementados, pois a doença afeta as populações que vivem nas áreas de difícil acesso.

2.3.3 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

A LTA é uma zoonose de grande relevância, sendo registrada em todas as regiões do Brasil, causando um grande impacto na saúde pública no país. Atualmente, ainda existem lacunas no conhecimento da epidemiologia e ciclos de transmissão dessa endemia, particularmente em relação à identificação de espécies de flebotomíneos envolvidos na sua transmissão. Atualmente, o principal agente etiológico da LTA no Brasil é a *L. braziliensis*, espécie amplamente difusa no país e que pode ser transmitida por diferentes espécies de

flebotomíneos (Figura 10) (BRASIL, 2010; BRITO *et al.*, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Figura 10- Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela etiologia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil.



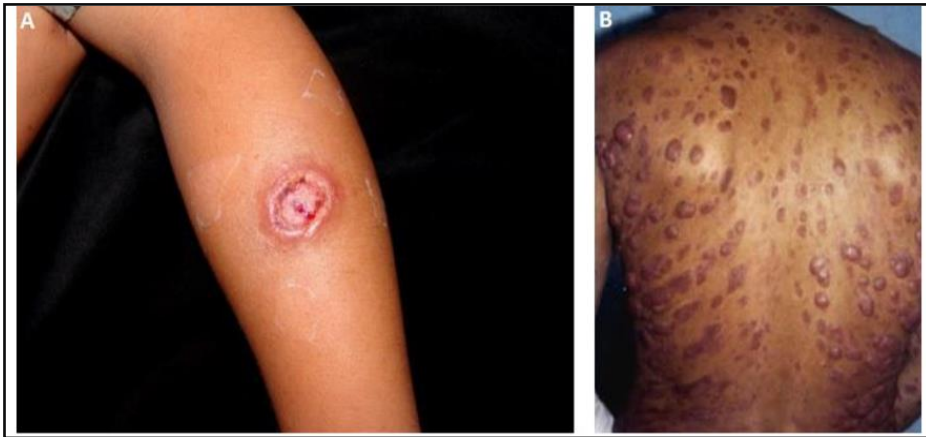
Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (Brasil, 2010).

A LTA apresenta várias formas clínicas, tais como: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM) (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVEZ, 2014; REY, 2013).

A LCL se caracteriza pelo desenvolvimento de uma lesão ulcerada que permanece restrita ao local em que o parasito foi inoculado (Figura 11 A), caracterizando-se pelo desenvolvimento de uma lesão ulcerada que aparecem após um período de latência de aproximadamente 30 dias e permanece restrita ao local da inoculação. A carga parasitária nas lesões e formas localizadas depende de vários fatores, como por exemplo, o sistema imunológico do indivíduo e da espécie de *Leishmania* envolvida (SCHOTTELIUS; COSTA, 1980).

O progresso da lesão depende também do estado imune do indivíduo e em alguns casos, pode evoluir para formas disseminadas (LCD), onde há a presença de várias lesões distribuídas pelo revestimento cutâneo (Figura 11 B) (NERY-GUIMARÃES, 1965; SCHOTTELIUS; GONÇALVES DA COSTA, 1980). A LCD é considerada rara e possui relativamente poucos casos descritos na literatura e se encontra distribuída em alguns países das Américas, África e Ásia. A evolução clínica dessa forma da doença tem sido atribuída a algumas características, como espécie do parasito e aspectos imunológicos do hospedeiro.

Figura 11 - Formas clínicas da leishmaniose cutânea



Fonte: Adaptado de Torres-Guerrero *et al.* (2017).

Nota: **A.** leishmaniose cutânea localizada **B.** leishmaniose cutânea difusa

A LM, também conhecida como “espúndia” na América do Sul, é encontrada principalmente nos países do novo mundo. As espécies *L. braziliensis* e *L. aethiopica* (velho mundo), são os agentes etiológicos mais comuns que causam esta forma clínica (BRASIL, 2010). Caracteriza-se com a destruição da mucosa, como resultado de uma intensa resposta inflamatória na mucosa nasal, oral, faringe e/ou laringe (LESSA *et al.*, 2007).

Em geral, as lesões podem ser discretas, iniciando a partir de uma lesão cutânea idêntica à da LC, mas a infecção se estende para a mucosa adjacente e a cartilagem do trato respiratório superior progredindo para lesões típicas como ulceração crônica, com bordas salientes (BARI, 2012) (Figura 12).

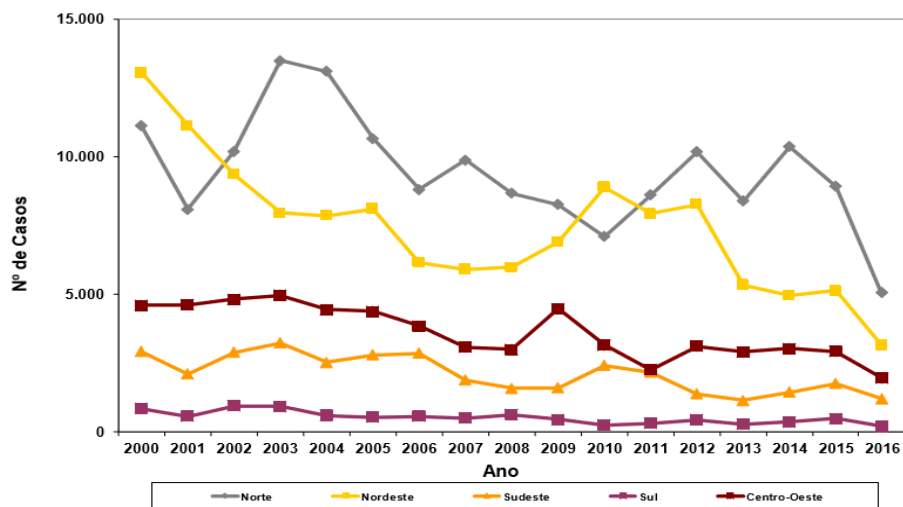
Figura 12- Leishmaniose mucocutânea.



Fonte: Bari (2012)

De um modo geral, a LTA é uma doença dermatológica que merece grande atenção, devido à sua grande relevância clínica (BRASIL, 2007). Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras, principalmente nas regiões norte e nordeste (DIAS *et al.*, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017), conforme dados do Ministério da Saúde referentes aos casos notificados entre os anos de 2000 a 2016 (Figura 13).

Figura 13 - Casos de leishmaniose tegumentar americana por regiões brasileiras entre os anos de 2000 a 2016.



Fonte: Ministério da Saúde (Brasil, 2016).

2.4 LTA no Brasil

Há muitos anos atrás a LTA estava associada apenas a *L. braziliensis* como único agente existente no país. No ano de 1961, alguns pesquisadores já subdividia a espécie *L. braziliensis* em diversas subespécies, tais como: *braziliensis*, *guyanensis*, *peruviana*, *mexicana* e *pifanoi*. Essa diferenciação estaria relacionada com as diversas formas clínicas da doença nas diferentes regiões. A partir daí a classificação das leishmânias começou a ser baseada em critérios mais consistentes, como por exemplo, as características do comportamento do parasita em meios de cultura, animais de experimentação e seus vetores (DO VALE; FURTADO, 2005).

A *L. braziliensis* é considerada o agente etiológico mais importante da LTA. Além de ter sido identificada em vários países desde o sul da América do Norte (México) até o sul da

América do Sul (Argentina), apresenta ampla distribuição em todo o território brasileiro (CANTACESSI *et al.*, 2015). Atualmente, 12 espécies de *Leishmania* são responsáveis pela LTA nas Américas, destas, três pertencem ao subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. venezuelensis*) e nove ao subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. colombiensis* e *L. lindenbergi*) (BRAZIL *et al.*, 2015).

A evolução da LTA no Brasil pode ser observada devido a sua grande expansão geográfica desde os anos 80. Em 1994 foram notificados casos autóctones em 1.861 municípios (BRASIL, 2006). Entre 1985 e 1999 foram registrados um total de 388.155 casos da doença no país (BRASIL, 2003). No passado, o principal padrão epidemiológico era o de zoonose que possuía uma transmissão exclusivamente silvestre, porém as várias alterações no meio ambiente modificaram todo o perfil epidemiológico da LTA, facilitando a invasão dos hospedeiros e/ou reservatórios ao ambiente peridoméstico e a manutenção de um ciclo de transmissão zoonótico nesse ambiente (BRASIL, 2006; LAINSON; SHAW, 1998).

A partir do ano de 2002 houve uma expansão da doença sendo registradas 2.302 notificações, sendo as regiões norte e nordeste responsáveis pelo maior número dos casos registrados (BRASIL, 2006). A partir de 2003, a LTA foi considerada como transmissão autóctone em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2010).

Segundo a OMS, no período de 2012 a 2014, registrou-se mais de 51 mil novos casos de LT nas Américas (REPORT LEISHMANIASIS, 2014). O Brasil, no período de 2009 a 2013, foi o terceiro país que obteve o maior número de casos novos registrados no mundo, com uma média anual de aproximadamente 21.000 casos (WHO, 2017). Em 2014 foram notificados 20.418 casos novos (BRASIL, 2016).

No Brasil, há várias espécies de flebotomíneos implicadas na transmissão da LTA (BRASIL, 2010; BRITO *et al.*, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LACERDA, 1994) porém, a espécie *Lu. whitmani* é considerada o principal vetor da *L. braziliensis* nas regiões de caatinga, cerrado, mata atlântica, e em vários estados, entre eles, Pernambuco (ANDRADE *et al.*, 2009; BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LEGRIFON *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

2.5 LTA em Pernambuco

Nos últimos 20 anos têm-se observado um grande crescimento desta endemia com surtos em todos os estados, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2010). Em Pernambuco, por exemplo, a LTA incide em todas as regiões, com predominância dos casos na região da zona da mata, com o registro de mais de 60% do total de casos notificados (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999).

A manutenção de um ciclo em uma determinada região depende de um conjunto de fatores entre eles, presença de agentes etiológicos, reservatórios, vetores e, principalmente, de condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Sabe-se que a espécie *L. braziliensis* é predominante em áreas de colonização antiga associada a resquícios de florestas tropicais, matas secundárias e/ou plantações, propícias a colonização dos flebotomíneos (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 1993).

Vários estudos sobre flebotomíneos têm sido desenvolvidos no estado de Pernambuco, fornecendo novos conhecimentos na ecoepidemiologia das leishmanioses no Nordeste do Brasil, principalmente no que se refere a LTA. Um total de 37 espécies de flebotomíneos, e cerca de 14 gêneros tem sido relatado no estado (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010). Os dados disponíveis na literatura relatam a identificação de variadas espécies no município de Igarassu e na Região Metropolitana do Recife. Na Zona da Mata também há ocorrência de algumas espécies em área endêmica (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999).

Quando comparado aos estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe, a diversidade de espécies de flebotomíneos em Pernambuco é considerável (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010). Em parte, isso se deve ao número de estudos sobre a ecoepidemiologia das leishmanioses realizados em todo o estado. Uma área bastante estudada em Pernambuco é o Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), onde surtos esporádicos de LTA foram registrados entre os anos de 1996 a 2007 (ANDRADE *et al.*, 2009; BRANDÃO-FILHO, 1998; DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b).

O CIMNC se localiza em uma área de mata atlântica e apresenta um clima quente e úmido, o que favorece a diversidade de fauna local de flebotomíneos. Por isso, além das espécies que já são consideradas como vetoras de *L. braziliensis*, registra-se também a presença de outras espécies que poderiam estar atuando como potenciais vetores, como é o

exemplo de *Lu. choti*. Estudos realizados em Pernambuco indicam que *Lu. choti* é uma espécie abundante em resquícios de mata atlântica (ANDRADE *et al.*, 2005b; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998; DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b; MIRANDA *et al.*, 2015; SILVA; VASCONCELOS, 2005), além de apresentar propensão a picar humanos (BALBINO *et al.*, 2005).

Um estudo mais recente, conduzido por Dantas-Torres *et al.* (2017b) no CIMNC, asseverou a existência de uma ampla diversidade de espécies de flebotomíneos, mais uma vez confirmando abundância de *Lu. choti*. Houve também a primeira evidência da associação entre *L. braziliensis* e *Lu. choti*, sugerindo assim a sua possível participação como vetor.

3 JUSTIFICATIVA

Em Pernambuco, surtos de LTA têm sido registrados no CIMNC. Em agosto de 1996, 26 casos autóctones foram notificados entre os militares envolvidos em atividades de treinamento noturno. Em 2006, relatou-se a ocorrência de um novo surto de LTA, envolvendo militares que participaram de treinamento no CIMNC no período de julho a agosto do mesmo ano, com 71 casos confirmados. Entre 1996 a 2007, uma breve análise das notificações de casos de LTA em militares após treinamentos no CIMNC revelou o registro médio de 16 casos autóctones por ano. Em 2009, relatou-se a ocorrência de um novo surto de LTA, envolvendo 71 militares que participaram de treinamento no CIMNC no período de julho a agosto do mesmo ano. A transmissão no CIMNC apresenta características epidemiológicas peculiares por se tratar de uma região com vasta área de mata atlântica primária remanescente e áreas fragmentadas de mata secundária.

Pesquisas demonstraram uma ampla variedade de espécies de flebotomíneos que poderiam atuar como vetores de *L. braziliensis* no CIMNC. *Lutzomyia choti*, por exemplo, é uma espécie que se encontra de forma mais abundante nessa área e poderia estar atuando como um potencial vetor, considerando também a sua conhecida antropofilia (BALBINO *et al.*, 2005). De fato, a detecção de DNA de *L. braziliensis* em fêmeas de *Lu. choti* foi relatada recentemente em estudo realizado no CIMNC (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017).

Estudos sobre a identificação da(s) espécie(s) envolvida(s) na transmissão da LTA em fragmentos de mata atlântica no nordeste do Brasil, como é o caso do CIMNC, são de fundamental importância no intuito de reforçar o conceito de que múltiplos vetores podem estar envolvidos na transmissão de *Leishmania* spp. ao homem.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Poderiam diferentes espécies de *Lutzomyia* estar atuando como potenciais vetores de *L. braziliensis* no CIMNC?

5 HIPÓTESE

No CIMNC, diferentes espécies de *Lutzomyia* podem estar atuando como potenciais vetores de *L. braziliensis*.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Investigar a presença de *Leishmania* spp. em fêmeas de *Lutzomyia* spp. capturadas no CIMNC.

6.2 Objetivos específicos

- A) Detectar DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de *Lutzomyia* spp. coletadas no CIMNC;
- B) Identificar as espécies de *Leishmania* spp. detectadas em fêmeas de *Lutzomyia* spp. coletadas no CIMNC.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Área de estudo

O Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC) é uma unidade militar, que está inserida na zona da floresta atlântica do estado de Pernambuco (Figura 14). No século XVI, as terras da região começaram a ser exploradas, sendo o corte do pau-brasil umas das principais atividades na época.

Figura 14 – Vista aérea da sede do Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti.



Fonte: Google maps (CAMPO..., 2017)

Os engenhos de cana-de-açúcar foram estabelecidos na região em 1660 e apenas no ano de 1944 o CIMNC foi fundado com a finalidade de servir como um centro de instrução militar do exército brasileiro (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998).

A sede do CIMNC se encontra no município de Paudalho (07°50'00"S - 35°06'00"W), aproximadamente 42 km da capital Recife (BELTRÃO *et al.*, 2005). A região abrange os cinco municípios (Araçoiaba, Paulista, Igarassu, Paudalho e Tracunhaém), totalizando 7.324 hectares (ha) de área (SOBRAL-LEITE, 2011). O acampamento possui um

pavilhão central de comando e duas aldeias com 16 casas adjacentes. Possui ainda, uma escola, uma capela, 14 vigias de casas e oito galpões utilizados para tropas sob treinamento e seis áreas para treinamento militar e exercícios (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998).

O clima desta região é de tipo tropical chuvoso com verão seco. A vegetação é representada pela floresta tropical atlântica distribuída em dois tipos principais: floresta ombrófila aberta e sem decidual sazonal (SOBRAL-LEITE, 2011) A escolha da área de estudo se deve aos surtos de LTA que são relatados esporadicamente nesta região.

7.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos utilizados para esse estudo foram espécimes coletados em um estudo realizado anteriormente no CIMNC (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b). No período de julho de 2012 a julho de 2014, armadilhas luminosas do tipo CDC foram instaladas no final da tarde (17:00 horas) e retiradas as 06:00 horas do dia seguinte. Cada armadilha foi posicionada a 1,5 m do nível do chão e instaladas em 10 diferentes pontos de coleta pré-selecionados (CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS8, CS9 e CS10). As coletas foram realizadas mensalmente, durante quatro noites consecutivas.

Os ecótopos escolhidos foram áreas próximas a buracos de animais, troncos e raízes de grandes árvores, geralmente em ambientes sombreados e úmidos. Outros locais também foram selecionados, porém todos eles estavam próximos dos lugares onde os soldados costumavam acampar durante a noite durante os períodos de treinamento, com exceção para o ponto CS10, que era referente a um estábulo de ovelhas e cabras (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b).

As fêmeas de flebotomíneos coletadas foram separadas por espécie, dia e local de captura, e colocadas em frascos rotulados contendo etanol a 70% (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b), para posterior identificação morfológica (YOUNG; DUNCAN, 1994) e realização dos testes moleculares.

Inicialmente, os flebotomíneos selecionados para esse estudo foram de fêmeas de *Lu. choti*, por ser essa a espécie mais abundante na região de estudo e pela recente detecção de DNA de *L. braziliensis* nessa espécie (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b). As fêmeas de

flebotomíneos da espécie *Lu. choti* selecionadas para os testes moleculares foram referentes aos meses entre outubro de 2012 a julho de 2013.

Posteriormente, foram selecionadas também amostras aleatórias de outras espécies do gênero *Lutzomyia*, a saber: *Lu. longispina*, *Lu. sordellii*, *Lu. complexa/wellcomei* e *Lu. umbratilis*. Essas espécies foram escolhidas por critério de abundância (depois de *Lu. choti*) (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b).

7.3 Extração de DNA

Para extração de DNA, utilizaram-se 1807 fêmeas de flebotomíneos, distribuídas em cinco espécies (Tabela 1). O DNA foi extraído de forma individual ou em *pools* de 2 a 10 fêmeas, em base ao número disponível de exemplares capturados, de acordo com a data e ponto de coleta.

Tabela 1 – Quantidade de fêmeas e de *pools* utilizados para a realização da extração de DNA genômico das fêmeas do gênero *Lutzomyia* sp.

Espécie	Total de fêmeas
<i>Lu. choti</i>	1000 (6 individuais e 994 em <i>pools</i>)
<i>Lu. complexa/wellcomei</i>	76 (10 individuais e 66 em <i>pools</i>)
<i>Lu. longispina</i>	498 (8 individuais e 490 em <i>pools</i>)
<i>Lu. sordellii</i>	217 (21 individuais e 196 em <i>pools</i>)
<i>Lu. umbratilis</i>	16 (2 individuais e 14 em <i>pools</i>)
Total	1807 (47 individuais e 1760 em <i>pools</i>)

Fonte: Do autor, 2018.

Os flebotomíneos selecionados para o estudo foram macerados em 100 µl da resina Chelex 5% (0,5 g de soluto em 10 ml de água deionizada esterilizada), dentro de microtubos esterilizados de 1,5 ml. Em seguida as amostras foram incubadas por uma hora a 56°C. Posteriormente, incubadas novamente a 94°C durante 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 6 min a 16.200 g, retirado sobrenadante, transferido para microtubos esterilizados de 1,5 ml devidamente identificados. Por fim, as amostras foram acondicionadas a - 20°C (COOMBS *et al.*, 1999) até o teste por PCR em tempo real.

A cada quinze exemplares extraídos, havia um controle da extração contendo 100 µl de Chelex (5%). A quantidade e o grau de pureza das amostras de DNA foram determinados usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

7.4 PCR em tempo real

O DNA dos flebotomíneos foi testado pela técnica de PCR em tempo real utilizando os iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda TaqMan[®] FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-não fluorescente quencher-MGB, nas condições descritas por Dantas-Torres *et al.* (2017a). O alvo detectado pelos primers é um fragmento de 120 pares de base do kDNA de *Leishmania* spp.

A quantidade de iniciadores e sonda TaqMan[®] foram adicionadas a 900 nM e 200 nM, respectivamente. Foi utilizada uma quantidade de 7.5 µl de TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) com a mistura da reação ajustada para um volume final de 15 µl. O perfil do ciclo término foi de 95°C durante 20 s, 40 ciclos a 95°C por 1 s e 60°C por 20 s (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017a).

Cada reação de amplificação conteve uma curva padrão e um controle negativo sem DNA (*no template control* - NTC). Todas as reações de PCR em tempo real foram executadas no QuantStudio[®] 5 (Applied Biosystems) e realizadas em unicata. As amostras de que apresentaram amplificações, foram feitas em duplicata para confirmação dos resultados.

7.5 Análise por enzima de restrição

Para identificação da espécie de *Leishmania*, os produtos da PCR em tempo real positivos gerados nesse estudo foram processados e analisados conforme descrito por Dantas-Torres *et al.* (2017b). Em resumo, os produtos foram digeridos com a enzima de restrição HaeIII (New England BioLabs) durante 1 hora e 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese em um gel de agarose de alta fidelidade a 4% (Invitrogen). Para visualização, as bandas foram coradas com brometo de etídio e observadas em luz ultravioleta.

Para essa análise, excluíram-se amostras com Ct (*cycle threshold*) acima de 31, considerando que essas amostras apresentam uma baixa carga parasitária (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017a).

7.6 Análise dos dados

A amostra mínima significativa ($n = 389$ fêmeas) foi calculada com auxílio do Sample Size Calculator do Raosoft® (<http://www.raosoft.com/samplesize.html>), considerando uma margem de erro de 1%, um nível de confiabilidade de 99%, uma população desconhecida e uma taxa de infecção de 0,6% (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b).

A taxa mínima de infecção (*minimum infection rate*, MIR) foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $MIR = (\text{número de pools positivos/número total de espécimes testados}) \times 100$. A taxa mínima de infecção, com o respectivo intervalo de confiança de 95% foi calculada com o auxílio dos programas Excel Microsoft® e BioEstat 5.3 (AYRES *et al.*, 2007).

8 RESULTADOS

8.1 Detecção de *Leishmania* spp.

Foram analisadas um total de 1807 fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo que 1760 foram testadas em *pools* (2-10 espécimes) e 47 individualmente. Destas, 65 amostras apresentaram um produto de amplificação para detecção de *Leishmania* spp. Fêmeas de todas as espécies testadas apresentaram positividade, porém o número de pools/indivíduos positivos por espécie variou 1 a 28 (Tabela 2). Com esses dados, nesse estudo obteve-se uma MIR de 3,6%.

Tabela 2 – Número total de amostras positivas, testadas e taxa mínima de infecção por espécie.

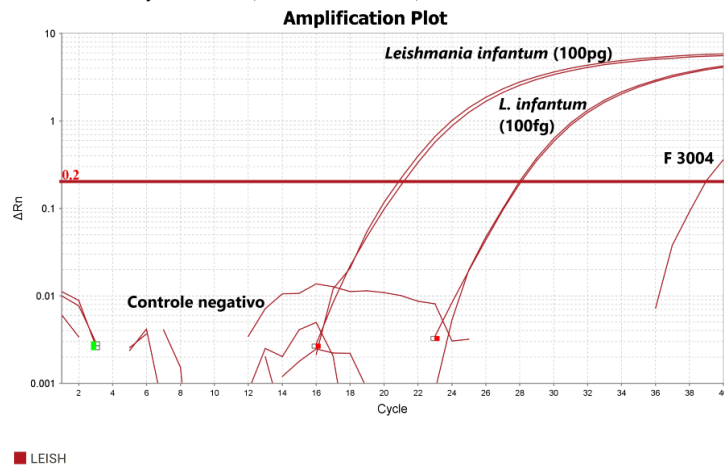
Espécie	Amostras positivas/testadas	Taxa mínima de infecção (%)
<i>Lu. choti</i>	1/1000	0,1
<i>Lu. complexa/wellcomei</i>	11/76	14,4
<i>Lu. longispina</i>	28/498	5,6
<i>Lu. sordellii</i>	24/217	11,1
<i>Lu. umbratilis</i>	1/16	6,3
Total	65/1807	3,6

Fonte: Do autor, 2018.

8.1.1 *Lutzomyia choti*

Das mil fêmeas que foram testadas da espécie *Lu. choti*, uma amostra individual foi positiva (MIR 0,1%) na PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania* spp. (Figura 15). A amostra (F3004) apresentou uma amplificação tardia (*Cycle Threshold* (CT) de 38,0).

Figura 15 - Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* proveniente de amostra individual de *Lutzomyia choti* (amostra F3004).

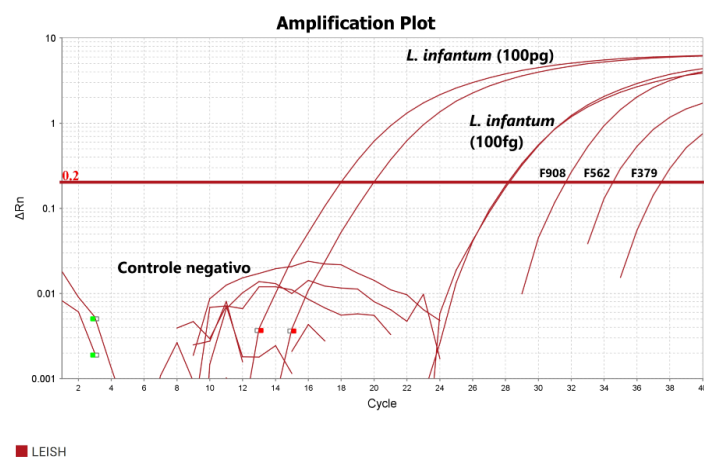


Fonte: Do autor, 2018.

8.1.2 *Lutzomyia complexa/wellcomei*

Dos 76 espécimes, destes, foi detectada uma positividade em 11 amostras (5 *pools* e 6 individuais) de fêmeas de *Lu. complexa/wellcomei*, (ID F379, F562, F908, F120, F226, F293, F56, F184, F200, F207 e F233), com MIR de 14,5%. A Figura 16 mostra a variação do CT em três amostras na espécie. A amostra F908 com CT de 31,6, a amostra F562 apresentando um CT de 34,0 e a amostra F379 com CT de 37,3.

Figura 16 - Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* proveniente de *pools* de *Lutzomyia complexa/Lutzomyia wellcomei* (amostras F908, F562 e F379).

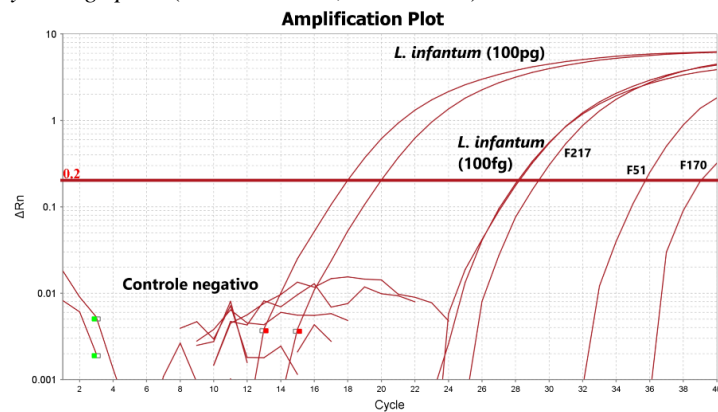


Fonte: Do autor, 2018.

8.1.3 *Lutzomyia longispina*

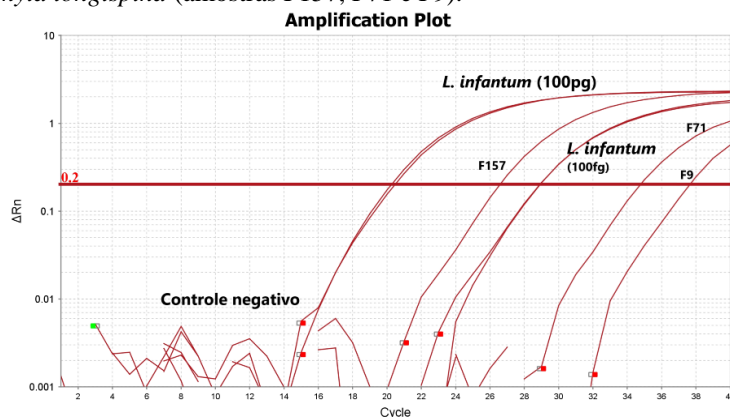
Para a espécie *Lu. longispina*, a MIR foi de 5,6%. Esse resultado foi obtido através da análise de 498 fêmeas. Destas, 28 amostras foram positivas para detecção de *Leishmania* spp. no teste molecular, sendo 24 agrupadas em *pools* e 4 individuais (ID F12, F15, F16, F34, F48, F51, F91, F137, F140, F170, F185, F210, F212, F217, F219, F242, F67, F71, F153, F157, F164, F208, F221, F251, F9, F131, F135 e F149). As Figuras 17 e 18 apresentam três amostras positivas cada (F217, F51, F170, F157, F71 e F9), que apresentaram CT variando de 26,5 a 39.

Figura 17 - Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* proveniente de *pools* de *Lutzomyia longispina* (amostras F217, F51 e F170).



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 18 - Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* proveniente de *pools* de *Lutzomyia longispina* (amostras F157, F71 e F9).



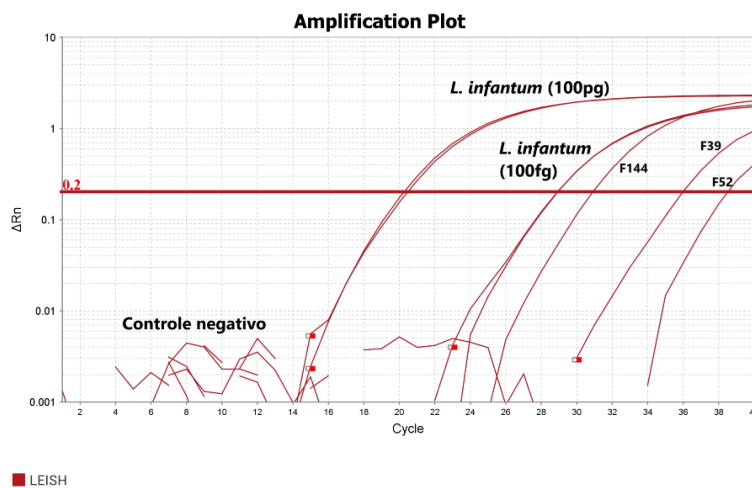
Fonte: Do autor, 2018.

8.1.4 *Lutzomyia sordellii*

Foram analisadas 217 fêmeas da espécie *Lu. sordellii*. Na PCR em tempo real para detecção de *Leishmania* spp. ocorreu uma positividade em um total 24 amostras (ID F39, F52, F58, F72, F80, F155, F160, F180, F214, F224, F255, F1029, F1031, F68, F90, F128, F136, 144, F148, F151, F154, F175, F202 e F208). Nessas amostras 13 delas estavam agrupadas em *pools* e 11 estavam dispostas de forma individual.

Esse resultado corresponde a uma MIR de 11,1%. A Figura 19 apresenta três amostras (F144, F39 e F52) positivas, com uma amplificação de CT de 30,8, CT de 35,9 e CT de 38,4, respectivamente.

Figura 19 - Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* proveniente de *pools* de *Lutzomyia sordellii* (amostras F144, F39 e F52).

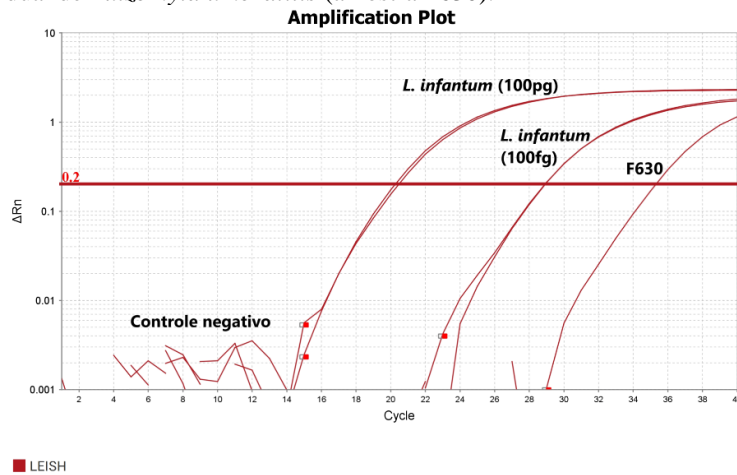


Fonte: Do autor, 2018.

8.1.5 *Lutzomyia umbratilis*

Dos 4 *pools* de *Lu. umbratilis* testados, nenhum apresentou positividade. Porém, das 2 amostras individuais testadas, uma delas foi positiva (F630) para a detecção de DNA de *Leishmania* por PCR em tempo real (MIR = 6,3%), apresentando um CT de 35 (Figura 20).

Figura 20 - Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* proveniente de amostra individual de *Lutzomyia umbratilis* (amostra F630).



Fonte: Do autor, 2018.

Todas as amostras foram realizadas em unicata, e quando positivas, tiveram suas reações de PCR em tempo real executadas em duplicatas para confirmação do resultado. Não foram observadas variações significativas nas repetições.

8.2 Análise por enzima de restrição

Das 15 amostras selecionadas para a análise com a enzima de restrição, 13 apresentaram um padrão de bandas sugestivas de *L. braziliensis* (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados as análise por enzima de restrição, de acordo com a espécie de flebotomíneo e *cycle threshold*. (continua)

ID	Espécie	<i>Cycle threshold</i>	Análise por enzima de restrição
F48	<i>Lu. longispina</i>	30,911	<i>L. braziliensis</i>
F210	<i>Lu. longispina</i>	28,943	<i>L. braziliensis</i>
F212	<i>Lu. longispina</i>	29,578	<i>L. braziliensis</i>
F217	<i>Lu. longispina</i>	29,167	<i>L. braziliensis</i>
F219	<i>Lu. longispina</i>	29,815	<i>L. braziliensis</i>
F207	<i>Lu. complexa/wellcomei</i>	29,552	<i>L. braziliensis</i>
F226	<i>Lu. complexa/wellcomei</i>	29,831	<i>L. braziliensis</i>
F153	<i>Lu. longispina</i>	29,380	<i>L. braziliensis</i>
F157	<i>Lu. longispina</i>	26,506	<i>L. braziliensis</i>
F208	<i>Lu. longispina</i>	29,266	<i>L. braziliensis</i>
F221	<i>Lu. longispina</i>	28,942	<i>L. braziliensis</i>

Tabela 3 – Resultados as análise por enzima de restrição, de acordo com a espécie de flebotomíneo e *cycle threshold*. (conclusão)

F144	<i>Lu. sordellii</i>	30,074	<i>L. braziliensis</i>
F214	<i>Lu. sordellii</i>	28,978	<i>L. braziliensis</i>
F218	<i>Lu. sordellii</i>	27,850	Sem bandas
F224	<i>Lu. sordellii</i>	29,605	Sem bandas

Fonte: Do autor, 2018.

9 DISCUSSÃO

A LTA possui ampla distribuição nas Américas, sendo o Brasil o principal foco de leishmanioses nessa região (ALVAR *et al.*, 2012). De fato, a doença já foi registrada em todos os estados, com milhares de casos novos registrados todos os anos. A ampla distribuição geográfica e a presença da LTA em diferentes tipos de ambientes (silvestre, rural e urbano) denota a complexidade ecológica e epidemiológica dessa doença. Dentre vários outros aspectos, a multiplicidade de vetores e reservatórios é digna de nota. Vários estudos têm objetivado investigar a participação de várias espécies de flebotomíneos na transmissão de diferentes espécies de *Leishmania*, sendo esse conhecimento fundamental para entender o padrão de transmissão.

No Brasil, várias espécies de flebotomíneos têm sido consideradas capazes de transmitir leishmânias causadoras de LTA (BRASIL, 2010; BRITO *et al.*, 2012), sendo *Lu. whitmani*, *Lu. complexa* e *Lu. wellcomei* consideradas entre as principais espécies vetoras de *L. braziliensis* nas regiões da Zona da Mata Sul e Zona da Mata Norte de Pernambuco (ANDRADE, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999).

Lainson *et al.* (1973) e Souza *et al.* (1996) sugeriram a participação de *Lu. complexa* e *Lu. wellcomei* como vetores de *L. braziliensis*. Estudos realizados em campo, mostraram o comportamento antropofílico da espécie (LAINSON *et al.*, 1973; WARD *et al.*, 1973; WILKES *et al.*, 1984; CAMPBELL-LENDRUM *et al.*, 1999). *Lu. complexa* e *Lu. wellcomei* são espécies frequentemente presentes em áreas de transmissão de *L. braziliensis* em alguns estados do Brasil e possui ampla distribuição em Pernambuco (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010).

Em estudos realizados com a espécie *Lu. umbratilis*, também demonstra sua ativa antropofilia (RANGEL; LAINSON, 2003), porém tem preferência alimentar por animais que vivem nas copas das árvores, como por exemplo bicho-preguiça (GRIMALDI *et al.*, 1989). *Lu. umbratilis* transmite *L. guyanensis* no norte do país, além de haver indícios de que a espécie também possa transmitir *L. braziliensis*, uma vez que já foi encontrada naturalmente infectada esse parasito (GRIMALDI *et al.*, 1989; RANGEL; LAINSON, 2003; SHERLOK *et al.*, 1996). Mesmo tendo testado poucas amostras, os resultados do presente estudo confirmam a associação de *Lu. umbratilis* com *Leishmania* spp.

Lu. sordellii e *Lu. longispina* são espécies que, mesmo de forma pouco abundante, são frequentemente encontradas em estudos sobre flebotomíneos em Pernambuco (ANDRADE *et al.*, 2005b; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998; GUIMARÃES *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017; SILVA; VASCONCELOS, 2005). *Lu. sordellii* é encontrada em todas as regiões do país, sendo relatada principalmente em ambientes peridoméstico (em abrigos de animais, por exemplo), mas até o presente momento é uma espécie em que não há dados consistentes sobre sua participação na transmissão de *Leishmania* spp. Em estudo recente, Silva *et al.* (2017) demonstraram que *Lu. sordellii* é uma espécie com grande capacidade de se adaptar o ambiente doméstico, principalmente em casas próximas a fragmentos de floresta tropical. No presente estudo, registrou-se pela primeira vez a presença de DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de *Lu. longispina* e *Lu. sordellii*.

As taxas de infecção natural por *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos na maioria dos estudos é considerada baixa. Isso pode ocorrer devido a vários aspectos, principalmente em relação a variação na sensibilidade do método de detecção utilizado (*e.g.*, dissecação *versus* PCR). Outros fatores que poderiam teoricamente influenciar a taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos incluem a abundância de hospedeiros reservatórios, a prevalência da infecção nesses animais e o número de flebotomíneos testados.

A infecção natural por *Leishmania* spp. em flebotomíneos é geralmente confirmada por meio da visualização de formas promastigotas no intestino do vetor. A utilização de métodos moleculares em estudos de infecção natural em fêmeas flebotomíneos tem relevado taxas de infecção variadas (LIEBEL *et al.*, 2012; MICHALSKY *et al.*, 2011; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2006). Em nosso estudo, obtivemos uma taxa mínima de infecção de 3,6%. Em outros estudos, já foram relatadas taxas de infecção natural de 0,3% no Rio Grande do Sul (SILVA; GRUNEWALD, 1999), 2% no Rio de Janeiro de (PITA-PEREIRA *et al.*, 2005) e uma taxa de 2,6% no estado do Mato Grosso do Sul (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Contudo, diferenças metodológicas impedem qualquer tipo de comparação mais aprofundada.

Com o desenvolvimento das diversas técnicas de biologia molecular mais sensíveis, como a PCR em tempo real, facilitou a identificação do material genético da *Leishmania* spp. em flebotomíneos, mesmo que este esteja em pequenas quantidades. A PCR em tempo real

utilizada nesse estudo é considerada altamente sensível, sendo capaz de detectar quantidades de DNA equivalentes a menos de uma leishmânia (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017a).

Dentre as várias espécies de flebotomíneos que ocorrem em Pernambuco, *Lu. choti* é uma espécie que vem sendo bastante estudada ao longo dos últimos anos em trabalhos que comprovaram a sua presença e abundância em vários fragmentos de mata atlântica desse estado (ANDRADE *et al.*, 2005b; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998; DANTAS-TORRES *et al.*, 2017b; SILVA *et al.*, 2017; SILVA; VASCONCELOS, 2005; SILVA *et al.*, 2017). De fato, *Lu. choti* não só está presente em fragmentos de mata atlântica de Pernambuco, mas também se encontra em maior abundância que espécies consideradas vetoras comprovadas de *L. braziliensis*, como foi observado em um estudo mais recente realizado por Dantas-Torres *et al.* (2017b). Além disso, no estudo em questão, detectou-se DNA de *L. braziliensis* em fêmeas de *Lu. choti*.

Uma das características do complexo padrão de transmissão da *L. braziliensis* é o provável envolvimento de uma grande diversidade de vetores (BRAZIL *et al.*, 2015; MAROLI *et al.*, 2013). Contudo, o conhecimento sobre o papel das diversas espécies de flebotomíneos na transmissão desse parasito ao homem ainda é incipiente.

Em Pernambuco, os treinamentos militares que ocorrem no CIMNC têm sido associados a surtos de LTA, os quais têm sido relatados esporadicamente desde o primeiro registro no ano de 1996 (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998). Considerando os dados históricos dos casos de LTA relatados no CIMNC, podemos concluir que a região é uma importante área de transmissão, devido a existência de um ciclo enzoótico *L. braziliensis* na região da Mata Atlântica. Certamente, vale ressaltar que essa não é uma particularidade do CIMNC, mas de fragmentos de mata atlântica, onde pequenos mamíferos silvestres e flebotomíneos mantêm o enzoótico ciclo do parasito.

Resultados de trabalhos realizados em fragmentos de mata atlântica em Pernambuco, incluindo o CIMNC, reforçam a hipótese de que várias espécies de flebotomíneos podem estar envolvidas na transmissão de *L. braziliensis* ao homem. A sua constante presença e grande abundância, atreladas a sua conhecida antropofilia, colocam *Lu. choti* entre os potenciais vetores de *L. braziliensis* na região.

10 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e na hipótese investigada, o presente estudo confirma a presença de *L. braziliensis* em diferentes espécies de flebotomíneos, incluindo *Lu. complexa/wellcomei*, *Lu. longispina* e *Lu. sordellii*, além da presença de DNA de *Leishmania* spp. em *Lu. choti* e *Lu. umbratilis*. Novos estudos serão necessários para confirmar o papel vetorial de algumas dessas espécies na transmissão de *L. braziliensis*, pois elas podem estar atuando na manutenção desse parasito na área de estudo, seja no ciclo enzoótico, seja no ciclo zooótico.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, P.; SILVEIRA, H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Lisboa, v. 27, n. 2, p. 71-86, 2009.
- ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. *et al.* Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós colombianas. **História, Ciências e Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 853-882, 2003.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. Disponível em <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>> Acesso em: 20 jan 2017.
- ANDRADE, M. S. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2004.
- ANDRADE, M. S. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, p. 229-233, 2005a.
- ANDRADE, M. S. *et al.* Sand fly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1761-1767, 2005b.
- ANDRADE, M. S. *et al.* Novo surto de leishmaniose tegumentar americana em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 5, p. 594-596, 2009.
- ARAGÃO, H. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **O Brasil Médico**, São Paulo, v. 36, p. 129, 1922.
- ARIAS, J. R. *et al.* Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 34, n. 6, p. 1098-1108, 1985.
- AZEVEDO, P. C. B. *et al.* The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 2, p. 271-277, 2011.

- AZPURUA, J. *et al.* *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. e627, 2010. Disponível em <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000627>> Acesso em: 20 jan. 2017.
- BADARÓ, R. D. M.; DUARTE, C. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Org.). **Tratado de infectologia**. 5. ed. Atheneu, 2015. p. 1859-1888
- BALBINO, V. Q. *et al.* Sand flies (Diptera: Psychodidae) species in Pernambuco State, northeastern Brazil, incriminated as vectors of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. **Zootaxa**, Auckland, v. 1078, n. 1, p. 25-32, 2005.
- BARCELLOS, C. *et al.* Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 285-304, 2009.
- BARI, A. U. Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan. **Dermatology Online Journal**, Davis, v. 18, n. 2, p. 4, 2012.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p. 328-337, 2004.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.
- BAUM, M. *et al.* Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 143, p. 8-12, 2015.
- BESTEIRO, S. *et al.* Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1063-75, 2007.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, p. 575-578, 1998.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 93, n. 5, p. 488-494, 1999.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2^a ed. atual. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2010. 182 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2007. 182p.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia: Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 257-269.

BRAZIL, R. P.; FUZZARI, A. A.; ANDRADE FILHO, J. D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, Sunnyvale, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2015.

BRITO, M. E. F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, p. 1-4, 2012.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H. *et al.* Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. **Bulletin of Entomological Research**, Wallingford, v. 90, n. 1, p. 41-48, 2000. Disponível em <<https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/domesticity-of-lutzomyia-whitmani-diptera-psychodidae-populations-field-experiments-indicate-behavioural-differences/C6E25BA8423FFC1CEDA9E9AB6C1F3E7A>> Acesso em: 1 abr. 2018.

BRITO, V. N. *et al.* Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p. 899-904, 2014.

CAMPBELL-LENDRUM, D. *et al.* Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 370, n. 1665, p. 20130552, 2015.

CAMPINO, L. *et al.* Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, p. 475-478, 2005.

CAMPO de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti. 2017. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/CIMNC/@-7.8314562,-35.1036116,3a,121.4y,90t/data=!3m8!1e2!3m6!1sAF1QipN6hhfcD5yzIc5py0Av_mD_q7wRK79hasOHMM2L!2e10!3e12!6shttps:%2F%2F5.googleusercontent.com%2Fp%2FAF1QipN6hhfcD5yzIc5py0Av_mD_q7wRK79hasOHMM2L%3Dw203-h124-k-no!7i490!8i300!4m5!3m4!1s0x7ab73356b65a367:0x1d735f7446a91d22!8m2!3d-7.8314562!4d-35.1036116> Acesso em: 15 maio 2017.

- CANTACESSI, C. *et al.* The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 100-108, 2015.
- CAVALCANTI, D. P. *et al.* The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 130, n. 6, p. 1177-1185, 2008.
- COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 16, p. 12-18, 1999.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 31, p. 65-69, 2017a.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 733-736, 2010.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 1-14, 2017b.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.
- DEDET, J. P.; VIGNES, R.; RANGEL, E. F. Morfologia e taxonomia: grupo CIPA. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap 5, p. 177-184.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, 1999.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.
- DIAS, E. S. *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.
- DO VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

- ELNAIEM, D. E. A. *et al.* Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 10-17, 2003.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. 4. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1973. 658p.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; CRISTALDO, G. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 2, p. 235-261, 2003
- GITHEKO, A. K. *et al.* Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 78, n. 9, p. 1136-1147, 2000.
- GONTIJO B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.
- KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 14, p. 1765-1773, 2000.
- KILLICK-KENDRICK, R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. **Biology of the Kinetoplastida**. 1 ed. San Francisco: Academic Press, 1979. v. 2, 395 p.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.
- LACERDA, M. M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 489-495, 1994.
- LAINSON, J. J. *et al.* Leishmaniasis in Brazil: IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex: importance of sandflies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *L. braziliensis braziliensis* in north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 184-196, 1973.
- LAINSON, R.; SHAW J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Microbiology and Microbial Infectious Diseases**. 9. ed. San Francisco: Academic Press, 1998. p. 241-266.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J. The leishmaniasis in biology and medicine. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Volume I: biology and epidemiology. 1. ed. San Francisco: Academic Press, 1987. p.102-120.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 44-48, 1972.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.
- LAURENT, T. *et al.* Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 206-212, 2007.
- LEGRIFFON, C. M. O. *et al.* Frequência de flebotômíneos em ambiente rural com boas condições de limpeza e organização, no Estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, p. 77-82, 2012.
- LEITE, A. C. R.; WILLIAMS, P. Description of the fourth instar larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microscopy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 5, p. 571-578, 1996.
- LESSA, M. M. *et al.* Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.
- LYRA, M. R. *et al.* First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 451-454, 2015.
- MADEIRA, M. F. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 5, p. 551-555, 2003.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 526 p.
- MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary entomology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.
- MARTINS, A. V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. **American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)**. 1. ed. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1978. 206 p.
- MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**. Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.

MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1047-1050, 2007.

MIRANDA, D. E. O. *et al.* Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 146, p. 89-94, 2015.

MIRANDA, J. C.; DIAS, E. S. Vetores das leishmanioses nas Américas In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. **Leishmania e a leishmaniose tegumentar nas Américas**, 3 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2011. p. 56-64.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.

NERY-GUIMARÃES, F. Estudo de um foco de leishmaniose muco-cutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 1-11, 1955.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 546 p.

NUNES, V. L. B. *et al.* Study of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the urban area of Bonito municipality, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 446-451, 2008.

OLIVEIRA, A. G. *et al.* Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: *Phlebotominae*) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 105, n. 1, p. 55-61, 2008.

OLIVEIRA, G. M. G. *et al.*, Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 3, p. 83-94, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Health Observatory data. **Leishmaniasis**. Geneva: 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

REPORT LEISHMANIASIS. Washigton: OPAS, n 2, June 2014. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/Report-Leishmaniasis-PAHO-June2014.pdf>> Acesso em 1 abr. 2018.

PATZ, J. A. *et al.* Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1395-1405, 2000.

PESSOA, F. A. C.; MEDEIROS, J. F.; BARRETT, T. V. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species

on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 593-599, 2007.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. Infecção natural do *Phlebotomus migonei* por formas em leptomonas, provavelmente de *Leishmania braziliensis*. **Acta Médica**, Porto Alegre, v. 5, p. 106-111, 1940.

PETERS, W.; KILLICK-KENDRIK, R. **The leishmaniasis in Biology and Medicine**, 1 ed. San Francisco: Academic Press, 1987. 120 p.

PIGOTT, D. M. *et al.* Global distribution maps of the leishmaniasis. **Elife**, Cambridge, v. 3, p. 1-21, 2014. Disponível em <<https://elifesciences.org/articles/02851>> Acesso em 4 fev 2018.

QUEIROZ, M. F. M. *et al.* Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 3, p. 313-317, 2012.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 1. ed., Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 291-309.

READY, P. D. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 16, n. 5, p. 413-423, 1979.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 424 p.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective state of *Leishmania* promastigotes. **Science**, New York, v. 223, p. 1417-1420, 1984.

SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 453-483, 2001.

SANCHEZ CLEMENTE, N.; UGARTE-GIL, C. A.; SOLÓRZANO, N. *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, p. 18-19, 2012.

SAPORITO, L. *et al.* Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 17, n. 8, p. 572-576, 2013.

SARAIVA, E. M. B. *et al.* Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, London, v. 111, n. 3, p. 275-287, 1995.

SARAVIA, N. G. *et al.* Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 86-94, 1998.

SECUNDINO, N. F. C., FREITAS, V. C., PIMENTA, P. F. P. A biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. In: BARRAL, A., COSTA, J.M.L. **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**, 3. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. Cap 11, p. 90-101.

SHERLOCK, I. A. Importância médico-veterinária. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 1 ed., Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003, cap 3. p. 15-22.

SHIMABUKURO, P. H. F.; DE ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, Sofia, v. 660, p. 67, 2017.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 145-149, 2002.

SILVA, A. P. O. *et al.* Phlebotomines in an area endemic for American cutaneous leishmaniasis in northeastern coast of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 280-284, 2017.

SILVA, D. F.; VASCONCELOS, S. M. Flebotomíneo em fragmentos de Mata Atlântica na região Metropolitana do Recife, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 3, p. 264-266, 2005.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

SOUZA, C. S. F. *et al.* **As leishmanioses**. Rio de Janeiro: Departamento de protozoologia, Fundação Oswaldo Cruz, 1997.

SOUZA, A. *et al.* *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 112-113, 1996.

TICONA, E. *et al.* The pathophysiology of the acute phase of human bartonellosis resembles AIDS. **Medical Hypotheses**, Penrith, v. 74, n. 1, p. 45-49, 2010.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VOLF P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, Hoboken, v. 36, n. s1, p. 1-9, 2011.

WALTERS, L. *et al.* Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, n. 2, p. 294-314, 1987.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, Gainesville, v. 54, p. 180-881, 1994.