

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

**ESTUDO DE PHLEBOTOMINAE (DIPTERA: PSYCHODIDAE)
DO MUNICÍPIO DE LÁBREA, ESTADO DO AMAZONAS**

TÚLLIO ROMÃO RIBEIRO DA SILVA

MANAUS

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

TÚLLIO ROMÃO RIBEIRO DA SILVA

**ESTUDO DE PHLEBOTOMINAE (DIPTERA: PSYCHODIDAE)
DO MUNICÍPIO DE LÁBREA, ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e endemias na Amazônia, da universidade federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em saúde, sociedade e endemias na Amazônia. Área de concentração determinantes bio-sociais do processo saúde e doença na Amazônia.

Orientadora: Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

MANAUS

2013

TÚLLIO ROMÃO RIBEIRO DA SILVA

**ESTUDO DE PHLEBOTOMINAE (DIPTERA: PSYCHODIDAE)
DO MUNICÍPIO DE LÁBREA, ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e endemias na Amazônia, da universidade federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em saúde, sociedade e endemias na Amazônia. Área de concentração determinantes bio-sociais do processo saúde e doença na Amazônia.

Aprovada em 29 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

IRR/FIOCRUZ

Dr. José Dilermando Andrade Filho

IRR/FIOCRUZ

Dr^a Veracilda Ribeiro Alves

INPA

Dedico aos Meus Queridos

Mãe Rosangela de Fátima Ribeiro Costa

Pai Luzimarque Romão C. da Silva

Irmão Thiago Romão Ribeiro da Silva

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família pelo conforto e educação durante toda essa minha jornada, sem eles eu não chegaria tão longe como cheguei e ainda quero chegar.

A minha orientadora Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro por acreditar em minha competência e me conduzir nesse caminho, me dando esta oportunidade desde a iniciação científica, me ensinando e incentivando. Um crescimento contínuo e uma realização pessoal. Muito obrigado.

Agradeço a minha colega de trabalho Maíra Posteraro Freire pela companhia e colaboração durante toda a coleta de flebotomíneos, um momento tão importante para a realização deste trabalho. Obrigado.

A Dr^a Célia Maria Ferreira Gontijo e a Dr^a Patrícia Flávia Quaresma pela colaboração que foi imprescindível para a realização deste trabalho. Além disso, pelo carinho como fui recebido no Laboratório de Leishmanioses – LALEI, do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ. Obrigado.

Aos meus amigos Jerônimo Marteleto Nunes Rugani, Agnes Sampaio, Kelly Medrado Scofield, Lara Saraiva, Raquel Carvalho Gontijo, Mauro Diego Gobira Guimarães de Assis e Jéssica Adalia Costa Barros pela colaboração constante em nossa rotina de laboratório e pela companhia durante minha estadia em Belo Horizonte.

Agradeço ao Instituto Leônidas e Maria Deane- ILMD/FIOCRUZ e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, Universidade Federal do Amazonas/ Instituto Leônidas e Maria Deane/ Universidade

Federal do Pará, pela oportunidade de desenvolver este projeto e por todo o aprendizado no decorrer do curso.

Aos meu colegas de turma da pós-graduação, que foram tão presentes durante o nosso curso. Conseguimos terminar! Saudade de todos.

As secretarias do nosso programa de pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, Universidade Federal do Amazonas/Instituto Leônidas e Maria Deane/ Universidade Federal do Pará que nos ajudaram esclarecendo quaisquer dúvida que tivéssemos e nos deixando informados quanto nossas obrigações como alunos do programa, em especial a minha amiga Rosinete Alves. Obrigado.

Principalmente aos moradores da Aldeia Castanheira, por permitirem a realização das coletas em suas terras e principalmente a Sr^a Cleonildes Fernandes do Nascimento por nos receberem com tanto carinho e conforto em sua casa. Muito obrigado por tudo, deixaram saudades.

Gostaria de agradecer ao Daniel Rocha Cangussu Alves, Manoel Edson Medeiros, Liara Bertasso da Frente de Proteção Etnoambiental Purus, CGIIRC – FUNAI e ao Sr. Armando Soares Filho FUNAI – Coordenação Regional Lábrea, pela solidariedade e apoio nas atividades de campo desenvolvidas no município de Lábrea.

Também gostaria de agradecer aos meus grandes amigos Felipe Dutra Rêgo e Gabriel Barbosa Tonelli, pela colaboração, Vocês foram indispensáveis na execução da parte laboratorial deste trabalho, sem vocês não teria conseguido fazer o que fiz durante a minha curta estadia no Centro de Pesquisas René Rachou. Obrigado pela companhia em nossa rotina de trabalho e nos momentos de confraternização fora e dentro a instituição. Grandes amigos que encontrei graças a realização deste trabalho. Muito obrigado! Espero encontra-los novamente em breve.

“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento perdemos também a FELICIDADE”.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Os insetos da subfamília Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) são de interesse médico por serem vetores de protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos no momento da alimentação do inseto. Cerca de 500 espécies são conhecidas para as Américas e 133 registradas no estado do Amazonas. Causada por diferentes espécies de *Leishmania*, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) acomete o homem e outros animais, afetando pele e mucosa. Este trabalho está inserido no projeto “Condições de vida e saúde de populações indígenas na Amazônia”, PRONEX, que possui abordagem interdisciplinar para estudar aspectos eco-epidemiológicos e antropológicos da LTA no Médio Purús, financiado pela FAPEAM/CNPq, e em andamento no município de Lábrea, estado do Amazonas onde há registros de casos e suspeita de subnotificações. Por isso, achou-se oportuno o estudo de flebotomíneos do município como contribuição para o conhecimento da epidemiologia da LTA. O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos entomológicos relacionados a epidemiologia da LTA em uma área indígena do município de Lábrea. A coleta de flebotomíneos foi realizada em fevereiro de 2012, na Aldeia Castanheira, Terra Indígena Caititú, município de Lábrea, utilizando armadilhas com atrativo luminoso. Após a identificação dos insetos, foi realizada a detecção e identificação de leishmânias presentes nos flebotomíneos coletados utilizando uma abordagem molecular. Um total de 1.267 flebotomíneos foi coletado, 819 (64,6%) fêmeas e 448 (35,4%) machos, distribuídos em 10 gêneros e 32 espécies. Os gêneros mais abundantes encontrados foram *Psychodopygus*, *Nyssomyia* e *Trichophoromyia*, já a espécie *Trichophoromyia ubiquitalis* foi a mais abundante com 235 (18,5%) espécimes coletados, seguida de *Psychodopygus davisii* com 228 (18%) e *Nyssomyia antunesi* com 135 (10,7%) indivíduos. Foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* em seis espécies: *Sciopemyia servulolimai*, *Trichophoromyia ubiquitalis*, *Evandromyia apurinan*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia yuilli yuilli*, *Psychodopygus davisii*, sendo a taxa de infecção mínima estimada foi de 0,84%. As espécies de leishmânias detectadas foram: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e uma amostra identificada somente ao nível de subgênero *Leishmania (Viannia)* sp. A infecção por *Leishmania* detectada em espécies vetoras encontradas neste trabalho, é um indício da participação das mesmas no ciclo de transmissão de LTA no município. Futuras investigações devem ser realizadas para ajudar a elucidar a epidemiologia da LTA não só no município de Lábrea mas para o estado do Amazonas.

Palavras chave: Amazonas, Lábrea, *Leishmania*, leishmaniose tegumentar, Phlebotominae

ABSTRACT

Insects from the subfamily Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) are of medical interest because they are vectors of protozoa of the genus *Leishmania* transmitted when the insect feeds. Approximately 500 species are known in the Americas and 133 registered in the state of Amazonas. Caused by different species of *Leishmania*, cutaneous leishmaniasis (ACL) affects humans and other animals, affecting skin and mucosa. This work is part of the project " *Condições de vida e saúde de populações indígenas na Amazônia*", PRONEX, which has an interdisciplinary approach to study eco-epidemiological and anthropological aspects of leishmaniasis in the Middle Purus, funded FAPEAM / CNPq, and is in progress in the municipality of Lábrea, where there are records of cases and suspected underreporting. Therefore, it was thought appropriate to the study sand flies of the municipality as a contribution to the knowledge of the epidemiology of ACL. The aim of this study was to investigate the entomological aspects related to the epidemiology of ACL in an indigenous area of the municipality of Lábrea. The collection of sand flies was carried out in February 2012 in the Aldeia Castanheira, Indian Reserve Caititú, municipality of Lábrea using light traps. After identification of insects, we performed detection and identification of *Leishmania* present in the collected sand flies using a molecular approach. A total of 1,267 sandflies was collected, 819 (64.6%) females and 448 (35.4%) males, distributed in 10 genera and 32 species. The most abundant genera were *Psychodopygus*, *Nyssomyia* and *Trichophoromyia*, the species *Trichophoromyia ubiquitalis* was the most abundant with 235 (18.5%) specimens, followed by *Psychodopygus davisii* with 228 (18%) and *Nyssomyia antunesi* with 135 (10.7%) individuals. The presence of *Leishmania* was detected in six species: *Sciopemyia servulolimai*, *Trichophoromyia ubiquitalis*, *Evandromyia apurinan*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia yuilli yuilli*, *Psychodopygus davisii*, the estimated minimum infection rate was 0.84%. The *Leishmania* species were: *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *Leishmania* (V.) *braziliensis* and a sample identified only to the level of subgenus *Leishmania* (*Viannia*) sp. The *Leishmania* infection detected in vector species / suspected vectors found in this work, suggests the involvement of these species in the transmission cycle of leishmaniasis in the municipality. Future investigations should be made to help elucidate the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Lábrea as well as the state of Amazonas.

Keywords: Amazonas, cutaneous leishmaniasis, Lábrea, *Leishmania*, Phlebotominae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Ciclo de vida de flebotomíneos. FONTE: Adaptado de: WHO, 2010.....	21
FIGURA 2 – Exemplos de insetos da subfamília Phlebotominae. A – fêmea; B – macho.....	23
FIGURA 3 – Municípios do estado do Amazonas, com registros da fauna de flebotomíneos. 1 - Lábrea, 2 – Tefé, 3 – Coari, 4 – Manacapuru, 5 – Manaus, 6 – Borba, 7 – Itacoatiara, 8 – Maués, 9 – Nhamundá.....	25
FIGURA 4 – Formas de <i>Leishmania</i> classificadas quanto a morfologia; Amastigota e Promastigota. N – núcleo; K – cinetoplasto; F- flagelo. FONTE: Adaptado de: BATES, 2007.....	28
FIGURA 5 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> . Formas promastigotas no trato digestivo do vetor e formas amastigotas no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado. FONTE: Adaptado de BRASIL, 2006.....	29
FIGURA 6 – Município de Lábrea, sul do estado do Amazonas, Brasil.....	34
FIGURA 7 – Área urbana do município de Lábrea, localizado às margens do rio Purús, estado do Amazonas, Brasil.....	34
FIGURA 8 – Terras Indígenas localizadas nas proximidades do município de Lábrea, estado do Amazonas, Brasil.....	35
FIGURA 9 – Localização da Aldeia Castanheira (Terra Indígena Caititú), em relação à cidade de Lábrea, estado do Amazonas.....	36
FIGURA 10: A. Casa tradicional na Aldeia Castanheira, localizada na TI Caititú). B. Moradora da Aldeia e animais domésticos.....	36
FIGURA 11 – Armadilhas luminosas instaladas na Aldeia Castanheira, TI Caititú, para a coleta de flebotomíneos.....	39
FIGURA 12 – Coleta de flebotomíneos utilizando aspirador manual em base de árvore. Aldeia Castanheira, Terra indígena Caititú, Lábrea.....	39
FIGURA 13 – Aparelhos termocicladores utilizados nas reações de amplificação de DNA. A. <i>Mastercycler graditen – eppendor®</i> ; B. Veriti – Applied Biosystems®.....	48
FIGURA 14 – Fluxograma esquematizando toda a metodologia utilizada para a realização deste trabalho, desde a coleta de flebotomíneos até a análise dos dados.....	54
FIGURA 15 – Percentagem das espécies mais abundantes e total da soma das espécies menos abundantes coletadas na Aldeia Castanheira, TI Caititú,	

Lábrea, estado do Amazonas, no período de 17 a 24 de fevereiro de 2012.....	58
FIGURA 16 – Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo <i>ITS1</i> . Três <i>pools</i> de fêmeas apresentaram banda: PL35 - <i>Th. ubiquitousis</i> , PL46 - <i>Ny. antunesi</i> , PL48 - <i>Ps. ayrozai</i> . PM – Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, La (+) - controle positivo de <i>Leishmania amazonensis</i> , Lb (+) - controle positivo de <i>L. braziliensis</i>	60
FIGURA 17 – Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo <i>ITS1</i> . Cinco <i>pools</i> de fêmeas apresentaram banda: PL9 - <i>Ny. antunesi</i> , PL11 - <i>Sc. servulolimai</i> , PL15 - <i>Ny. antunesi</i> , PL33 - <i>Ps. ayrozai</i> , PL36 - <i>Ny. antunesi</i> , PM - Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, La (+) - controle positivo de <i>Leishmania amazonensis</i> , Lb (+) - controle positivo de <i>L. braziliensis</i>	60
FIGURA 18 – Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo <i>ITS1</i> . Cinco <i>pools</i> de fêmeas apresentaram banda: PL51 - <i>Th. ubiquitousis</i> , PL55 - <i>Ny. umbratilis</i> , PL56 - <i>Ny. yuilli yuilli</i> , PL74 - <i>Ny. antunesi</i> , PL67 - <i>Ps. davisii</i> . PM - Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, Lb(+) - controle positivo de <i>L. braziliensis</i>	61
FIGURA 19 – Reamplificação de bandas purificadas. Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo <i>ITS1</i> . Sete <i>pools</i> de fêmeas apresentaram banda: PL11 - <i>Sc. servulolimai</i> , PL35 - <i>Th. ubiquitousis</i> , PL51 - <i>Th. ubiquitousis</i> , PL52 – <i>Ev. apurinan</i> , PL55 - <i>Ny. umbratilis</i> , PL56 - <i>Ny. yuilli yuilli</i> , PL67 – <i>Ps. davisii</i> , PM - Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, e controles positivos L.a - <i>L. amazonensis</i> L.b - <i>L. braziliensis</i> e L.b - <i>L. guyanensis</i>	64
FIGURA 20 – Reação de RFLP. Visualização em gel de agarose [4%] da digestão do produto amplificado do alvo <i>ITS1</i> . Sete <i>pools</i> de fêmeas: PL11 - <i>Sc. servulolimai</i> , PL35 - <i>Th. ubiquitousis</i> , PL51 - <i>Th. ubiquitousis</i> , PL52 – <i>Ev. apurinan</i> , PL55 - <i>Ny. umbratilis</i> , PL56 - <i>Ny. yuilli yuilli</i> , PL67 – <i>Ps. davisii</i> , PM - Marcador de tamanho so molecular, controles L.a - <i>L. amazonensis</i> L.b - <i>L. braziliensis</i> , L.l – <i>L. infantum</i> e L.b - <i>L. guyanensis</i>	65
FIGURA 21: A – PCR direcionada ao alvo <i>CITb</i> . B – Estágios de digestão do alimento sanguíneo em fêmeas adultas de flebotomíneos. FONTE: Adaptado de: ABBASI <i>et al.</i> , 2009; DOLMATOVA & DEMINA, 1971.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Espécies vetoras confirmadas ou suspeitas incriminadas na transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no Brasil.....	24
TABELA 2 – Dez municípios do estado do Amazonas com maior número de casos notificados e confirmados de LTA, durante o período de 2007 a 2012. FONTE: Adaptado de: SINAN/BRASIL, 2013.....	30
TABELA 3 – Relação de todos os pontos de coleta presentes na Aldeia Castanheira com suas respectivas coordenadas geográficas.....	38
TABELA 4 – Total de espécies de flebotomíneos coletados em TI Caititú, Lábrea, estado do Amazonas, por método de coleta no período de 17 a 24 de fevereiro de 2012.....	56
TABELA 5 – Percentagem de fêmeas e machos, por espécie, coletados na TI Caititú, Lábrea, estado do Amazonas, fevereiro de 2012.....	57
TABELA 6 – Total de <i>pools</i> positivos para detecção de <i>Leishmania</i> utilizando o alvo <i>ITS1</i> , por ponto de coleta e espécie.....	59
TABELA 7 – Total de <i>pools</i> negativos para detecção de <i>Leishmania</i> utilizando o alvo <i>ITS1</i> , por ponto de coleta e espécie.....	61
TABELA 8 – Total de amostras positivas por espécie de <i>Leishmania</i> identificada e espécie de flebotomíneo coletado na Aldeia Castanheira, Lábrea, estado do Amazonas, no período de 17 a 24 de fevereiro de 2012.....	66
TABELA 9 – Total de indivíduos fêmeas, por espécie coletadas na Aldeia Castanheira, TI Caititu, Lábrea, estado do Amazonas incluindo total de indivíduos identificados somente ao nível de gênero, que foram utilizados no estudo de fonte alimentar.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

CDC – *Centers for Disease Control*

CYTB – Cytochrome b

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTP – *Deoxynucleotide Triphosphates*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HP – Hoover Pugador

Hsp70 – *Heat shock proteins 70*

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane

ITS 1 – *Internal Transcribed Spacer 1*

ITS 2 – *Internal Transcribed Spacer 2*

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

Km² – Quilômetro quadrado

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

µL – Microlitro

mM – Milimolar

MS – Ministério da Saúde

ng – Nanogramas

nm – Nanômetros

Pb – Pares de bases

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PRONEX – Programa de Apoio a Núcleos de Excelência

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm – Rotações por minuto

PM – Marcador de tamanho molecular

pmol – Pico mols

SESAI – Secretaria Especial de Saúde Indígena

SEMSA – A Secretaria Municipal de Saúde

SIASI – Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SSUrRNA – *Small subunit ribosomal ribonucleic acid*

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

sp – Espécie

TI – Terra Indígena

U – Unidades

WHO – *World health organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
4.1 BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	20
4.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: ASPECTOS GERAIS.....	26
4.3 DETECÇÃO DE LEISHMANIA NO ESTADO DO AMAZONAS.....	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1 ÁREA DE ESTUDO.....	34
5.2 COLETA DE PHLEBOTOMINAE.....	38
5.3 MANUTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS.....	41
5.4 DISSECÇÃO, PREPARO DAS AMOSTRAS E IDENTIFICAÇÃO DOS PHLEBOTOMINAE.....	42
5.5 DETECÇÃO E INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS POR <i>LEISHMANIA</i> SPP.....	43
5.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS FÊMEAS CAPTURADAS.....	43
5.5.2 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO <i>CACOFONIA</i> POR PCR.....	45
5.5.3 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO <i>INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)</i> POR PCR.....	45
5.5.4 <i>NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION</i> DO ALVO <i>SSU</i> DE <i>LEISHMANIA</i>	46
5.5.5 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO <i>INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 1 (ITS1)</i> POR PCR.....	49
5.5.6 PURIFICAÇÃO DE BANDAS POSITIVAS PARA O SEQUENCIAMENTO...50	
5.5.7 RFLP (<i>RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i>) DO ALVO <i>ITS1</i> DE <i>LEISHMANIA</i>	51
5.5.8 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO <i>HSP70 (HEAT SHOCK PROTEIN)</i> DE <i>LEISHMANIA</i> POR PCR.....	51

5.5.9 TAXA DE INFECÇÃO NATURAL.....	52
5.6 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO <i>CITOCROMO B (CYTB)</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DE REPASTO SANGUÍNEO NAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADAS	52
5.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DO ALVO ITS1 DE <i>LEISHMANIA</i>	53
5.8 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA.....	54
6. RESULTADOS.....	55
6.1 COLETA DE FLEBOTOMÍNEOS E ESTUDO DE FAUNA.....	55
6.2 ESTUDO DE INFECÇÃO NATURAL EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NA ALDEIA CASTANHEIRA, MUNICÍPIO DE LÁBREA.....	59
6.2.1 DETECÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i>	59
6.3 IDENTIFICAÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i>	65
6.3.1 ABORDAGEM PCR-RFLP.....	65
6.3.2 ABORDAGEM PCR-SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	66
6.4 ESTUDO DE FONTE ALIMENTAR EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NA ALDEIA CASTANHEIRA, LÁBREA, ESTADO DO AMAZONAS.....	67
6.4.1 <i>CITOCROMO B (CYTb)</i>	67
7. DISCUSSÃO.....	68
7.1 FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADA.....	68
7.2 INFECÇÃO NATURAL EM FLEBOTOMÍNEOS DE LÁBREA.....	73
7.3 ESTUDO DE FONTE ALIMENTAR EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NO MUNICÍPIO DE LÁBREA ESTADO DO AMAZONAS.....	81
8. CONCLUSÃO.....	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

Pertencente à ordem Diptera e família Psychodidae, os insetos da subfamília Phlebotominae apresentam um comprimento de aproximadamente 3 mm, com um corpo delgado e pernas alongadas. Atualmente, cerca de 500 espécies são conhecidas para as Américas e 133 registradas no estado do Amazonas (GALATI, 2003; SHIMABUKURO & GALATI, 2010; FIGUEIRA *et al.*, 2013). Apresentam dimorfismo sexual expresso em seu aparelho reprodutor e na probóscide, mais alongada nas fêmeas devido ao tipo de alimentação sanguínea exercida somente por elas, o que as transformam em potenciais transmissores de patógenos como protozoários do gênero *Leishmania*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Considerada uma doença de caráter zoonótico, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) acomete o homem e outros animais, sejam estes domésticos ou silvestres. É causada por diferentes espécies de *Leishmania* e pode se manifestar em diferentes formas clínicas acometendo pele e mucosa. No Brasil a LTA está presente em todas as unidades da federação e com maior incidência na região norte (GENARO & REIS *et al.*, 2005; BRASIL, 2007).

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem a ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae, estes possuem duas formas básicas classificadas quanto a morfologia; a forma amastigota, parasito intracelular que é arredondada e aflagelada, encontrada nas células fagocitárias de um hospedeiro vertebrado, e a forma promastigota, flagelada e alongada, presente no trato digestivo do inseto vetor. São parasitos digenéticos, apresentando seu ciclo de vida dividido entre

hospedeiros vertebrados e invertebrados. Atualmente sete espécies de *Leishmania* foram registradas no Brasil, sendo estas: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, todas já registradas na região Norte (PIMENTA, 2003; BRASIL, 2007).

Mesmo sendo indispensáveis para ajudar no esclarecimento da epidemiologia da LTA, atualmente poucos são os estudos sobre infecção natural em flebotomíneos no estado do Amazonas. Os estudos realizados no estado e que apresentam algum registro de *Leishmania*, em sua grande maioria são provenientes de amostras clínicas e não de flebotomíneos, além de estarem concentrados ao norte do Estado, havendo uma escassez de trabalhos realizados ao sul. O presente trabalho está inserido no projeto “*Condições de vida e saúde de populações indígenas na Amazônia*”, um projeto com uma abordagem interdisciplinar para estudar aspectos eco epidemiológicos e antropológicos da LTA no Médio Purús. Este projeto está sendo desenvolvido no município de Lábrea, onde há um elevado número de casos de LTA e especula-se um grande problema de subnotificação. Neste município a LTA está principalmente associada a atividades de extrativismo de produtos da floresta por agentes indígenas e não indígenas.

No presente estudo, a fauna flebotomínica coletada na Aldeia Castanheira, Terra Indígena Caititú, município de Lábrea, estado do Amazonas é descrita, bem como os achados de infecção natural baseados na presença de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos coletados. Também é estimada a taxa de infecção natural destes insetos, especulando possíveis espécies vetoras envolvidas no ciclo de transmissão de LTA e espécies de *Leishmania* circulantes em área.

2. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho está inserido no projeto “*Condições de vida e saúde de populações indígenas na Amazônia*”, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX/FAPEAM/CNPq, Edital 003/2009, coordenado pela Dra. Maria Luiza Pereira Garnelo, pesquisadora do Instituto Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ, financiado pela FAPEAM/CNPq, que é um projeto com abordagem interdisciplinar para estudar aspectos eco epidemiológicos e antropológicos da LTA no Médio Purús. Este projeto está sendo desenvolvido no município de Lábrea, estado do Amazonas, onde a LTA está principalmente associada a atividades de extração de castanha do Brasil, látex, óleo de copaíba, e outros produtos da floresta, afetando populações indígenas e não indígenas. É evidente a escassez de dados sobre LTA em populações indígenas, havendo pouca informação sobre agentes etiológicos, reservatórios não humanos e espécies de flebotomíneos vetores envolvidos na manutenção da transmissão zoonótica.

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 192 casos de LTA foram notificados nos anos de 2007 a 2012, no município de Lábrea. Somente no ano de 2010, de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde de Lábrea (SEMSA/Lábrea) foram realizados 64 exames parasitológicos diretos para o diagnóstico de LTA, dentre estes, 51 foram positivos, porém somente 29 foram notificados no SINAN. Há também uma escassez de dados referentes a investigações de fauna e infecção natural ao sul do estado do Amazonas, uma vez que a maioria dos trabalhos realizados estão concentrados na região mais ao norte do estado, principalmente na cidade de Manaus e em municípios próximos. Por isso, achou-se oportuno os estudo de flebotomíneos do município de Lábrea como

contribuição para o desenvolvimento do conhecimento da epidemiologia da LTA em área onde há muitos registros de casos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar os aspectos entomológicos relacionados a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana, em uma área indígena do município de Lábrea, estado do Amazonas, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever ao nível de espécie os flebotomíneos coletados em área;
- Detectar DNA de *Leishmania* presentes nas fêmeas coletadas;
- Identificar espécies de *Leishmania* detectadas;
- Estimar a taxa de infecção natural destes insetos;
- Identificar a fonte alimentar de fêmeas ingurgitadas.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são insetos que pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo conhecidos popularmente no Brasil, por tatuquira, mosquito palha, birigui, dentre outros, dependendo da região (BRASIL, 2007). Até a presente data, são conhecidas cerca de 900 espécies no

mundo, 500 espécies descritas para as Américas e um total de 133 espécies registradas somente no estado do Amazonas (GALATI, 2003, SHIMABUKURO & GALATI, 2010, FIGUEIRA *et al.* 2013). Até a presente data, somente para o município de Lábrea, localizado ao sul do estado do Amazonas, são registradas 26 espécies de flebotomíneos distribuídos em 12 gêneros, sendo as espécies mais abundantes encontradas *Nyssomyia antunesi*, *Evandromyia walkeri* e *Micropygomyia rorotaensis* (FIGUEIRA *et al.* 2013).

Os insetos da subfamília Phlebotominae apresentam um desenvolvimento holometábolo, dividido em fases de ovo, larva, pupa e adulto (FIGURA 1). Os ovos de flebotomíneos apresentam uma forma elipsóide ou ovóide, e seu comprimento e largura pode variar de acordo com a espécie (YOUNG & DUNCAN, 1994). Possuem uma coloração clara assim que postos, mas logo após algumas horas escurecem até uma coloração de castanho escuro. Estima-se que uma fêmea adulta realize, em média, uma postura de 40 ovos, que ficam aderidos no substrato. Pouco se sabe sobre os criadouros naturais de flebotomíneos, mas, em geral, a postura é feita em locais onde o substrato é rico em matéria orgânica, necessário para o desenvolvimento das formas imaturas. O desenvolvimento é dividido em quatro estádios larvais (L₁, L₂, L₃ e L₄) e pupa que fica aderida ao substrato até o momento de eclosão do adulto (BRAZIL & BRASIL, 2003).

Estudos sobre imaturos tem encontrado larvas em tocas de animais, sob folhas mortas no chão da floresta, nas bases de árvores, sob troncos caídos no solo, e em outros micro habitats húmidos e ricos em matéria orgânica (HANSON, 1961; YOUNG & DUNCAN, 1994; ALENCAR, 2007; ALENCAR *et al.*, 2011).

A duração entre os estágios de ovos, larvas, pupas e adultos é influenciada

pela temperatura ambiente podendo ser mais acelerada ou mais prolongada sendo difícil afirmar uma duração exata para cada estágio. Porém sob condições de laboratório os ovos geralmente eclodem entre 7 a 10 dias, o desenvolvimento larval possui uma duração de pelo menos 3 semanas, até que em aproximadamente 10 dias o flebotomíneo adulto emerge da pupa (YOUNG & DUNCAN, 1994; WHO, 2010).

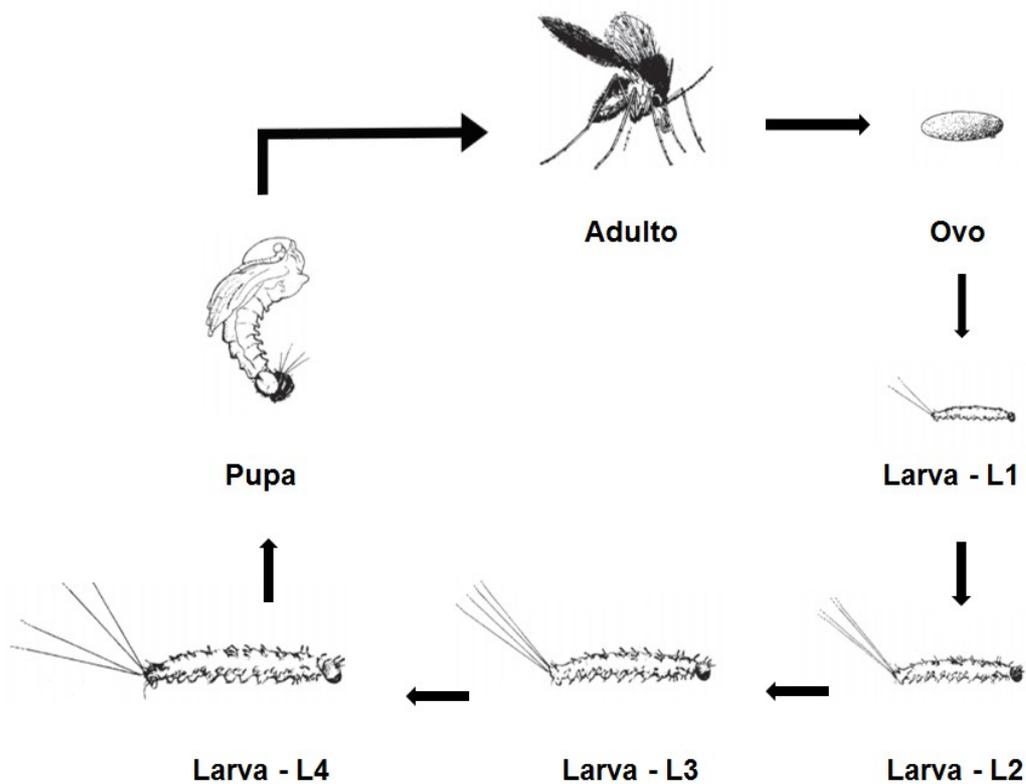


FIGURA 1: Ciclo de vida de flebotomíneos
 FONTE: Adaptado de: WHO, 2010.

Os indivíduos adultos são pequenos, com um comprimento que pode variar de 2 a 3 mm, apresentando um corpo delgado e pernas longas. Quando em repouso, estes insetos são encontrados em abrigos onde não há variações climáticas acentuadas, geralmente em frestas nos troncos das árvores, em folhas

caídas no solo e em tocas de animais (ARIAS & FREITAS, 1982; CASTELLÓN *et al.*, 2000; CABANILLAS & CASTELLÓN, 1999; BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Os adultos ainda apresentam dimorfismo sexual expresso nos últimos segmentos abdominais que constituem as genitálias destes insetos, enquanto nos machos os apêndices são bem desenvolvidos, nas fêmeas são menores e discretos com um aspecto arredondado (FIGURA 2). O dimorfismo ainda é apresentado na probóscide (aparelho bucal do inseto) mais alongadas nas fêmeas, e no cibário, que é uma estrutura interna, ambos estão associados ao tipo de alimentação hematofágica realizado somente pelas fêmeas (BRAZIL & BRAZIL, 2003; SHERLOCK, 2003).

Indivíduos adultos, tanto machos quanto fêmeas, utilizam açúcares provenientes de origem vegetal como néctar de flores, frutas, seiva de plantas em geral como fonte de energia, porém somente as fêmeas apresentam um comportamento hematofágico, necessitando de uma alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado para a maturação dos ovos (YOUNG & DUNCAN, 1994). O comportamento hematofágico das fêmeas de flebotomíneos as tornam potenciais transmissores de patógenos como o protozoário *Leishmania*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo assim estão entre os Diptera de importância média (SHERLOCK, 2003; PIMENTA *et al.*, 2003).



FIGURA 2: Exemplos de insetos da subfamília Phlebotominae. A - fêmea; B - macho.

Existem alguns critérios essenciais para a incriminação de uma determinada espécie de flebotomíneo como vetora de *Leishmania*: i) A espécie em questão precisa apresentar um comportamento antropofílico; ii) Realizar seu repasto sanguíneo em outros hospedeiros vertebrados; iii) Estar infectada naturalmente com a mesma espécie de *Leishmania* na mesma área em que ocorre casos em humanos; iv) Tem de suportar ao ciclo de desenvolvimento de *Leishmania* durante a infecção; v) Finalmente, precisa ser capaz de transmitir o parasito através da picada (KILLICK-KENDRICK, 1990; WHO, 2010).

As principais espécies vetoras conhecidas no Brasil são *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Ny. umbratilis*, *Ny. intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (BRASIL, 2007). Contudo, ainda há estudos que revelam a participação de outras espécies de flebotomíneos envolvidas no ciclo de

transmissão de LTA no Brasil, sendo incriminadas com vetoras ou como vetoras suspeitas (TABELA 1).

TABELA 1: Espécies vetoras confirmadas ou suspeitas incriminadas na transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no Brasil.

Espécies vetoras	Espécies de <i>Leishmania</i>	Referências
<i>Bi. flaviscutellata</i>	<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	Lainson & Shaw (1968)
<i>Mi. migonei</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Araújo Filho (1979)
<i>Ny. whitmani</i>	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Pessôa & Coutinho (1941)
<i>Ny. umbratilis</i>	<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	Arias & Freitas (1978)
<i>Ny. intermedia</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Aragão (1922)
<i>Ny. anduzei</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Lainson <i>et al.</i> (1976)
<i>Ny. antunesi</i> *	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	Silveira <i>et al.</i> (2002)
<i>Ny. neivai</i> *	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Rangel & Lainson (2009)
<i>Ps. wellcomei</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Lainson <i>et al.</i> (1973)
<i>Ps. ayrozai</i> *	<i>L. (V.) naiffi</i>	Rangel & Lainson (2003)
<i>Ps. davisii</i> *	<i>L. (V.) naiffi</i>	Gil <i>et al.</i> (2003)
<i>Ps. paraensis</i> *	<i>L. (V.) naiffi</i>	Silveira <i>et al.</i> (1991)
<i>Th. ubiquitalis</i> *	<i>L. (V.) lainsoni</i>	Silveira <i>et al.</i> (1991)

* Espécies incriminadas como vetoras suspeitas.

Todas as 13 espécies de flebotomíneo citadas na TABELA 1 já foram registradas na região norte, e com exceção das espécies *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* e *Mi. migonei* todas já possuem registro no estado do Amazonas (AGUIAR & MEDEIROS, 2003; BRASIL, 2007). Investigações sobre flebotomíneos vem sendo realizadas por todo o Brasil, fornecendo informações que ajudam a conhecer a fauna e a biologia destes insetos que possuem importância médica e estão envolvidos na transmissão de LTA. No estado do Amazonas vários estudos já foram publicados (CASTELLÓN *et al.*, 2000; ALENCAR, 2007; BARBOSA *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2012; FIGUEIRA,

2013) fornecendo informações importantíssimas sobre a fauna e auxiliando no esclarecimento da ecologia da LTA no estado (FIGURA 3).

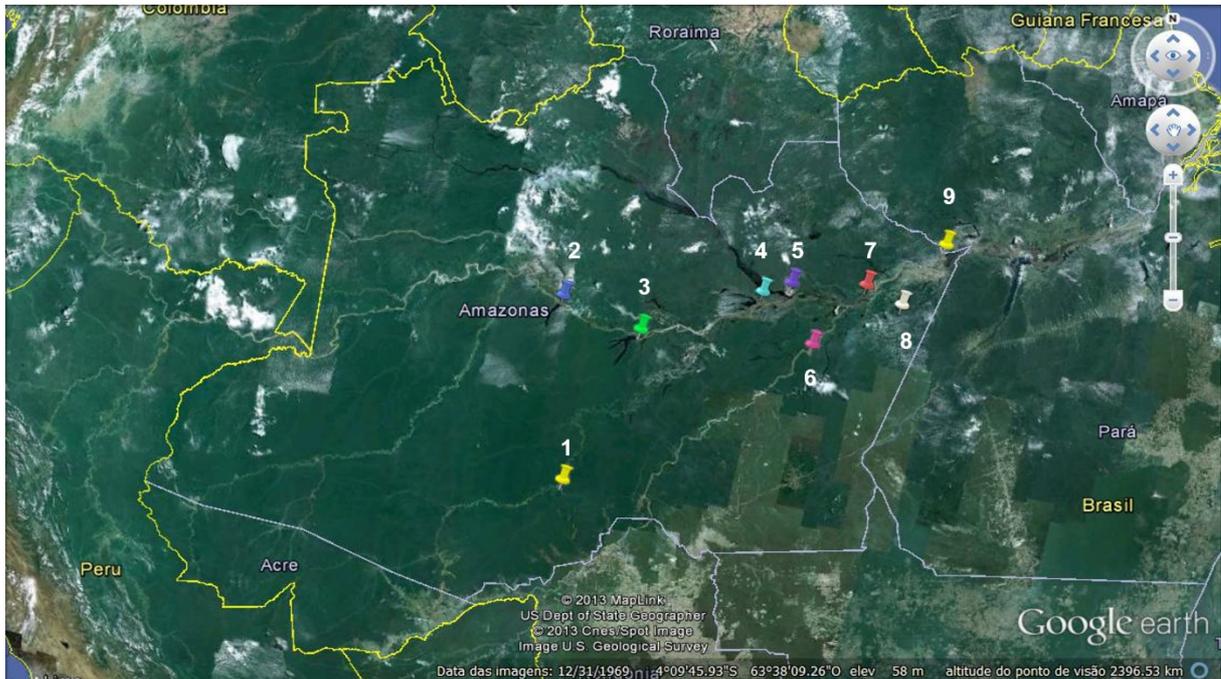


FIGURA 3: Municípios do estado do Amazonas, com registros da fauna de flebotomíneos. 1 - Lábrea, 2 – Tefé, 3 – Coari, 4 – Manacapuru, 5 – Manaus, 6 – Borba, 7 – Itacoatiara, 8 – Maués, 9 – Nhamundá.

4.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: ASPECTOS GERAIS

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença considerada infecciosa e não contagiosa, causada por leishmânias de diferentes espécies, as quais acometem pele e mucosas, sendo primariamente de caráter zoonótico, contudo pode afetar o homem, o qual é envolvido secundariamente (LAINSON & SHAW, 1972; LAINSON, 1988; BRASIL, 2007).

A LTA pode se manifestar sob duas formas classificadas quanto ao seu aspecto clínico, sendo estas, leishmaniose cutânea ou leishmaniose mucosa (ou

mucocutânea). A leishmaniose cutânea é em geral caracterizada por apresentar úlceras indolores com um formato arredondado ou ovalado podendo ser: i) cutânea localizada, apresentando lesão única ou múltiplas com tendência a cura espontânea e boa resposta ao tratamento; ii) cutânea disseminada, é uma forma caracterizada por múltiplas lesões papulares de aparência acneiforme causadas por disseminação do parasito por vias hemáticas ou linfáticas gerando lesões em regiões distantes da picada do inseto; iii) forma difusa, um tipo raro que ocorrem em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, caracterizada por formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas. A leishmaniose mucosa ou mucocutânea é caracterizada por lesões nas mucosas das vias aéreas superiores, sendo na maioria das vezes decorrentes de formas cutâneas curadas sem tratamento ou com o tratamento inadequado (GENARO & REIS, 2005; BRASIL, 2013).

O agente etiológico responsável pela LTA, é a *Leishmania*, que é um protozoário que pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. As espécies pertencentes a este gênero são consideradas parasitos intracelulares obrigatórios, unicelulares e digenéticos, tendo parte do seu ciclo de vida estabelecido em um hospedeiro vertebrado e em outro invertebrado (PIMENTA *et al.*, 2003). A transmissão do parasito entre os hospedeiros vertebrados está associada a picada de diferentes espécies de insetos da subfamília Phlebotominae (LAINSON *et al.*, 1994).

Para a LTA são considerados reservatórios aqueles animais que garantam a circulação do parasito na natureza, contudo este é um sistema bastante complexo uma vez que multifatorial (homem/animal doméstico, vetor, reservatório, ambiente),

imprevisível e dinâmico, além de poder ser influenciados por alterações no meio ambiente (BRASIL, 2007). Vários animais já foram encontrados infectados, abrangendo espécies silvestres, sinantrópicas e domésticas, como por exemplo preguiças, tamanduás, marsupiais, procionídeos, roedores, cães e gatos domésticos (BRASIL, 2007; WHO, 2010).

Atualmente um total de 11 espécies de *Leishmania* já foram registradas nas américas, destas, 7 espécies já foram registradas somente no Brasil, sendo estas: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shawi*. Todas estas espécies já foram registradas na região norte do país (BRASIL, 2007) e até a presente data há registros de 5 espécies somente no estado do Amazonas, sendo estas *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi* (ARIAS & FREITA, 1978; ARIAS & NAIFF, 1981; ARIAS *et al.*, 1987; GRIMALDI *et al.*, 1991; ROMERO *et al.*, 2002; FIGUEIRA *et al.*, 2008; BENÍCIO *et al.*, 2011; CHRUSCIAK-TALHARI *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011).

As espécies de *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida, no qual são expostas a diferentes ambientes intra e extracelular. Estes organismos possuem duas formas genéricas (FIGURA 4), classificadas quanto a sua morfologia durante o seu ciclo de vida: promastigotas, formas alongadas que apresentam flagelo livre aparente o que dá mobilidade à *Leishmania*, e amastigotas, formas arredondadas que não apresentam flagelo (BAÑULS *et al.*, 2007).

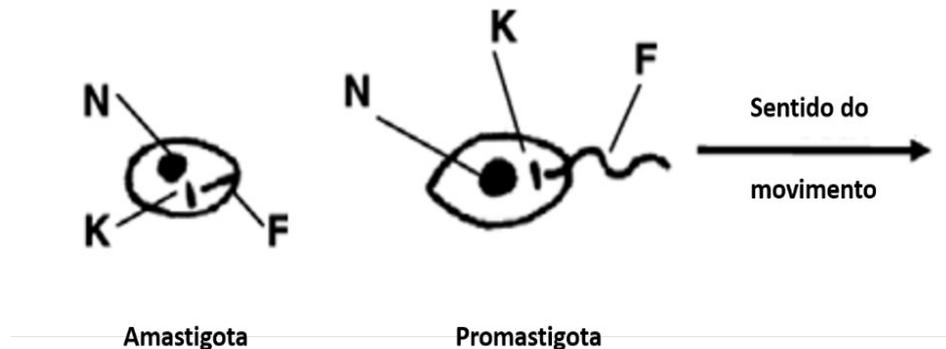


FIGURA 4: Formas de *Leishmania* classificados quanto a morfologia; Amastigota e Promastigota. N – núcleo; K – cinetoplasto; F- flagelo.
 FONTE: Adaptado de: BATES, 2007.

O ciclo de vida do parasito se inicia quando uma fêmea infectada realiza um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, inoculando, através de sua probóscide, formas infectantes denominadas promastigotas. Estas são então fagocitadas por macrófagos, dentro dos quais se diferenciam em formas amastigotas, que se reproduzem por fissão binária até finalmente romper a membrana da célula infectada para em seguida infectar outras células fagocíticas (PIMENTA, 2003; BAÑULS *et al.*, 2007).

Durante a busca por alimento sanguíneo, uma fêmea de flebotomíneo pode ocasionalmente ingerir formas amastigotas de *Leishmania* junto com o sangue infectado de um hospedeiro vertebrado, iniciando uma nova etapa no ciclo de vida do parasito. Já no inseto, as formas amastigotas são conduzidas ao intestino médio, onde permanecem durante aproximadamente 12 a 20 horas e se diferenciam em promastigotas, que durante um novo repasto sanguíneo podem ser transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo de transmissão (PIMENTA, 2003; MICHALICK, 2005) (FIGURA 5).

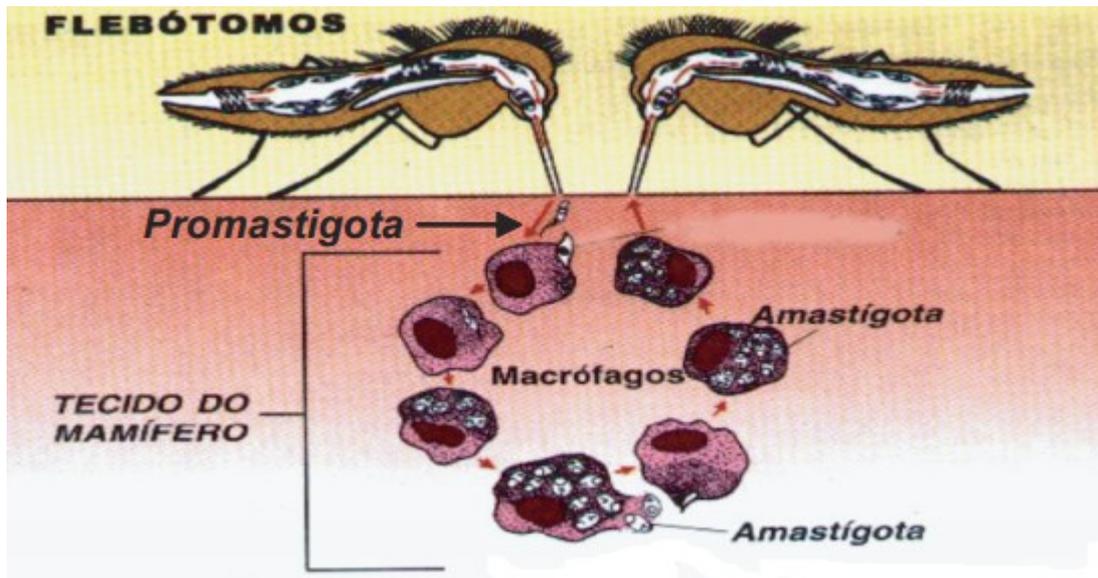


FIGURA 5: Ciclo de vida de *Leishmania*. Formas promastigotas no trato digestivo do vetor e formas amastigotas no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado.
Fonte: Adaptado de BRASIL, 2006.

A leishmaniose tegumentar americana já é registrada em todas as unidades federadas do Brasil desde o ano de 2003, e a região norte é a que mais apresenta casos, com aproximadamente 36,7% do total de casos registrados para o país durante o período de 1990 a 2011, além disso a região também apresenta os maiores coeficientes médios com cerca de 80 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2013).

O estado do Amazonas apresentou um total de 10.645 casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), durante o período de 2007 a 2012, por município. Todos os 59 municípios do estado do Amazonas apresentaram registros para LTA, dentre os quais a capital do estado apresentou o maior número de casos notificados, enquanto o município de Lábrea foi o décimo colocado em número de casos (TABELA 2), contudo a quantidade elevada de casos notificados na capital deve estar associada a presença da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), centro de

referência para atendimento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Porém, segundo dados de doenças de notificação compulsória fornecidas pela FMT-HVD somente no ano de 2012 foram notificados 876 casos de LTA, não corroborando com os 607 casos apresentados pelo SINAN durante o mesmo período, demonstrando assim uma incompatibilidade de dados e um possível problema de subnotificação.

TABELA 2: Dez municípios do estado do Amazonas com maior número de casos notificados confirmados de LTA, durante o período de 2007 a 2012.
 FONTE: Adaptado de: SINAN/BRASIL, 2013.

Municípios	2007	2008	2009	2010	2011	2012	TOTAL
Manaus	1160	758	640	381	1090	607	4636
Rio Preto da Eva	322	217	124	76	190	144	1073
Presidente Figueiredo	214	179	101	128	158	148	928
Coari	15	46	122	187	91	14	475
Itacoatiara	106	91	61	12	60	59	389
Tefé	12	18	42	39	157	33	301
Humaitá	5	78	52	54	49	42	280
Boca do Acre	40	45	33	37	52	19	226
Apuí	77	31	40	17	27	14	206
Lábrea	28	48	18	61	23	14	192

4.3 DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* NO ESTADO DO AMAZONAS

Estudos que apresentam registros de *Leishmania* no estado do Amazonas são escassos e estão concentrados na cidade de Manaus, e em suas proximidades. Em grande parte destes estudos a detecção de *Leishmania* é realizada em lesões de pacientes que receberam algum tipo de atendimento médico (ROMERO *et al.*, 2002; GUERRA *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FIGUEIRA *et al.*, 2008; ANRADE *et al.*, 2011; BENÍCIO *et al.*, 2011; CHRUSCIK-TALHARI *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2011;

NEVES *et al.*, 2011), e além disso há poucos trabalhos de detecção em flebotomíneos (ARIAS & FREITAS, 1978; ARIAS *et al.*, 1987; PINHEIRO *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2010).

A detecção e identificação das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* foi reportada por Romero *et al.*, (2002) em um total de 71 pacientes da cidade de Manaus, utilizando anticorpos monoclonais e eletroforese de enzimas, sendo destacada a predominância de *L. (V.) guyanensis*. Guerra *et al.*, (2003) apresentaram um estudo de caso com um total de 48 militares com lesões de LTA que se manifestaram após uma operação de treinamento militar na Amazônia. A detecção do parasito foi realizada por pesquisa direta em material corado com GIEMSA, e a identificação só foi possível ao nível de gênero.

Figueira *et al.*, (2008) identificaram as espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* em um total de 23 isolados de lesões de pacientes de Manaus e no município de Rio Preto da Eva, utilizando eletroforese de isoenzimas. Em um estudo com um total de 90 casos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a confirmação de diagnóstico histopatológico consistente com LTA em Manaus. Os parasitos foram detectados e identificados somente ao nível de gênero, contudo o autor destaca a importância da ferramenta molecular na confirmação do diagnóstico (ANRADE-FILHO *et al.*, 2011).

Benício *et al.*, (2011) também realizam detecção e identificação de *Leishmania*, por exame direto, biópsia cutânea com realização de exame histopatológico, reação em cadeia da polimerase e cultura. O estudo identificou as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* provenientes de lesões de 180 pacientes.

Em um estudo de caracterização de *Leishmania* na cidade de Manaus um total de 209 *Leishmania* spp. foram isoladas de pacientes que residem na cidade e em regiões próximas. As espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* foram caracterizadas utilizando anticorpos mono clonais e isoenzimas (COELHO *et al.*, 2011). Neves *et al.*, (2011) realizaram a identificação de cepas de *Leishmania* em lesões de 185 pacientes de Manaus, por PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Todos os pacientes estavam infectados por *L. (V.) guyanensis*.

Guerra *et al.*, (2011) realizaram detecção e identificação de espécie de *Leishmania*, por reação de PCR seguida de RFLP, em pacientes que buscaram o atendimento médico na Fundação de Medicina Tropical (FMT), em Manaus e foram diagnosticados com leishmaniose mucosa. Um total de 46 casos com sua origem geográfica foram registrados, destes, 30 casos por *L. (V.) braziliensis* e 16 *L. (V.) guyanensis*. Foi o primeiro registro de casos LM em 16 municípios do Estado do Amazonas e de detecção de ambas as espécies em 4 municípios do Estado.

Em um estudo sobre vetores de LTA realizado na cidade de Manaus, coletou um total de 6337 flebotomíneos que foram submetidos a dissecação do tubo digestivo para detecção do parasito. Um total de 466 indivíduos foi considerado infectado, estes pertenciam a 6 espécies, porém somente nas espécies *Ny. umbratilis* e *Ny. anduzei* foi possível realizar a identificação do parasito, que foi confirmado como *L. (V.) guyanensis* (ARIAS & FREITAS, 1978). Arias *et al.*, (1987) também realizaram um estudo sobre vetores de LTA na cidade de Manaus e por sua vez encontraram *L. (L.) amazonensis* infectando as espécies *Bichromomyia flaviscutellata* e *Bi. olmeca nociva*.

Os estudos com hospedeiros vertebrados também estão concentrados na cidade de Manaus, onde foi encontrado *Proechimys guyannensis*, *Marmosa cinerea* e *Didelphis marsupialis* infectados por *L. (L.) amazonensis* (ARIAS *et al.*, 1987), *Didelphis marsupialis* também foi encontrada infectada com por *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (ARIAS & NAIFF, 1981) em um estudo sobre hospedeiros reservatórios em área urbana da cidade de Manaus. Estes são alguns modelos de trabalho que podem auxiliar na elucidação do ciclo de transmissão de LTA, esclarecendo relações entre espécies hospedeiras, vetores e parasitas e delimitando áreas de circulação de espécies infectantes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDO

O município de Lábrea (07°15'S/64°47'W) está localizado entre os rios Madeira e Purús, em divisa com o estado de Rondônia e entre municípios de Boca do Acre, Pauini, Itamarati, Tapauá e Canutama. A cidade possui 36.826 habitantes e uma área de aproximadamente 68.234 Km² (IBGE/CIDADES, 2010) (FIGURA 6; FIGURA 7).

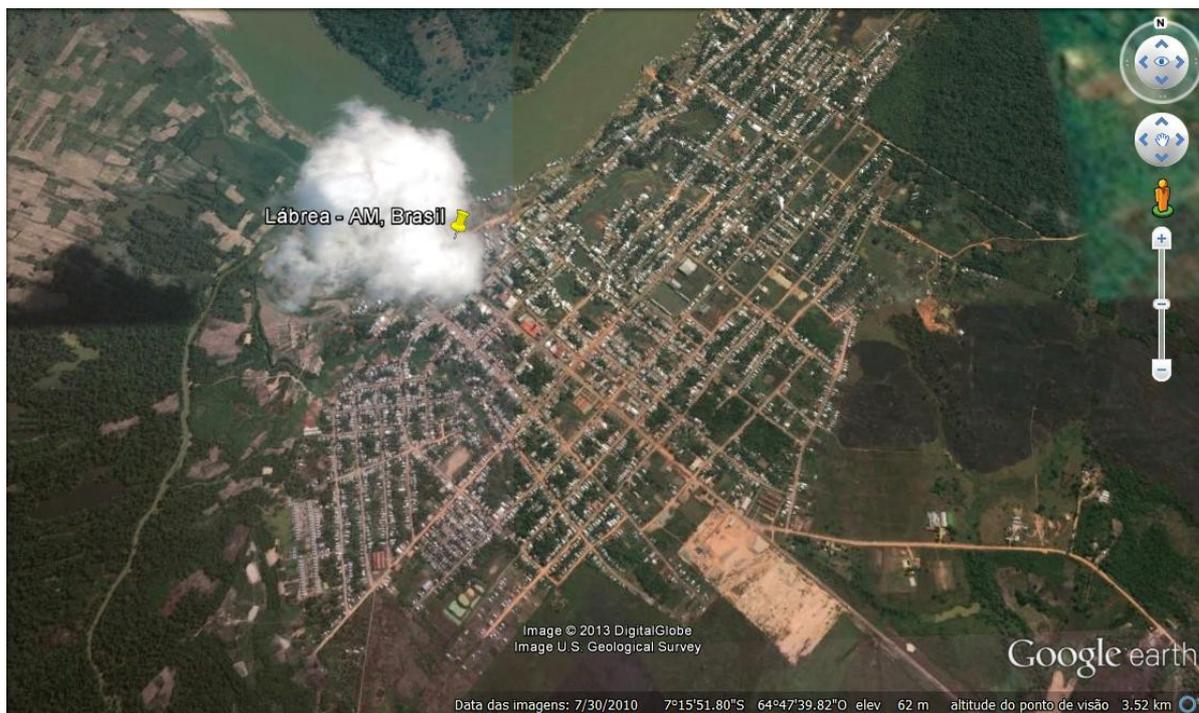


FIGURA 6: Município de Lábrea, localizada ao sul do estado do Amazonas, Brasil.



FIGURA 7: Área urbana do município de Lábrea, localizado às margens do rio Purus, estado do Amazonas, Brasil.

No município encontram-se diversas unidades de conservação e terras indígenas (TIs) como a TI Paumari do Ituxi, TI Paumari do lago Marahã, TI Juma, TI Jacareúba/Katawixi, TI Hi-Merimã, entre outras presentes na área (FIGURA 8). Dentre estas, está a Terra Indígena Caititú, homologada, registrada no Cartório de

Registro de Imóveis – CRI e Secretaria do Patrimônio da União – SPU, decreto nº 282, de 29 de outubro de 1991 publicado em 30/10/1991, sul do estado do Amazonas, sendo caracterizada como de ocupação tradicional e permanente indígena. A TI Caititú possui uma área oficial de 308.062 hectares e uma população de aproximadamente 1.022 indígenas, composta por três povos indígenas que estão presentes neste território, sendo estes os povos Apurinã, Jamamadi e Paumari.



FIGURA 8: Terras Indígenas localizadas nas proximidades do município de Lábrea, estado do Amazonas, Brasil.

A Aldeia Castanheira fica a aproximadamente 24 km de distância da área urbana do município de Lábrea, está localizada na Terra Indígena Caititú, e possui cerca de 70 habitantes, de acordo com censo do Subsistema de Atenção à Saúde Indígena/Secretaria Especial de Saúde Indígena (SIASI/SESAI)(FIGURA 9; FIGURA 10). Esta aldeia é habitada por indígenas da etnia Apurinã, que é um povo que historicamente ocupou áreas relativamente próximas às margens do Rio Purús, presentes também nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Roraima. Este povo

apresenta uma população de aproximadamente 8.267 habitantes, com uma organização social disposta em pequenos grupos familiares que se distribuem pelas comunidades (SIASI/SESAI, 2012).



FIGURA 9: Localização da Aldeia Castanheira (Terra Indígena Caititú), em relação à cidade de Lábrea, estado do Amazonas.



FIGURA 10: A - Casa tradicional na Aldeia Castanheira, localizada na TI Caititú. B - Moradora da Aldeia e animais domésticos.

A língua falada por esse povo é o Apurinã, que pertence a família *Maipure-Aruak* do ramo Purús, e mais próxima ao Piro, que é conhecida no Brasil como

Manchineri (FACUNDES, 1994). O histórico de contato do povo Apurinã com os não-índios não é diferente da maioria dos povos indígenas da Amazônia e datam do final do século XIX quando a exploração da borracha passou a ser realizada em áreas ocupadas pelos indígenas o que gerou inúmeros conflitos e acabou por interferir e influenciar a cultura do povo Apurinã (SCHIEL, 2000).

As atividades produtivas do povo Apurinã em geral, bem como os habitantes da Aldeia Castanheira, são regidas por fatores ambientais, dependendo do ciclo das águas nos períodos de seca e de chuva que determinam a execução da pesca, agricultura e extração de produtos da floresta (CAÑETE *et al.*, 2008).

A pesca é uma atividade essencial para os Apurinã, sendo realizada durante todo o ano. No período de vazante e de seca quando os lagos apresentam peixes em abundância, esta atividade apresenta-se em caráter comercial, o que não é visto no restante do ano, quando a pesca possui um caráter de subsistência presente no cotidiano das famílias (CAÑETE *et al.*, 2008).

No período de extrativismo, uma atividade que envolve todos os indivíduos, a extração de óleo de andiroba e coleta de castanha-do-Brasil se fazem muito presente, sendo atividades com fins comerciais que acontecem durante o período de dezembro a março. Em abril, após o período de extrativismo, iniciam-se as atividades agrícolas, que por apresentarem dificuldades no transporte e qualidade da produção exigida pelo mercado se apresentam em caráter de subsistência (CAÑETE *et al.*, 2008).

5.2 COLETA DE PHLEBOTOMINAE

A coleta de Phlebotominae na Terra Indígena Caititú foi realizada durante o período de 17 ao dia 24 de fevereiro de 2012, totalizando 8 dias de captura. Uma segunda viagem para a TI Caititú foi realizada, porém a companhia aérea responsável pelo transporte do material de coleta não realizou a entrega durante o período de estadia na cidade de Lábrea, não havendo condições de realizar a segunda coleta prevista para o período de abertura dos roçados pelos indígenas.

Foram utilizadas armadilhas luminosas modelo HP (PUGEDO *et al.* 2005), que utilizam quatro pilhas alcalinas, tamanho grande de 1,5V como fonte de energia tanto para a luz quanto para o motor da ventoinha, que mantém um fluxo de ar contínuo em direção à uma gaiola entomológica constituída de hastes de metal e envolta por tecido a qual os insetos ficam acondicionados. Um saco plástico foi instalado de modo que toda a área da gaiola entomológica fosse coberta, para que em caso de chuva não molhasse o material coletado (FIGURA 11). As armadilhas foram instaladas a uma altura de até 2 m, em 10 pontos ao longo do castanhal utilizado para a exploração da castanha-do-Brasil, e ao longo do iagarapé Poágua, utilizado pelos indígenas para as atividades diárias (TABELA 3).

TABELA 3: Relação de todos os pontos de coleta presentes na Aldeia Castanheira com suas respectivas coordenadas geográficas.

Ponto de coleta	Latitude	Longitude
1	7°27'32.50"S	64°43'54.30"O
2	7°27'39.90"S	64°43'35.00"O
3	7°27'35.50"S	64°43'55.30"O
4	7°27'32.10"S	64°43'51.50"O
5	7°27'28.70"S	64°43'42.20"O
6	7°27'31.00"S	64°43'50.20"O
7	7°27'30.60"S	64°43'49.20"O
8	7°27'30.90"S	64°43'42.40"O
9	7°27'29.70"S	64°43'42.80"O
10	7°26'55.48"S	64°43'42.97"O



FIGURA 11: Armadilhas luminosa instaladas na Aldeia Castanheira, TI Caititú, para a coleta de flebotomíneos.



FIGURA 12: Coleta de flebotomíneos utilizando aspirador manual em base de árvore. Aldeia Castanheira, Terra indígena Caititú, Lábrea.

O tempo de funcionamento das armadilhas foi de 24 h devido à dificuldade de acesso à área de coleta, com exposição de sete noites e totalizando um esforço

amostral de 156 h por armadilha. Também foram utilizados aspiradores durante o período da manhã de 8h às 11h para varredura em troncos de árvores também ao nível do solo de até 2 metros de altura (FIGURA 11; FIGURA 12). A coleta de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) foi realizada sob a licença SISBIO/IBAMA (32971 e 15955-1).

5.3 MANUTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS

A cada manhã foi feita a manutenção das 10 armadilhas instaladas na TI Caititu, que consistiu na retirada das gaiolas entomológicas e a subsequente reposição por uma gaiola vazia. A checagem da lâmpada que funcionou como atrativo luminoso também foi realizada, além de um rodízio das pilhas que alimentam a armadilha, pois foi observado um maior gasto de energia nas pilhas destinadas à alimentação do motor que mantém o fluxo contínuo de ar direcionado à gaiola entomológica, do que as destinadas à alimentação da lâmpada, garantindo assim um perfeito funcionamento durante todo o período amostral.

Os flebotomíneos foram retirados das gaiolas entomológicas com auxílio de capturadores manuais e pinceis entomológicos, e foram mortos por congelamento, acondicionados em congelador, a -20 °C por 10 minutos. Em seguida a triagem do material foi realizada, separando indivíduos machos e fêmeas utilizando pinças entomológicas. Uma segunda triagem também foi realizada para as fêmeas, separando aquelas que apresentavam algum sinal de repasto sanguíneo em seu abdômen daquelas que não apresentavam vestígio de alimentação sanguínea, pois as fêmeas ingurgitadas (que apresentaram sinal de alimentação) foram usadas para

a identificação de repasto sanguíneo (estudo de fonte alimentar). Os flebotomíneos coletados foram acondicionados individualmente em microtubos de 1,5 mL contendo DMSO 6% (dimetilsulfóxido), que age como um crioprotetor evitando a morte celular durante o processo de congelamento. Os insetos foram mantidos congelados em -20°C até o retorno ao laboratório, onde foi realizada a dissecação e identificação dos flebotomíneos coletados na TI Caititú, além de todos os ensaios de biologia molecular realizados neste trabalho.

5.4 DISSECÇÃO, PREPARO DAS AMOSTRAS E IDENTIFICAÇÃO DOS PHLEBOTOMINAE

A dissecação e toda o restante das análises laboratoriais (FIGURA 14) foram realizadas no Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ MINAS. Os insetos foram dissecados em solução salina tamponada – PBS (*Phosphate buffered saline*) estéril, com auxílio de estiletos entomológicos adaptados com agulhas de insulina estéreis e descartáveis, e consistiu na retirada cuidadosa dos três últimos segmentos abdominais e cabeça das fêmeas que foram transferidos para outra lâmina e montados em líquido de Berlese, que possibilita a análise de estruturas internas com maior nitidez, devido a sua baixa refração. O restante do corpo das fêmeas foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 200 µL de PBS estéril e armazenado em congelador até o passo de extração de DNA. Os machos foram clarificados conforme o método descrito por Forattini (1973), montados em bálsamo do Canadá e depositados na coleção de flebotomíneos do Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

A identificação dos flebotomíneos foi realizada de acordo com as chaves de Galati (2003) e Young & Duncan (1994) e seguiu-se classificação proposta por Galati (2003). Os insetos foram identificados com auxílio de microscopia ótica para observação de caracteres morfológicos internos e externos presentes nos insetos coletados.

5.5 DETECÇÃO E INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS POR LEISHMANIA SPP.

5.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS FÊMEAS CAPTURADAS

Para o ensaio de detecção de *Leishmania* por ITS1 PCR, as amostras foram organizadas de acordo com a disponibilidade do número de indivíduos por espécie coletada referentes ao mesmo ponto de coleta. Estas foram organizadas em *pools* de flebotomíneos que variaram de 2 a no máximo 10 indivíduos por tudo. As fêmeas ingurgitadas, destinadas ao estudo de fonte alimentar foram analisadas individualmente.

A extração de DNA de todos os indivíduos coletados na TI Caititú foi realizada utilizando o *kit* de extração de tecido e célula Genra Puregene® da QIAGEN, seguindo especificações do fabricante e modificações realizadas por Quaresma *et al.* (2011). Os indivíduos organizados em *pools* ou dispostos individualmente em microtubos foram macerados com auxílio de pistilos autoclavados em 100 µL de solução de lise celular, para amostras de uma fêmea, ou 200 µL para amostras em *pools* (2 a 10 indivíduos). Em seguida foi adicionado 1 µL (para uma fêmea) ou 1,5 µL (para *pool*) de solução de proteinase K, homogeneizada por inversão e incubada a 55 °C *overnight*. Ao término do período de incubação em proteinase K, 1 µL (para

uma fêmea) ou 1,5 μL (para *pool*) de RNase foi adicionado à cada amostra, homogeneizada por inversão e incubada por 37 minutos a 37 °C, seguido de uma incubação de três minutos ao gelo, em seguida foi adicionado 100 μL de solução de precipitação de proteínas e “vortexado” por 20 segundos sob alta velocidade seguido de centrifugação por cinco minutos a 14000 rpm (12000x g). O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um tubo novo e foi adicionado 300 μL de isopropanol, sendo homogeneizado por imersão e seguido de centrifugação, novamente a 14000 rpm. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o tubo cuidadosamente mantido aberto foi secado invertido contra um papel absorvente. Uma vez que o tubo estava totalmente seco, foi adicionado etanol 70%, seguido inversão abundante e nova centrifugação a 14000 rpm por cinco minutos. A extração de DNA foi finalizada com o descarte do sobrenadante, secagem utilizando o aparelho *Concentrator* (Savant *speed vac*®), e após a total secagem dos tubos, foi adicionado solução de hidratação de DNA, 25 μL (amostra individual) ou 40 μL (para *pool*). Um último passo de incubação a 65 °C por uma hora seguido de incubação a temperatura ambiente *overnight* ainda foi feito antes do armazenamento em congelador à temperatura de -20 °C.

A quantificação das amostras de DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000, para aferir a concentração e pureza das amostras. Seguindo as recomendações do fabricante o espectro de luz foi ajustado para 260 e 280 nanômetros, para detecção de ácidos nucleicos e a razão de absorbância de 260nm/280nm foi utilizada para avaliar a pureza do material extraído, aceitando-se valores entre 1,4 e 1,8.

5.5.2 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO CACOFONIA POR PCR

A reação de amplificação direcionada ao alvo *IVS6 (Cacofonia)*, gene constitutivo de DNA de flebotomíneo, foi realizada como o primeiro teste de controle da extração de DNA, pois uma vez que o fragmento de flebotomíneo fosse amplificado confirmaria a eficiência da reação de extração.

A reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Lins *et al.* (2002). Os *primers* utilizados foram: 5Llcac 5' GTG GCC GAA CAT AAT GT AG 3' e 3Llcac 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3'. O volume final da reação foi de 25 µL distribuídos em: 2.5 µL de PCR Buffer 10x, 0.5 µL de dNTP 200 µM, 1 µL de cada *primer* 50 pmol, 0.7 µL de Paltinum Taq® DNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen), 17.3 µL de H₂O e 2 µL de DNA *template*.

A amplificação foi realizada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler gradient com o seguinte programa: uma desnaturação inicial de 94° C por 12 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, com uma extensão final de 72° C por 10 minutos, gerando um produto de aproximadamente 220 pares de bases.

5.5.3 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2) POR PCR

A reação de amplificação direcionada ao alvo *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2)* foi realizada como controle da extração de DNA, pois uma vez que o fragmento de flebotomíneo fosse amplificado confirmaria a eficiência da reação de

extração.

A reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Depaquit *et al.* (2002) e Zapata *et al.* (2012). Os *primers* utilizados foram C1a: 5' CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCT 3' e P1AS 5' CGCAGCTAACTGTGTGAAATC 3'. O volume final da reação foi de 15 µL distribuídos em: 0.75 µL de PCR Buffer 10x, 0.45 µL de MgCl₂ 1.5 mM, 0.3 µL de dNTP 200 µM, 0.15 µL de cada *primer* 50 pmol, 0.075 µL de Platinum Taq® DNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®), 11.625 µL de H₂O e 1.5 µL de DNA *template*.

A amplificação foi realizada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler gradient (FIGURA 13) com o seguinte programa: uma desnaturação inicial de 94 °C por três minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 10 minutos, gerando um produto de 480 a 516 pares de bases, dos quais 274 a 310 nucleotídeos são atribuídos ao *ITS 2*.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e analisados com sistema de foto documentação L-PIX EX Loccus Biotecnologia® para a confirmação da amplificação.

5.5.4 NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION DO ALVO SSU DE LEISHMANIA

A amplificação por *nested* PCR (Ln-PCR) foi direcionada ao alvo SSU rRNA que é um fragmento de uma região conservada entre as espécies de *Leishmania*, o que o torna um alvo em potencial para a detecção direta do parasito sem a

necessidade de isolamento a partir de amostras biológicas (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002; CRUZ *et al.*, 2006). A reação seguiu o protocolo descrito por Cruz *et al.* (2002) que utilizou na primeira reação os *primers* R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3'. Para este trabalho devido ao baixo volume de DNA *template* e à impossibilidade de retorno à área de coleta, os volumes finais das reações bem como os volumes de todos os reagentes utilizados nas reações de PCR foram reduzidos proporcionalmente. Sendo assim, o volume final da primeira reação foi de 15 μL , dispostos em: 1.5 μL de PCR *Buffer* 10x 2 mM MgCl_2 , 0.3 μL dNTP mix 10mM, 0.3 μL de cada *primer* 15 pmol/ μL , 9.18 μL de H_2O , 0.42 μL PaltinumTaq® DNA polymerase 1 U/ μL (Invitrogen) e 3 μL de DNA *template*.

A amplificação foi realizada em aparelho termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler (FIGURA 13) com o seguinte programa: uma desnaturação inicial de 94 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos, gerando um produto de 603 pares de bases.

Antes da segunda reação ser iniciada, uma diluição do produto da primeira reação foi realizada da seguinte maneira: em tubos de 0,6 mL autoclavados contendo 300 μL de H_2O foi adicionado 7.5 μL do produto da primeira reação. Este produto diluído foi utilizado como DNA *template* da segunda reação. Os *primers* utilizados na segunda reação foram o R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'. O volume final da segunda reação também foi de 15 μL , dispostos da seguinte forma: 1.5 μL de PCR *Buffer* 10x 2mM

MgCl₂, 0.3 µL dNTP mix 10mM, 0.3 µL do *primer* R3 15 pmol/µL, 0.15 µL do *primer* R4 15 pmol/µL, 6.33 µL de H₂O, 0.42 µL DNA polymerase (Biotools®) 1U/µL e 6 µL de DNA *template*. A amplificação também foi realizada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler gradiente (FIGURA 12) com o seguinte programa: uma desnaturação inicial de 94 °C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos, gerando um produto de 353 pares de bases.

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), cedidas gentilmente pelo Grupo de Estudos de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e analisados com sistema de fotodocumentação L-PIX EX Locus Biotecnologia® para a confirmação da amplificação.



FIGURA 13: Aparelhos termocicladores utilizados nas reações de amplificação de DNA. A. *Mastercycler gradient* – *epENDOR*®; B. *Veriti* – *Applied Biosystems*®

5.5.5 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 1 (ITS1)* POR PCR

Outro alvo também foi utilizado para a detecção do DNA do parasito para tentar estimar a infecção natural na Terra Indígena Caititú, este foi o *Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1)*, que é um fragmento de aproximadamente 350 pares de base. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Schonian *et al.*, (2003) que optou pela abordagem PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction - Restriction Fragment length Polymorphism*). Os *primers* utilizados na reação foram LITSR: 5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3' e L5.8S: 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3'. O volume final da reação foi reduzido proporcionalmente para 15 µL devido a pouca disponibilidade de DNA *template*. As concentrações e volumes de reagentes utilizados foram as seguintes: PCR Buffer 10x 1.5 µL, MgCl₂ 50 mM 0.45 µL, dNTP 10 mM 0.3 µL, DMSO (dimetilsulfóxido) 0.75 µL, *primer* LIT SR 10 pmol 0.75 µL, *primer* L5.8S 0.75 µL, Taq DNA Polymerase® (Invitrogen®) 5 U/µL, H₂O 7.35 µL. Para cada reação foi utilizada um volume de 3 µL de DNA *template*.

A amplificação foi realizada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler gradient (FIGURA 13) com o seguinte programa: uma desnaturação inicial de 95 °C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Como na reação com o alvo anterior, o *SSU rRNA*, foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), cedidas pelo Grupo de estudo de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e analisados com sistema de fotodocumentação L-PIX EX Locus Biotecnologia® para a confirmação da amplificação.

5.5.6 PURIFICAÇÃO DE BANDAS POSITIVAS PARA O SEQUENCIAMENTO

As bandas consideradas positivas na reação amplificação do alvo *ITS1* foram retiradas dos géis de agarose com auxílio de lâminas de bisturi descartáveis, utilizando-se uma lâmina para cada banda, e submetidas a reação de purificação, realizada na Plataforma de sequenciamento do CpqRR. Foi utilizado o *kit* de purificação QIAquick gel extraction da QIAGEN® adotando-se as recomendações do fabricante.

5.5.7 RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) DO ALVO ITS1 DE LEISHMANIA

Como descrito por Schonian *et al.*, (2003), as amostras que foram consideradas positivas para o alvo *ITS 1* foram submetidas a reação de RFLP com a enzima de restrição *HaeIII*.

Os volumes dos reagentes e DNA *template* utilizados nesta reação foram dispostos na seguinte forma: 1 µL de *HaeIII* (10U/µL), 1,5 µL 1X NEBuffer 4, 2,5 µL de H₂O destilada e 10,0 µL de produto de PCR, tendo assim um volume final de 15 µL.

A reação ocorreu de acordo com as recomendações do fabricante (New England Biolabs®), havendo apenas uma incubação inicial da amostra já processada de 2 horas a 37 °C. Os perfis de restrição foram visualizados em gel de agarose 4% utilizando o sistema de foto documentação L-PIX EX Locus Biotecnologia® e comparados com os padrões obtidos com os produtos da cepas de referência utilizadas como controles positivos em todas as reações de PCR deste trabalho: *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

5.5.8 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO HSP70 (HEAT SHOCK PROTEIN) DE LEISHMANIA POR PCR

Neste trabalho ainda foi utilizado o alvo *hsp70*, seguindo protocolo descrito por Garcia *et al.* (2004). Para esta reação de PCR foram utilizado os *primers Hsp70* sen (5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3') e *Hsp70* ant (5'

CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3'). Os volumes originais também foram reduzidos proporcionalmente, tendo assim uma reação de volume final de 25 µL dispostos nos seguintes valores: 2.5 µL de PCR *Buffer* 10x, 0.75 µL MgCl₂ 50 mM, 1.25 µL de DMSO, 0.5 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada *primer* a 10 pmol, 0.25 µL de Taq DNA Polymerase® (Invitrogen®) 5U/µL e 5 µL de DNA *template*.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler, sob as seguintes condições: passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguido de 33 ciclos, cada um consistindo de 30 segundos a 94 °C, 1 min a 61°C e 3 min a 72 °C, finalizando com 10 min a 72 °C.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e analisados com sistema de foto documentação L-PIX EX Loccus Biotecnologia® para a confirmação da amplificação.

5.5.9 TAXA DE INFECÇÃO NATURAL

Para esta investigação as taxas de infecção natural, considerando a presença de DNA de *Leishmania* nas amostras analisadas, foram estimadas de acordo com a metodologia descrita por Paiva *et al.* (2007) que para calcular a taxa mínima de infecção natural utilizou a seguinte fórmula:

Taxa mínima (TM) = número de grupos positivos x 100/número total de insetos.

5.6 AMPLIFICAÇÃO DO ALVO *CITOCROMO B (CYTB)* PARA IDENTIFICAÇÃO DE REPASTO SANGUÍNEO NAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADAS

As amostras de fêmeas que apresentaram indícios de alimentação sanguínea

foram consideradas ingurgitadas e destinadas ao estudo de fonte alimentar, sendo submetidas à reação de amplificação direcionada ao gene *citocromo B*.

A reação seguiu o protocolo descrito por Quaresma *et al.* (2012). Os *primers* utilizados na reação foram *CYTB forward* 5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3' e *CYTB reverse* 5' GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3'. O volume final da reação foi de 15 µL distribuídos nos seguintes valores de reagentes e suas concentrações, e DNA *template*: 1.5 µL de PCR Buffer 10x, 0.45 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.3 µL de dNTP 10 mM, 0.75 µL de cada *primer*, 0.06 µL de Taq DNA Polimerase® (invitrogen®) 5 U/µL, 9.69 µL de H₂O e 1.5 µL de DNA *template*.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador automático Eppendorf® Mastercycler, (FIGURA 13) sob as seguintes condições: passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos, cada um consistindo de 30 segundos a 95 °C, 30s a 58 °C e 30s a 72 °C, finalizando com 6 min a 72 °C.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e analisados com sistema de foto documentação L-PIX EX Locus Biotecnologia® para a confirmação da amplificação.

5.6.1 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DO ALVO ITS1 DE LEISHMANIA

A reação de sequenciamento genético foi realizada pela Plataforma de sequenciamento Sanger do CPqRR/FIOCRUZ MINAS para identificar as espécies de *Leishmania* detectadas em todas as amostras consideradas positivas para o alvo ITS1. O sequenciamento genético foi realizado a partir dos produtos obtidos das reações de PCR, que foram purificados utilizando o kit de purificação QIAquick®

PCR Purification *kit* (Qiagen), adotando-se as recomendações do fabricante. Foi utilizado 1 µL do produto purificado que foi adicionado ao *mix* contendo seguintes reagentes e volumes: 1 µL de *primer* a 3.3 pmol, sendo utilizados os *primers* senso ou anti-senso por *mix*, 1 µL de Sequencing Buffer 5x, 1 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing e 6 µL de H₂O. A reação foi realizada em 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 65 °C por 15 segundos. Os produtos foram sequenciados em equipamento ABI 3730xl DNA Analyzer. Os arquivos do sequenciamento foram analisados com o programa FinchTV 1.4 (Geospiza), o BLAST foi utilizado para o alinhamento das sequências obtidas com as sequências do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e as sequências foram alinhadas no programa MEGA5 (Kumar *et al.*, 2008).

5.6.2 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

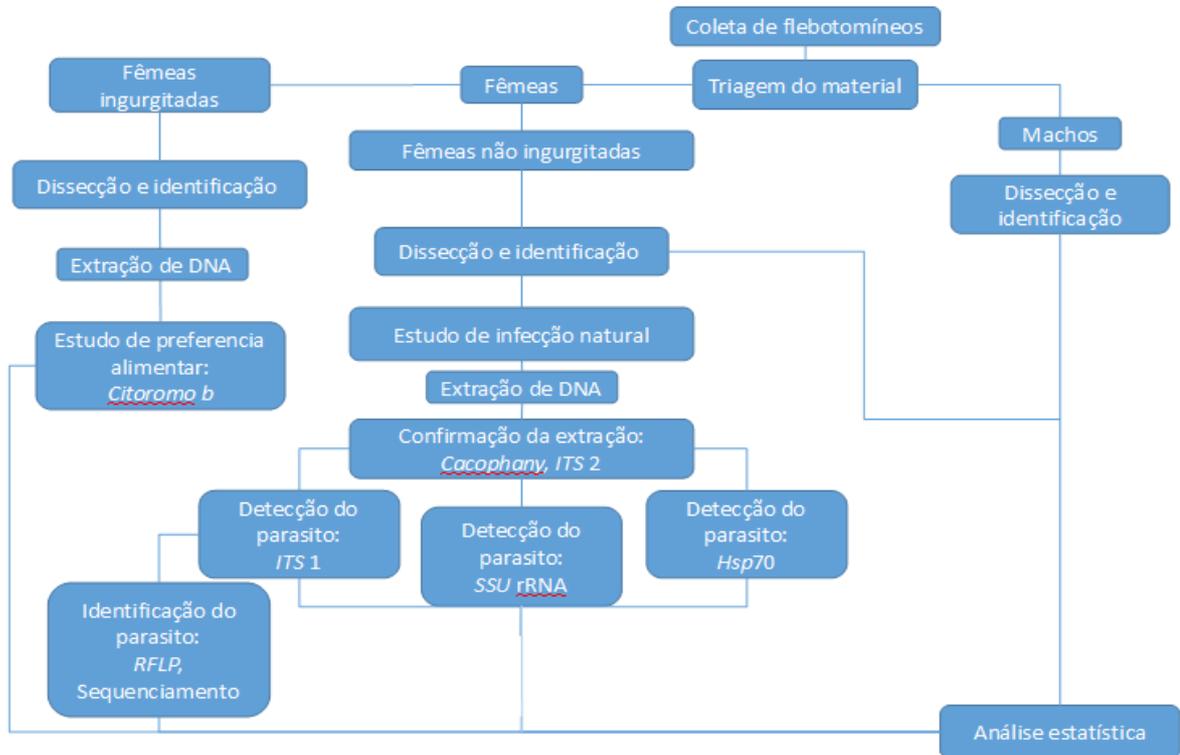


FIGURA 14: Fluxograma esquematizando toda a metodologia utilizada para a realização deste trabalho, desde a coleta de flebotomíneos até a análise dos dados.

6. RESULTADOS

6.1 COLETA DE FLEBOTOMÍNEOS E ESTUDO DE FAUNA

Um total de 1.267 flebotomíneos pertencentes a três subtribos, Lutzomyiina, Psychodopygina e Sergentomyiina, foi coletado na Aldeia Castanheira, TI Caititú, município de Lábrea, estado do Amazonas. Destes, 819 (64,6%) foram fêmeas e 448 (35,4%) foram machos sendo a razão de fêmeas/machos igual a 1,82 (TABELA 4). Este total de insetos foi distribuído em 10 gêneros (TABELA 4 e 5): *Bichromomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Nyssomyia*, *Psathyromyia*, *Psychodopygus*, *Sciopemyia*, *Trichophoromyia* e *Viannamyia*, e 32 espécies de flebotomíneos (TABELA 2).

Em um total de 26 (2,1%) exemplares coletados, não foi possível realizar a identificação devido a perda de estruturas morfológicas utilizadas para a classificação taxonômica. Pela mesma razão um total de 119 (9,4%) foi identificado somente ao nível de gênero. Esta perda pode ter ocorrido durante uma das seguintes etapas: i. processo de coleta; ii. triagem; iii. ou preparo de lâmina, pois são insetos delicados e sensíveis ao manuseio.

TABELA 4: Total de espécies de flebotomíneos coletados em TI Caititú, Lábrea, estado do Amazonas, por método de coleta no período de 17 a 24 de fevereiro de 2012.

Gênero	Espécie	CDC		CDC		CDC		CDC		CDC		CDC		CDC		CDC		Base		Sem reg		TOTAL				
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10			F		M	
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M		F	M	F	M
<i>Evandromyia</i>	<i>apurinan</i>	-	-	3	-	-	-	1	-	-	-	5	-	2	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Evandromyia</i>	<i>bacula</i>	-	-	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Evandromyia</i>	<i>begonae</i>	5	-	20	-	1	-	-	-	2	-	4	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35
<i>Evandromyia</i>	<i>infraspinosa</i>	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Evandromyia</i>	<i>saulensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
<i>Evandromyia</i>	<i>walkeri</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	5
<i>Lutzomyia</i>	<i>sherlocki</i>	-	-	5	-	3	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
<i>Sciopemyia</i>	<i>servulolimai</i>	-	-	18	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
<i>Sciopemyia</i>	<i>sordellii</i>	9	1	25	-	-	-	5	1	3	-	15	5	3	1	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	71
<i>Psathyromyia</i>	<i>abunaensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Psathyromyia</i>	<i>aragaoi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Psathyromyia</i>	<i>coutinhoi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Psathyromyia</i>	<i>barrettoi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Psathyromyia</i>	<i>dendrophyla</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	5
<i>Bichromomyia</i>	<i>flaviscutellata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	2	-	2	-	-	-	-	-	7
<i>Nyssomyia</i>	<i>anduzei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2
<i>Nyssomyia</i>	<i>antunesi</i>	2	-	13	2	4	-	8	-	14	4	20	5	38	7	5	-	3	-	4	3	-	3	-	-	135
<i>Nyssomyia</i>	<i>richardwardi</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Nyssomyia</i>	<i>yuilliyuilli</i>	5	-	6	-	6	-	3	-	-	-	6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>Nyssomyia</i>	<i>umbratilis</i>	2	-	5	-	1	-	5	-	1	-	5	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26
<i>Psychodopygus</i>	<i>ayrozai</i>	-	1	2	1	1	1	1	-	8	-	15	9	9	7	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	56
<i>Psychodopygus</i>	<i>carreirai</i>	1	-	1	-	-	-	-	6	-	-	2	4	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	17
<i>Psychodopygus</i>	<i>chagasi</i>	-	2	-	-	-	-	1	-	2	-	2	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Psychodopygus</i>	série <i>chagasi</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	16	-	2	1	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26
<i>Psychodopygus</i>	<i>clautrei</i>	1	1	-	-	1	1	-	1	1	-	2	5	1	5	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	21
<i>Psychodopygus</i>	<i>davisi</i>	7	6	3	4	2	2	7	1	97	4	19	2	46	9	7	1	6	1	-	2	-	1	-	1	228
<i>Psychodopygus</i>	<i>llanosmartinsi</i>	-	-	-	-	-	-	-	15	-	1	-	3	3	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	24
<i>Psychodopygus</i>	<i>paraensis</i>	2	1	4	-	1	1	2	2	1	-	23	6	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
<i>Trichophoromyia</i>	<i>flochi</i>	-	1	-	1	-	1	-	2	-	-	-	10	-	7	-	2	-	1	-	31	-	-	-	-	56
<i>Trichophoromyia</i>	<i>ubiquitalis</i>	-	8	2	1	2	2	4	12	4	7	16	48	15	15	6	8	1	-	19	61	-	4	-	-	235
<i>Viannamyia</i>	<i>furcata</i>	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3
<i>Viannamyia</i>	<i>tuberculata</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Micropygomyia</i>	<i>pilosa</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
-	sp*	6	2	6	3	4	1	6	2	13	1	14	9	6	8	2	1	1	2	10	17	5	-	-	-	119
	Sem identificação	-	1	-	3	-	-	-	3	-	-	3	5	1	4	-	1	-	-	1	2	-	2	-	-	26
	TOTAL	42	24	123	21	27	10	47	25	182	18	157	115	152	80	31	15	15	4	38	121	5	13	-	2	1267

sp* - Indivíduos identificados somente ao nível de gênero.

TABELA 5: Percentagem de fêmeas e machos, por espécie, coletados na TI Caititú, Lábrea, estado do Amazonas, fevereiro de 2012.

GÊNERO	ESPÉCIE	FÊMEAS	(%)	MACHOS	(%)	TOTAL	(%)
<i>Evandromyia</i>	<i>apurinan</i>	13	1,0%	-	0,0%	13	1,0%
<i>Evandromyia</i>	<i>bacula</i>	5	0,4%	-	0,0%	5	0,4%
<i>Evandromyia</i>	<i>begonae</i>	35	2,8%	-	0,0%	35	2,8%
<i>Evandromyia</i>	<i>infraspinosa</i>	6	0,5%	-	0,0%	6	0,5%
<i>Evandromyia</i>	<i>saulensis</i>	6	0,5%	1	0,1%	7	0,6%
<i>Evandromyia</i>	<i>walkeri</i>	2	0,2%	3	0,2%	5	0,4%
<i>Lutzomyia</i>	<i>sherlock</i>	11	0,9%	-	0,0%	11	0,9%
<i>Sciopemyia</i>	<i>servulolimai</i>	19	1,5%	4	0,3%	23	1,8%
<i>Sciopemyia</i>	<i>sordellii</i>	60	4,7%	11	0,9%	71	5,6%
<i>Psathyromyia</i>	<i>abunaensi</i>	1	0,1%	1	0,1%	2	0,2%
<i>Psathyromyia</i>	<i>aragaoi</i>	-	0,0%	1	0,1%	1	0,1%
<i>Psathyromyia</i>	<i>coutinhoi</i>	-	0,0%	1	0,1%	1	0,1%
<i>Psathyromyia</i>	<i>barrettoi</i>	-	0,0%	2	0,2%	2	0,2%
<i>Psathyromyia</i>	<i>dendrophyla</i>	-	0,0%	5	0,4%	5	0,4%
<i>Bichromomyia</i>	<i>flaviscutellata</i>	7	0,6%	-	0,0%	7	0,6%
<i>Nyssomyia</i>	<i>anduzei</i>	-	0,0%	2	0,2%	2	0,2%
<i>Nyssomyia</i>	<i>antunesi</i>	111	8,8%	24	1,9%	135	10,7%
<i>Nyssomyia</i>	<i>richardwardi</i>	-	0,0%	2	0,2%	2	0,2%
<i>Nyssomyia</i>	<i>yuilliyuilli</i>	27	2,1%	-	0,0%	27	2,1%
<i>Nyssomyia</i>	<i>umbratilis</i>	26	2,1%	-	0,0%	26	2,1%
<i>Psychodopygus</i>	<i>ayrozai</i>	36	2,8%	20	1,6%	56	4,4%
<i>Psychodopygus</i>	<i>carreirai</i>	14	1,1%	3	0,2%	17	1,3%
<i>Psychodopygus</i>	<i>chagasi</i>	-	0,0%	13	1,0%	13	1,0%
<i>Psychodopygus</i>	<i>série chagasi</i>	24	1,9%	2	0,2%	26	2,1%
<i>Psychodopygus</i>	<i>claustrai</i>	6	0,5%	15	1,2%	21	1,7%
<i>Psychodopygus</i>	<i>davisi</i>	194	15,3%	34	2,7%	228	18,0%
<i>Psychodopygus</i>	<i>llanosmartinsi</i>	21	1,7%	3	0,2%	24	1,9%
<i>Psychodopygus</i>	<i>paraensis</i>	38	3,0%	12	0,9%	50	3,9%
<i>Trichophoromyia</i>	<i>flochi</i>	-	0,0%	56	4,4%	56	4,4%
<i>Trichophoromyia</i>	<i>ubiquitalis</i>	69	5,4%	166	13,1%	235	18,5%
<i>Viannamyia</i>	<i>furcata</i>	3	0,2%	-	0,0%	3	0,2%
<i>Viannamyia</i>	<i>tuberculata</i>	4	0,3%	-	0,0%	4	0,3%
<i>Micropygomyia</i>	<i>pilosa</i>	3	0,2%	-	0,0%	3	0,2%
-	sp*	73	5,8%	46	3,6%	119	9,4%
Sem identificação		5	0,4%	21	1,7%	26	2,1%
TOTAL		819	64,6%	448	35,4%	1267	100,0%

- sp* - Indivíduos identificados somente ao nível de gênero.

A espécie *Th. ubiquitous* correspondeu a um total de 235 (18,5%) espécimes coletados, foi a mais abundante, seguida de *Ps. davis*, que totalizou 228 (18%) e *Ny. antunesi* com um total de 135 (10,7%). As espécies identificadas somente ao nível de gênero corresponderam a 119 (9,4%) e a soma de todas as outras espécies foi de 550 (43,4%) exemplares coletados (FIGURA 15).

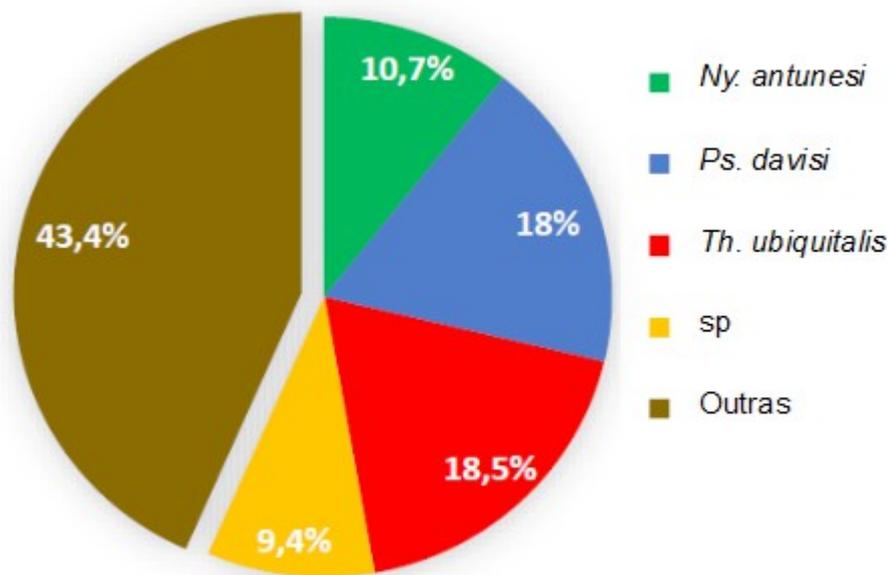


FIGURA 15: Percentagem das espécies mais abundantes e total da soma das espécies menos abundantes coletadas na Aldeia Castanheira, TI Caititú, Lábrea, estado do Amazonas, no período de 17 a 24 de fevereiro de 2012.

6.2 ESTUDO DE INFECÇÃO NATURAL EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NA ALDEIA CASTANHEIRA, MUNICÍPIO DE LÁBREA

6.2.1 DETECÇÃO DE *LEISHMANIA*

Um total de 559 (68%) exemplares fêmeas, distribuídos em 82 *pools* de flebotomíneos, foi utilizado para a detecção molecular de *Leishmania* utilizando os alvos *ITS1*, *SSUrRNA* e *Hsp70*.

Todas as amostras utilizadas para o estudo de infecção foram testadas para os três alvos, contudo só foi constada a amplificação nas reações para o alvo *ITS1*,

sendo considerada como negativa todas as reações para os outros alvos, *SSUrRNA* e *Hsp70*, pois não houve amplificação. Deste modo, um total de 14 (17%) *pools* foram positivos (TABELA 6), porém estes resultados não foram considerados satisfatórios uma vez que a intensidade do sinal das bandas foi fraco (FIGURAS 16, 17 e 18). Estes *pools* pertencem a 7 espécies: *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis*, *Ny. yuilli yuilli*, *Ps. ayrozai*, *Sc. servulolimai*, *Th. ubiquitous* e *Ps. davis*.

Um total de 68 (83%) *pools* (TABELA 7) foi negativo para a presença de DNA de *Leishmania*, os quais foram distribuídos em 64 *pools* de flebotomíneos identificados ao nível de espécies (16 espécies) e quatro *pools* de exemplares classificados somente ao nível de gênero porque as estruturas de importância taxonômica foram perdidas durante a captura e/ou clarificação e/ou montagem dos exemplares.

TABELA 6: Total de *pools* positivos para detecção de *Leishmania* utilizando o alvo *ITS1*, por ponto de coleta e espécie.

Espécie	Ponto(s)	Pool	flebs/pool
<i>Ev. apurinan</i>	6	PL52	4
<i>Ny. antunesi</i>	1,3,4	PL9	10
<i>Ny. antunesi</i>	2	PL15	9
<i>Ny. antunesi</i>	5	PL36	9
<i>Ny. antunesi</i>	6	PL46	10
<i>Ny. antunesi</i>	8,9	PL74	7
<i>Ny. umbratilis</i>	6	PL55	4
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	6	PL56	4
<i>Ps. ayrozai</i>	5	PL33	7
<i>Ps. ayrozai</i>	6	PL48	10
<i>Ps. davis</i>	7	PL67	10
<i>Sc. servulolimai</i>	2	PL11	10
<i>Th. ubiquitous</i>	5	PL35	4
<i>Th. ubiquitous</i>	6	PL51	5



FIGURA 16: Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo *ITS1*. Três *pools* de fêmeas apresentaram banda: PL35 - *Th. ubiquitousis*, PL46 - *Ny. antunesi*, PL48 - *Ps. ayrozai*. PM – Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, La (+) - controle positivo de *Leishmania amazonensis*, Lb (+) - controle positivo de *L. braziliensis*.

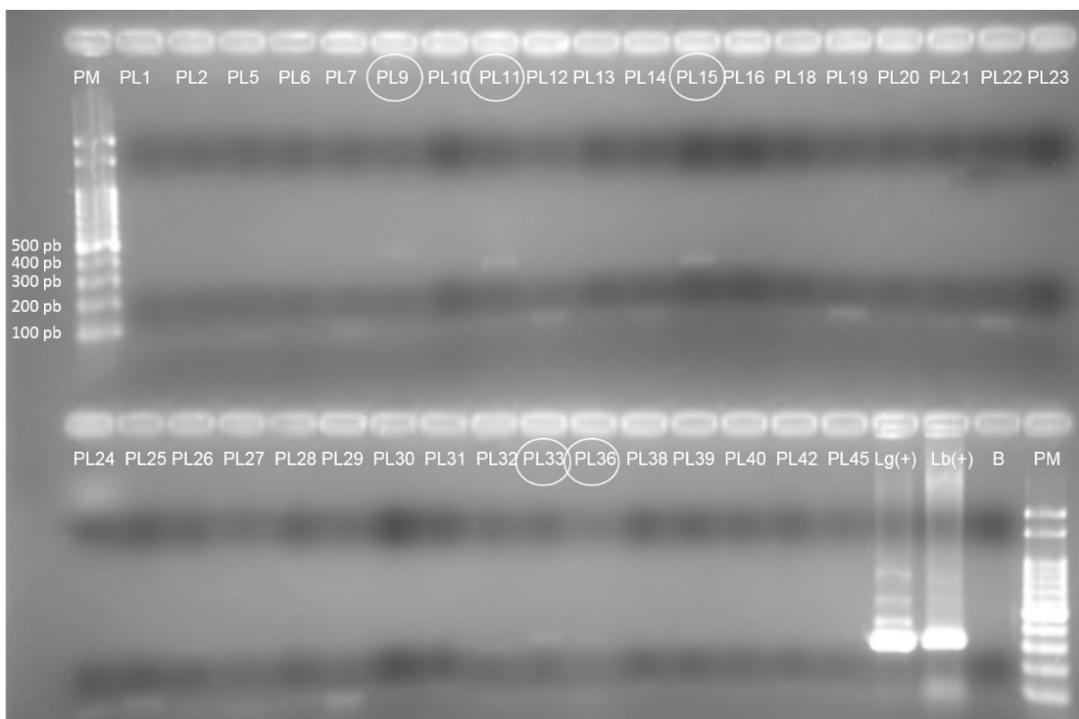


FIGURA 17: Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo *ITS1*. Cinco *pools* de fêmeas apresentaram banda: PL9 - *Ny. antunesi*, PL11 - *Sc. servulolimai*, PL15 - *Ny. antunesi*, PL33 - *Ps. ayrozai*, PL36 - *Ny. antunesi*, PM - Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, La (+) - controle positivo de *Leishmania amazonensis*, Lb (+) - controle positivo de *L. braziliensis*.

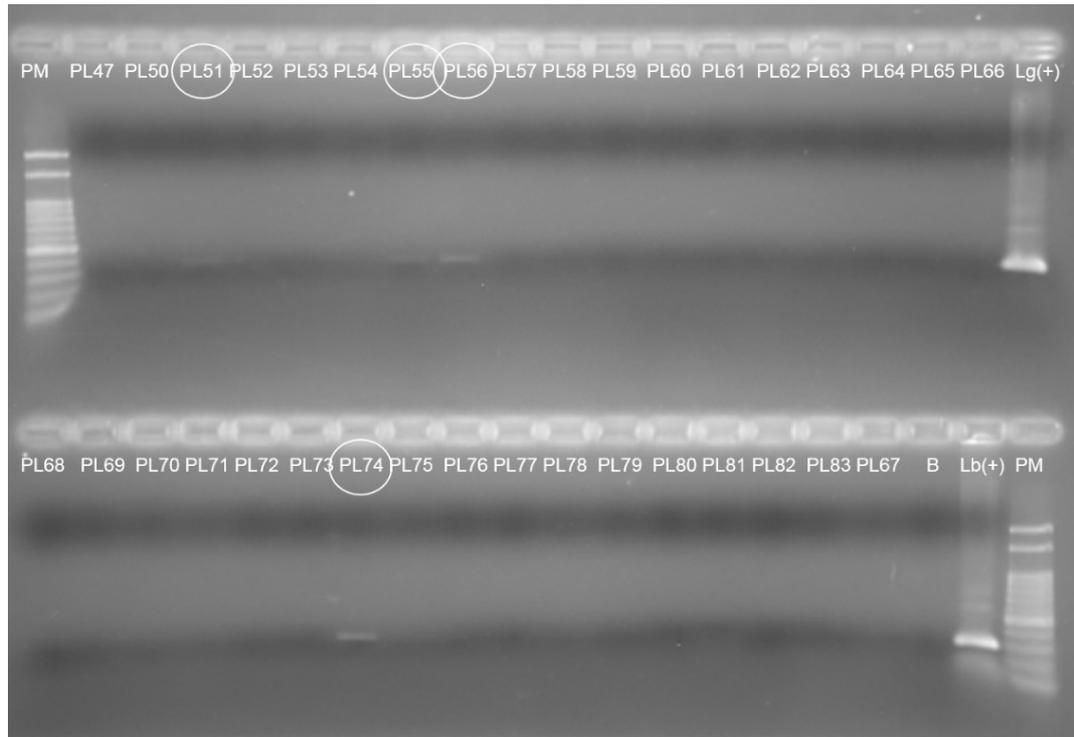


FIGURA 18: Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo ITS1. Cinco pools de fêmeas apresentaram banda: PL51 - *Th. ubiquitalis*, PL55 - *Ny. umbratilis*, PL56 - *Ny. yuilli yuilli*, PL74 - *Ny. antunesi*, PL67 - *Ps. davisi*. PM - Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, Lb(+)- controle positivo de *L. braziliensis*.

TABELA 7: Total de pools negativos para detecção de *Leishmania* utilizando o alvo *ITS1*, por ponto de coleta e espécie.

Espécie	Ponto(s)	Pool	Flebs/Pool
<i>Bi. flaviscutellata</i>	8,9	PL75	4
<i>Ev. apurinan</i>	2	PL14	3
<i>Ev. apurinan</i>	6	PL52	4
<i>Ev. begonae</i>	2	PL18	10
<i>Ev. begonae</i>	2	PL19	4
<i>Ev. begonae</i>	2	PL24	6
<i>Ev. begonae</i>	6	PL59	3
<i>Ev. begonae</i>	7	PL70	3
<i>Ev. saulensis</i>	8	PL73	5
<i>Lu. sherlocki</i>	3,4	PL1	3
<i>Lu. sherlocki</i>	2	PL21	3
<i>Ny. antunesi</i>	4	PL10	2
<i>Ny. antunesi</i>	5	PL37	4
<i>Ny. antunesi</i>	6	PL47	9
<i>Ny. antunesi</i>	7	PL60	10
<i>Ny. antunesi</i>	7	PL61	10

<i>Ny. antunesi</i>	7	PL62	10
<i>Ny. antunesi</i>	7	PL63	6
<i>Ny. antunesi</i>	10	PL79	4
<i>Ny. umbratilis</i>	1,3,4	PL3	8
<i>Ny. umbratilis</i>	2	PL16	4
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	2	PL83	5
<i>Ps. ayrozai</i>	2	PL20	2
<i>Ps. ayrozai</i>	6	PL49	3
<i>Ps. ayrozai</i>	7	PL68	7
<i>Ps. carreirai</i>	5	PL38	6
<i>Ps. carreirai</i>	7	PL69	4
<i>Ps. davisii</i>	1,3	PL7	10
<i>Ps. davisii</i>	4	PL8	4
<i>Ps. davisii</i>	2	PL23	1
<i>Ps. davisii</i>	5	PL25	10
<i>Ps. davisii</i>	5	PL26	10
<i>Ps. davisii</i>	5	PL27	10
<i>Ps. davisii</i>	5	PL28	10
<i>Ps. davisii</i>	5	PL29	10
<i>Ps. davisii</i>	5	PL30	10
<i>Ps. davisii</i>	5	PL31	10
<i>Ps. davisii</i>	5	PL32	4
<i>Ps. davisii</i>	5	PL34	5
<i>Ps. davisii</i>	6	PL53	10
<i>Ps. davisii</i>	6	PL54	5
<i>Ps. davisii</i>	7	PL64	10
<i>Ps. davisii</i>	7	PL65	10
<i>Ps. davisii</i>	7	PL66	10
<i>Ps. davisii</i>	8,9	PL71	10
<i>Ps. llanosmartinsi</i>	5	PL40	10
<i>Ps. paraensis</i>	1,4	PL2	3
<i>Ps. paraensis</i>	2	PL22	3
<i>Ps. paraensis</i>	6	PL41	10
<i>Ps. paraensis</i>	6	PL42	10
<i>Ps. chagasi</i>	5	PL39	10
<i>Psathyromyia</i> sp.	6	PL43	2
<i>Psathyromyia</i> sp.	6	PL44	5
<i>Psathyromyia</i> sp.	6	PL45	6
<i>Sc. servulolimai</i>	2	PL12	9
<i>Sc. sordelli</i>	1,4	PL5	9
<i>Sc. sordelli</i>	4	PL6	2
<i>Sc. sordelli</i>	6	PL57	10
<i>Sc. sordelli</i>	6	PL58	4
<i>Sc. sordelli</i>	2	PL80	9

<i>Sc. sordelli</i>	2	PL81	10
<i>Sc. sordelli</i>	2	PL82	7
<i>Th. ubiquitous</i>	3,4	PL4	7
<i>Th. ubiquitous</i>	2	PL13	2
<i>Th. ubiquitous</i>	6	PL50	10
<i>Th. ubiquitous</i>	8,9	PL72	6
<i>Th. ubiquitous</i>	10	PL76	10
<i>Th. ubiquitous</i>	10	PL77	7
<i>Trichophoromyia</i> sp.	10	PL78	8

Ao final das reações de amplificação para o alvo *ITS1*, as bandas consideradas positivas foram retiradas do gel de agarose e purificadas. Este procedimento só pôde ser realizado em um total de sete amostras, pois estas apresentaram uma intensidade no sinal da banda suficiente para que fossem retiradas de forma precisa e sem contaminação de uma amostra para outra.

Após a purificação dos sete produtos mencionados, uma re-amplificação do alvo *ITS1* foi realizada, seguindo as mesmas condições de volumes, concentrações, temperatura e tempo, da reação anterior. Este procedimento resultou em sete produtos de PCR, com intensidade satisfatória das bandas específicas (FIGURA 19). Sete (8,5%) *pools* de flebotomíneos foram utilizados e considerados positivos para a presença de *Leishmania*, sendo estes distribuídos em seis espécies: *Sc. servulolimai*, *Th. ubiquitous*, *Ev. apurinan*, *Ny. umbratilis*, *Ny. yuilli yuilli*, *Ps. Davisi*.

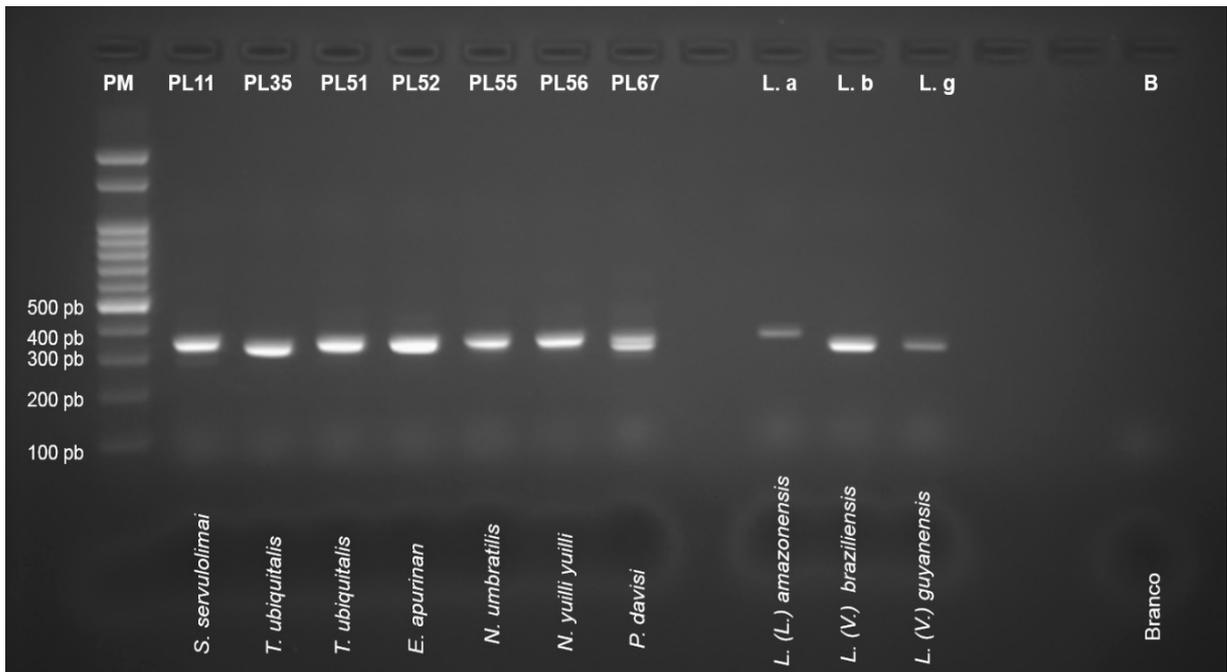


FIGURA 19: Reamplificação de bandas purificadas. Confirmação em gel de agarose [1,5%] para a amplificação do alvo *ITS1*. Sete pools de fêmeas apresentaram banda: PL11 - *Sc. servulolimai*, PL35 - *Th. ubiquitous*, PL51 - *Th. ubiquitous*, PL52 - *Ev. apurinan*, PL55 - *Ny. umbratilis*, PL56 - *Ny. yuilli yuilli*, PL67 - *Ps. davisii*, PM - Marcador de tamanho molecular, B - branco da reação, e controles positivos L.a - *L. amazonensis*, L.b - *L. braziliensis* e L.g - *L. guyanensis*.

6.3 IDENTIFICAÇÃO DE *LEISHMANIA*

6.3.1 ABORDAGEM PCR-RFLP

A reação de RFLP foi utilizada para a identificação das espécies de *Leishmania* detectadas pela amplificação do alvo *ITS1*, sendo assim uma abordagem PCR-RFLP. A digestão foi realizada com todas as sete amostras consideradas positivas para a amplificação do alvo *ITS1*, além dos quatro controles que foram utilizados nesta digestão: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis*.

A digestão resultou em perfis que não demonstraram claramente quais as espécies de *Leishmania* foram detectadas, sendo assim não foram considerados

dados satisfatórios optando-se pelo sequenciamento de todas as amostras. Os perfis de restrição obtidos apresentaram indícios de coinfeção entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* nas amostras PL11, PL51, PL55, PL56, PL67, e ainda indícios de infecção por *L. amazonensis* na amostra PL52, além *L. infantum* na amostra PL35 (FIGURA 20).

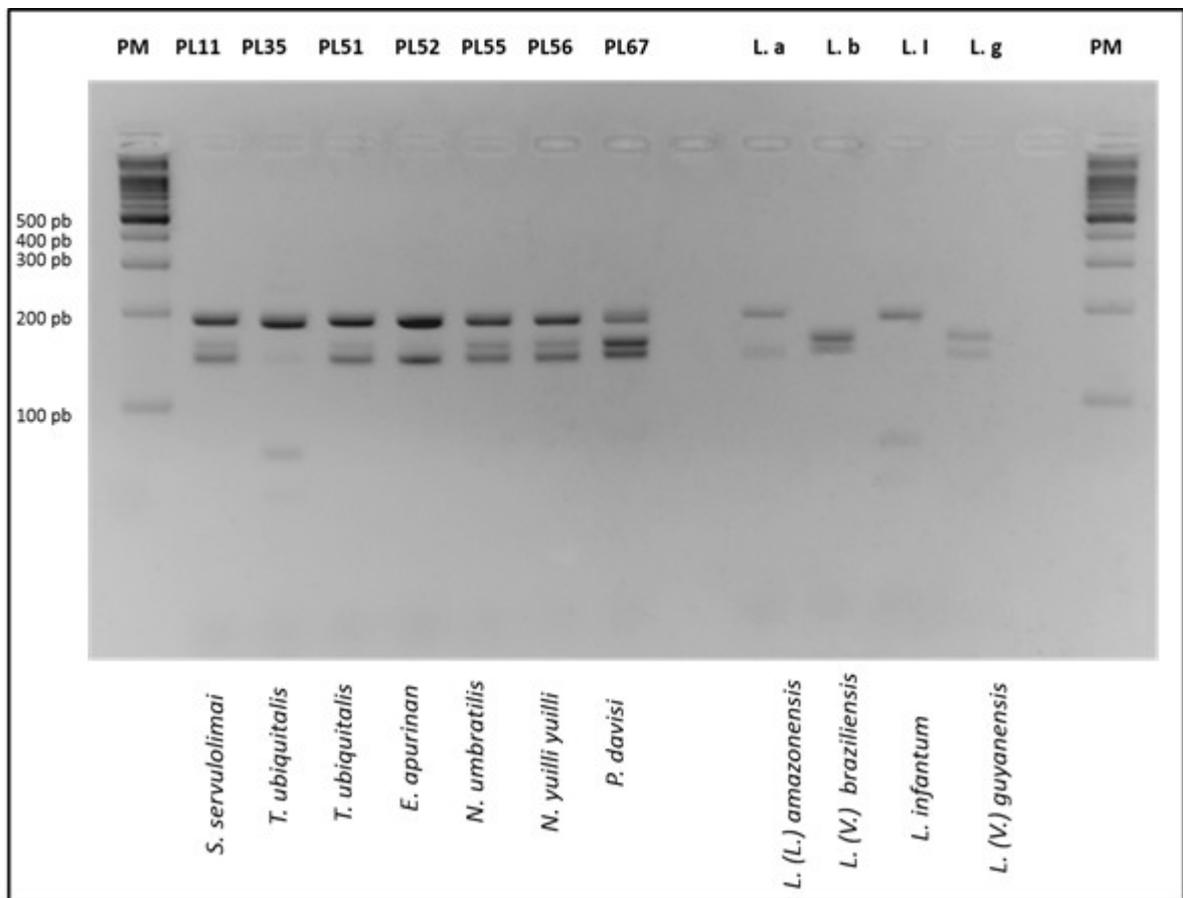


FIGURA 20: Reação de RFLP. Visualização em gel de agarose [4%] da digestão do produto amplificado do alvo *ITS1*. Sete pools de fêmeas: PL11 - *Sc. servulolimai*, PL35 - *Th. ubiquitous*, PL51 - *Th. ubiquitous*, PL52 - *Ev. apurinan*, PL55 - *Ny. umbratilis*, PL56 - *Ny. yuilli yuilli*, PL67 - *Ps. davis*, PM - pe Marcador de tamanho so molecular, controles L.a - *L. amazonensis* L.b - *L. braziliensis*, L.I - *L. infantum* e L.g - *L. guyanensis*.

6.3.2 ABORDAGEM PCR-SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

A abordagem PCR-sequenciamento genético foi utilizada para a identificação das espécies de *Leishmania* detectadas pela amplificação do alvo *ITS1* nas fêmeas coletadas na Aldeia Castanheira. Os sete *pools* considerados positivos para o alvo *ITS1* foram submetidos ao sequenciamento genético. Com esta abordagem foi possível identificar as espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e uma amostra identificada somente ao nível de subgênero *Leishmania (Viannia)* sp. Com estes resultados foi possível estimar uma taxa de infecção natural (baseado na presença de DNA de *Leishmania*) de 0,84%. As espécies de flebotomíneos relacionadas às espécies de *Leishmania* são apresentadas detalhadamente na TABELA 8.

TABELA 8: Total de amostras positivas por espécie de *Leishmania* identificada e espécie de Flebotomíneo coletado na Aldeia Castanheira, Lábrea, estado do Amazonas, no período de 17 a 24 de fevereiro de 2012.

Espécies	Amostras positivas		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia)</i> sp.
<i>Ev. apurinan</i>	-	1	-
<i>Ny. umbratilis</i>	1	-	-
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	1	-	-
<i>Ps. davis</i>	-	1	-
<i>Sc. servulolimai</i>	1	-	-
<i>Th. ubiquitous</i>	1	-	-
<i>Th. ubiquitous</i>	-	-	1
TOTAL	4	2	1

6.4 ESTUDO DE FONTE ALIMENTAR EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NA ALDEIA CASTANHEIRA, LÁBREA, ESTADO DO AMAZONAS

6.4.1 CITOCROMO B (CYTb)

O estudo de fonte alimentar foi realizado em um total de 48 fêmeas de flebotomíneos consideradas ingurgitadas. Um total de 38 indivíduos foi identificado em nível de espécie e 10 identificados somente em nível de gênero (TABELA 9). Exemplos de todos os dias de coleta foram utilizados nessa análise de fonte alimentar, porém todas as amostras processadas apresentaram um resultado considerado negativo para amplificação do fragmento alvo. Portanto não se obteve resposta quanto a fonte alimentar dos insetos coletados.

TABELA 9: Total de indivíduos fêmeas, por espécie coletadas na Aldeia Castanheira, Terra Indígena Caititu, Lábrea, estado do Amazonas incluindo total de indivíduos identificados somente em nível de gênero, que foram utilizados no estudo de fonte alimentar.

Espécie	TOTAL
<i>Ev. apurinan</i>	4
<i>Ev. begonae</i>	1
<i>Lu. sherlocki</i>	1
<i>Ny. antunesi</i>	10
<i>Ny. umbratilis</i>	1
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	1
<i>Nyssomyia</i> sp.	1
<i>Ps. ayrozai</i>	3
<i>Ps. carreirai</i>	1
<i>Ps. davisii</i>	6
<i>Ps. paraensis</i>	4
<i>Psathyromyia</i> sp.	3
<i>Psychodopygus</i> sp.	4
<i>Sc. servulolimai</i>	1
<i>Sc. sordelli</i>	1
<i>Th. ubiquitous</i>	1
<i>Trichophoromyia</i> sp.	2
<i>Vi. furcata</i>	2
<i>Vi. tuberculata</i>	1

7. DISCUSSÃO

7.1 FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADA

Neste trabalho foram encontradas 32 espécies de flebotomíneos no município de Lábrea, que representam aproximadamente 24% das 133 espécies conhecidas para o estado do Amazonas, 6,4% das espécies conhecidas nas Américas e 3,4% do total de todas as espécies de flebotomíneos conhecidas na atualidade (GALATI, 2003, SHIMABUKURO & GALATI, 2010, FIGUEIRA *et al.* 2013).

Os estudos de flebotomíneos realizados no estado do Amazonas ajudam a conhecer a fauna e a biologia destes insetos, incluindo as espécies de importância médica presentes na região (CASTELLÓN *et al.*, 2000; ALENCAR, 2007; BARBOSA *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo fornecem dados úteis para o conhecimento sobre a composição da fauna flebotomínica do sul do estado do Amazonas.

Os estudos sobre a fauna de flebotomíneos do estado do Amazonas estão concentrados na cidade de Manaus e municípios relativamente próximos à capital do estado. São registros para região mais ao norte e a leste do estado (FIGURA 20), o que demonstra uma escassez de investigações sobre a fauna flebotomínica ao sul do estado. Todas as subtribos encontradas no presente trabalho já foram registradas no estado do Amazonas (ARIAS & FREITAS, 1977; ARIAS & FREITAS, 1978; BARRETT *et al.*, 1996; CASTELLÓN *et al.* 2000; DIAS LIMA *et al.* 2002; FEITOSA & CASTELLÓN 2006; SILVA *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.* 2008; ALVES *et al.*, 2012) entretanto a subtribo *Brumptomyia*, também já registrada no estado, não foi encontrada no presente estudo.

Um total de 10 gêneros foi encontrado neste trabalho: *Bichromomyia*,

Evandromyia, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Nyssomyia*, *Psathyromyia*, *Psychodopygus*, *Sciopemyia*, *Trichophoromyia* e *Viannamyia*, não havendo registro novo para o estado do Amazonas.

Observou-se uma semelhança entre os resultados obtidos no presente trabalho, em relação aos gêneros mais abundantes registrados que foram *Psychodopygus*, seguido de *Trichophoromyia* e *Nyssomyia*, com outros resultados já publicados para o norte do estado do Amazonas, como nos municípios de Borba e Maués, onde foi encontrado *Trichophoromyia* como o gênero mais abundante (ALVES *et al.*, 2012), em Itacoatiara *Nyssomyia* (PESSOA *et al.*, 2007) em Manacapuru *Nyssomyia* (SILVA *et al.*, 2007), na cidade de Manaus *Nyssomyia* foi mais abundante em vários estudos (ARIAS *et al.*, 1978; DIAS LIMA *et al.*, 2002; FEITOSA & CASTELLÓN, 2004; FEITOSA & CASTELLÓN, 2006; GUERRA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2008), em Tefé *Trichophoromyia* e *Nyssomyia* (BARRETT *et al.*, 1996). No município de Coari o gênero *Psychodopygus* foi o mais abundante (CASTELLÓN *et al.*, 2000), já para o sul do estado, no município de Lábrea o gênero *Nyssomyia* foi reportado como o mais abundante (FIGUEIRA *et al.*, 2013).

No presente trabalho observou-se uma fauna flebotomínica bastante diversificada, mas sem registro novo para o estado ou para o Brasil (ARIAS & FREITAS, 1977; ARIAS & FREITAS, 1978; CASTELLÓN *et al.*, 2000; GUERRA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2012; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

As espécies mais abundantes foram *Th. ubiquitalis* (235; 18,5%), *Ps. davisi* (228; 18%) e *Ny. antunesi* (135; 10,7%).

Em um levantamento sobre a fauna de flebotomíneos coletados em áreas preservadas de floresta de terra-firme em municípios do Amazonas, Borba, Maués e

Nhamundá, a espécie *Th. ubiquitalis* foi a mais abundante nos municípios de Borba e Maués, e *Ps. davisii* foi a quarta espécies de maior abundância coletada no município de Nhamundá, já *Ny. antunesi* estava entre as espécies com menor abundância (ALVES *et al.*, 2012). A diferença entre a abundância de *Ny. antunesi* encontrada entre o presente trabalho e o de Alves *et al.* (2012), pode estar relacionada a maior capacidade de adaptação desta espécie a áreas mais abertas, uma vez que a dispersão de espécies de flebotomíneos pode estar relacionada a fatores como a busca por abrigos seguros, ou fonte de alimentação, além da resposta a estímulos luminosos (GALATI *et al.*, 2009). A aldeia Castanheira, apresenta pasto com gado para pecuária, áreas destinadas a agricultura (roçados), animais domésticos (cães, gatos, porcos, galinhas), além do uso de lampião e lanternas como fontes luminosas pelos indígenas.

Um levantamento entomológico foi realizado recentemente no município de Lábrea utilizando armadilhas luminosas um total de 510 flebotomíneos foi coletado e 26 espécies foram identificadas (FIGUEIRA *et al.*, 2013). Ainda foram apresentados seis espécies e um subgênero que não foram encontrados no presente estudo: *Bichromomyia olmeca bicolor*, *Evandromyia sipani*, *Micropygomyia rorotaensis*, *Pintomyia christenseni*, *Pressatia trispinosa*, *Psathyromyia campbelli* e *Psathyromyia (Forattiniella) sp.*, estas espécies foram coletadas principalmente em um assentamento rural no eixo da Rodovia Transamazônica e na periferia da área urbana de Lábrea, ambientes mais degradados que podem estar influenciando os padrões de diversidade e abundância das espécies. Mesmo com uma única área amostrada, o presente estudo obteve uma maior riqueza de espécies, foram 32 espécies encontradas em relação às 26 identificadas anteriormente no município por

Figueira *et al.* (2013). A abundância para as espécies mais coletadas também foi diferente, sendo que apenas *Ny. antunesi* foi abundante em ambos os estudos. As espécies *Ev. walkeri* e *Mi. rorotaensis* foram mais abundantes no estudo de Figueira *et al.* (2013), enquanto que *Th. ubiquitalis* e *Ps. davisii* foram mais abundantes na Aldeia Castanheira.

O baixo número de exemplares de *Ny. umbratilis* encontrados em Lábrea contrasta com os resultados encontrados nas cidades de Manaus e Itacoatiara, onde a fauna flebotomínica foi predominantemente composta por *Ny. umbratilis*, além disso, as espécies mais abundantes encontradas no presente estudo, *Th. ubiquitalis*, *Ps. davisii* e *Ny. antunesi* foram encontradas em menor abundância nestes municípios (FEITOSA & CASTELLÓN, 2004, FEITOSA & CASTELLÓN, 2006; GUERRA *et al.*, 2006; PESSOA *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2008). O tipo de ambiente estudado pode estar relacionado à diferença entre as faunas flebotomínicas encontradas (READY *et al.*, 1986), já que os trabalhos realizados ao norte do rio Amazonas foram conduzidos em áreas urbanizadas de diferentes pontos da cidade de Manaus, e em uma área de extração de madeira no município de Itacoatiara, ao contrário da área amostrada pelo presente estudo, que se localiza ao sul do rio Amazonas e apresenta diferenças quanto ao uso do solo e da paisagem.

Um estudo realizado em área preservada de campina, na Reserva Biológica da Campina, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, localizada a 45 Km da cidade de Manaus, cuja vegetação é de baixo porte e aberta apresentou resultados diferentes quanto a abundância das espécies encontradas, onde *Bi. flaviscutellata* e *Ev. georgii* foram as mais abundantes (SILVA *et al.*, 2010). Mais uma vez o tipo de ambiente pode estar relacionado à diferença entre as faunas flebotomínicas

encontradas em cada local.

Há ainda registros das espécies mais abundantes encontradas neste trabalho para outros estados da região Norte. Em Benevides e Utinga, estado do Pará, *Th. ubiquitous* também foi a espécie mais abundante em um estudo sobre infecção natural em flebotomíneos (SILVEIRA *et al.*, 1991).

Trichophoromyia ubiquitous foi a segunda espécie mais abundante em um estudo de flebotomíneos realizado na Serra dos Carajás, estado do Pará (LAINSON *et al.*, 1992) e a quarta espécie mais abundante, em um estudo de fauna e infecção natural em flebotomíneos coletados no município de Porto Grande, estado do Amapá (FREITAS *et al.*, 2002). Para o estado do Acre, nos municípios de Bujari, Xapuri e Rio Branco, *Ny. antunesi* foi a segunda espécie mais abundante encontrada (AZEVEDO *et al.*, 2008).

No estado de Rondônia a espécie *Ps. davisii* foi a mais abundante coletada em uma investigação sobre a fauna flebotomínica e a importância desta espécie como vetora de *L. (Viannia) naiffii* (GIL *et al.*, 2003). Em outro estudo também realizado no estado de Rondônia, em oito municípios, Porto Velho, Nova Mamoré, Monte Negro, Vale do Anari, Nova União, Costa Marques, Espigão do Oeste e Vilhena, mais uma vez a espécie *Ps. davisii* foi a mais abundante coletada (GIL *et al.*, 2009).

7.2 INFECÇÃO NATURAL EM FLEBOTOMÍNEOS DE LÁBREA

O estudo sobre infecção natural em flebotomíneos são indispensáveis para o esclarecimento da epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no estado

do Amazonas. Contudo existem poucos estudos publicados independente da metodologia utilizada (ARIAS & FREITAS, 1978; ARIAS & NAIFF, 1981; ARIAS *et al.*, 1987; PINHEIRO *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2010), seja esta uma abordagem mais clássica, quando há uma busca ativa, isolamento e identificação do parasito, ou uma abordagem molecular, a qual busca a detecção e identificação do DNA do parasito presente na amostra analisada.

A maioria das investigações realizadas no estado do Amazonas e que apresentam algum registro de *Leishmania* geralmente são provenientes de amostras clínicas de pacientes que receberam atendimento médico (ROMERO *et al.*, 2002; GUERRA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FIGUEIRA *et al.*, 2008; BENÍCIO *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2011) ou de estudos com mamíferos reservatórios (ARIAS & NAIFF, 1981; ARIAS *et al.*, 1987; GUERRA *et al.*, 2007). Poucas são as investigações sobre infecção por *Leishmania* em flebotomíneos (ARIAS *et al.*, 1987; GUERRA *et al.*, 2006).

Observou-se a presença de espécies já conhecidas e incriminadas como vetores ou vetores suspeitos de *Leishmania*, o que chama atenção para o risco de infecção na área estudada, uma vez que a coleta foi realizada dentro da Aldeia Castanheira, município de Lábrea, estado do Amazonas, onde há circulação de pessoas em contato direto com estes insetos.

A espécie mais abundante coletada neste trabalho foi a *Th. ubiquitalis*, que já foi registrada nos estados do Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima, e é relacionada a transmissão de *L. (V.) lainsoni*. Não exerce uma alta atividade antropofílica, o que não a impede em ocasiões especiais sob

fatores determinantes exercer este tipo de atividade (SILVEIRA *et al.*, 1991; LAINSON *et al.*, 1992; RANGEL & LAINSON, 2003).

A espécie *Bi. flaviscutellata* que possui uma ampla distribuição no Brasil, presente na região Norte, parte do Nordeste, Centro-oeste e Sudeste, foi registrada neste trabalho com sete (0,6%) indivíduos. Esta espécie é conhecida por sua atração por roedores e está intimamente relacionada à transmissão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (SHAW & LAINSON, 1968; ARIAS *et al.*, 1985; ARIAS & FREITAS, 1987; RANGEL & LAINSON, 2003).

As espécies *Ny. umbratilis* e *Ny. anduzei* totalizaram 26 (2,1%) e 2 (0,15%) indivíduos coletados respectivamente, e estão associadas a transmissão de *L. (Viannia) guyanensis*. Estas espécies são bastante conhecidas por sua alta densidade nos troncos das árvores e por sua alta atividade antropofílica. *Nyssomyia umbratilis* já foi registrado nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhã, Mato Grosso, Pará e Rondônia e é considerada como o mais importante vetor de *L. (V.) guyanensis*, já a espécie *Ny. anduzei* é conhecida por desempenhar um papel secundário na transmissão deste mesmo parasito ao norte do rio Amazonas (LAINSON *et al.*, 1976; ARIAS & FREITAS, 1977; ARIAS & FREITAS, 1978; ARIAS *et al.*, 1985; READY *et al.*, 1986; LAINSON *et al.*, 1994; CASTELLÓN, 1994; DIAS LIMA, 2002; RANGEL & LAINSON, 2003).

Conhecida por ser altamente antropofílica e por estar associada a transmissão de *L. (V.) naiffi*, a espécie *Ps. ayrozai* também foi coletada, com um total de 56 (4,4%) indivíduos. Esta já foi encontrada infectada e picando humano no estado de Rondônia além de ter sido registrada anteriormente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (AGUIAR & SOUCASAUX, 1984; RANGEL *et al.*,

1985; RANGEL & LAINSON, 2003).

Outra espécie vetora coletada em área foi *Ps. davisii*, com um total de 228 (18%) que por sua vez é incriminada à transmissão de *L. (V.) naiffi* (GIL *et al.*, 2003). A espécie *Ps. paraensis* com 50 (3,9%) espécimes coletados também está associada a transmissão de *L. (V.) naiffi*, e já foi registrada nos estados de Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima (SILVEIRA *et al.*, 1991; ARIAS *et al.*, 1985; RANGEL & LAINSON, 2003).

A espécie *Ny. antunesi* já foi registrada nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso. Foi uma das espécies mais abundantes no presente trabalho e é conhecida por exercer um comportamento bastante antropofílico e por ser vetor suspeito de *L. (V.) lindenbergi*. (RYAN *et al.*, 1984; ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2007; VÁSQUEZ-TRUJILLO *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2011; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

A espécie *Ny. yuilli yuilli* foi registrada entre as espécies de menor abundância para o presente trabalho, totalizando 27 (2,1%) espécimes coletados. É conhecida por exercer um comportamento antropofílico e por ser incriminada como vetor de *L. (V.) panamensis* no Peru (SANTAMARÍA *et al.*, 2006). Já foi registrada nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Mato Grosso e Rondônia (ARIAS *et al.*, 1985; VEXENAT *et al.*, 1986; AZEVEDO *et al.*, 1993; BARRETO, *et al.*, 2000; DIAS LIMA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2010; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

Este trabalho se propôs a realizar a detecção e identificação de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos coletados no município de Lábrea, e estimar a taxa de

infecção utilizando a fórmula: taxa mínima (TM) = número de grupos positivos x 100/número total de insetos (PAIVA *et al.*, 2007).

No presente estudo um total de sete *pools* de flebotomíneos foi considerado positivo para a presença de DNA de *Leishmania*, e a taxa de infecção mínima estimada foi de 0,84%. Do total de seis espécies testadas cinco obtiveram taxa de infecção mínima igual a 0,12%, sendo estas *Ev. apurinan*, *Ny. umbratilis*, *Ny. yuilli yuilli*, *Ps. davis* e *Sc. servulolimai*. A espécie *Th. ubiquilalis* apresentou uma taxa de infecção maior que as outras espécies testadas com um valor de 0,24%. Este é o primeiro registro da presença de DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* na espécie *Evandromyia apurinan*.

A espécie *Sc. servulolimai* já foi encontrada infectada com parasitos do gênero *Trypanosoma* em seu todo digestivo, no estado de Roraima em um estudo que investigou as relações filogenéticas entre tripanossomas de anuros e de flebotomíneos, e que sugeriu que esta espécie se alimenta em animais de sangue frio ao invés de animais de sangue quente (FERREIRA *et al.*, 2008).

Os resultados de taxa de infecção natural encontrados no presente trabalho são semelhantes aos achados de um estudo recentemente realizado em dois pontos da cidade de Manaus utilizando um abordagem molecular para detectar a presença de DNA de *Leishmania*, no qual foram registradas taxas de infecção de 0,4% e 1,6%, dados referentes a espécie *Nyssomyia umbratilis* (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Para a região Norte, nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia, um estudo de infecção natural em flebotomíneos, realizando dissecação do tubo digestivo e busca ativa do parasito, registrou taxas de infecção natural que foram de 13,4% para flebotomíneos não identificados ao nível de espécie do gênero *Psathyromyia*

sp.; 7,5% para o gênero *Nyssomyia* sp.; 6,7% para *Lutzomyia (Tricholateralis)* sp.; 0,5% para *Psychodopygus* sp. (ARIAS *et al.*, 1985).

Com os dados disponíveis na literatura, é possível observar uma variação nas taxas de infecção natural registradas para flebotomíneos. Esta variação pode ocorrer de acordo com o tipo de investigação realizada, sobretudo pelo método aplicado para a detecção de *Leishmania* que pode apresentar uma maior ou menor sensibilidade influenciando no resultado final obtido.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem se tornando uma ferramenta importantíssima e cada vez mais presente nos trabalhos de detecção de *Leishmania* (PEREZ *et al.*, 1994; MIRANDA *et al.*, 2002; JORQUERA *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2010; MICHALSKY *et al.*, 2011; TELES *et al.*, 2013). Para este trabalho a reação em cadeia da polimerase também foi utilizada para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneos, para tal, três alvos foram testados, *ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1)*, *SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA)* e o *Hsp70 (heat shock protein 70)*. Somente foi constatada a amplificação para o alvo *ITS1*.

A aplicação do alvo *ITS1* para a detecção e identificação de *Leishmania* já foi registrada em trabalhos publicados, os quais obtiveram sucesso com amplificação deste alvo em amostras clínicas (SCHONIAN *et al.*, 2003; ROTUREAU *et al.*, 2006; GRAÇA *et al.*, 2012; LEELAYOOVA *et al.*, 2013). O mesmo alvo, foi utilizado em um estudo de detecção de DNA de leishmânia em flebotomíneos coletados no estado de Minas Gerais, onde *Psychodopygus lloydi* foi encontrado positivo para DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (QUARESMA *et al.*, 2012).

A região *ITS1* apresenta uma variação em sequências nucleotídicas e em tamanho entre as espécies de *Leishmania* e com uma única digestão pela enzima

de restrição *HaeIII* é possível realizar identificação em nível de espécie (DAVILA & MOMEN, 2002; SCHONIAN *et al.*, 2003). Contudo, os resultados do presente trabalho não condizem com esses achados visto que os perfis obtidos pela *RFLP* não foram capazes de distinguir entre duas espécies de *Leishmania* identificadas pelo sequenciamento genético.

Não houve amplificação para o alvo *SSUrRNA*, de acordo com resultados já descritos, este seria mais sensível para a detecção de *Leishmania*, do que o alvo *ITS1* (SCHONIAN *et al.*, 2003), já que existe em um maior número de cópias no genoma da *Leishmania*. Há trabalhos publicados, que apresentaram uma sensibilidade satisfatória para o alvo e a partir de lesões de pacientes foi possível realizar a detecção do parasito e identificação das mesmas como *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, um fato esperado devido à maior quantidade de DNA de *Leishmania* presente em amostras clínicas (FALQUETO *et al.*, 2003; BACA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2011; LEELAYOOVA *et al.*, 2013). Também há relato de estudo de infecção natural em flebotomíneos que obteve sucesso com a amplificação dirigida ao alvo *SSU rRNA*, o qual foi capaz de detectar e identificar *Leishmania infantum* em flebotomíneos coletados na Catalunha, nordeste da Espanha (ALCOVER *et al.*, 2012).

A amplificação do alvo *Hsp70* não foi constatada neste trabalho, contudo há registros de estudos de infecção natural em flebotomíneos coletados no estado de Minas Gerais, onde foi encontrado *Psychodopygus lloydi* infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (QUARESMA *et al.*, 2012). No Perú, o DNA de *Leishmania (Viannia) peruviana*, foi detectado em amostras de *Lutzomyia peruensis*, utilizando o alvo *Hsp70* (PEREZ *et al.*, 2007). Há também estudos que apresentaram resultados

positivos para análises de amostras clínicas, porém esta sensibilidade já era esperada para tais amostras (GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2007; SILVA et al., 2010; GRAÇA et al., 2012; LEELAYOOVA et al., 2013).

Com a abordagem PCR-sequenciamento genético, utilizando do alvo *ITS1* nas amostras provenientes do município de Lábrea, foi possível identificar duas espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Somente em uma das sete amostras positivas para DNA de *Leishmania* a identificação só foi possível até o nível de subgênero sendo esta *Leishmania (Viannia)* sp. As duas espécies encontradas nesta investigação já foram registradas no estado do Amazonas.

A espécie *L. amazonensis* já foi encontrada na cidade de Manaus, isolada das espécies *Bichromomyia flaviscutellata* e *B. olmeca nociva* (ARIAS et al., 1987), além de ter sido registradas a partir de amostras provenientes de lesões de pacientes que receberam atendimento (COELHO et al., 2011) e mamíferos reservatórios como *Didelphis marsupialis*, *Marmosa cinerea*, *Proechimys guianensis*, *Dasyprocta aguti*, *Tupinambis nigropunctatus*, na cidade de Manaus e também para os estados do Amapá, Pará e Rondônia (ARIAS & NAIFF et al., 1981; GRIMALDI et al., 1991).

A espécie *L. (V.) braziliensis* também já foi encontrada na cidade de Manaus em estudo de infecção natural em flebotomíneos (ARIAS & FREITAS, 1978) e em lesões de pacientes (ROMERO et al., 2002; GUERRA et al., 2011; COELHO et al., 2011; CHRUSCIK-TALHARI et al., 2011; NEVES et al., 2011; BENÍCIO et al., 2011). Também são registradas para os municípios de Benjamim Constant, Coari, Eirunepé, Humaitá, Itacoatiara, Lábrea, Manacapuru, Nhamundá, Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga, Tapauá e Tefé (GUERRA et al., 2011). Esta também foi encontrada infectando *Psathyromyia squamiventris* e *Ps. carrerai* em um estudo que

abrangeu os estados do Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia (GRIMALDI *et al.*, 1991).

Para o subgênero *Viannia* as espécies como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, e *L. (V.) naiffi* já foram registradas no estado do Amazonas em vários trabalhos que vão desde estudos de infecção em flebotomíneos, estudo em mamíferos reservatórios e estudo em lesões de pacientes que receberam algum tratamento médico (ARIAS & FREITAS, 1978; ARIAS & NAIFF, 1981; GRIMALDI *et al.*, 1991; ROMERO *et al.*, 2002; FIGUEIRA *et al.*, 2008; GUERRA *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2011; CHRUSCIK-TALHARI *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011; BENÍCIO *et al.*, 2011).

7.3 ESTUDO DE FONTE ALIMENTAR EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NO MUNICÍPIO DE LÁBREA ESTADO DO AMAZONAS

Este trabalho também se propôs a realizar um estudo de fonte alimentar em flebotomíneos coletados no município de Lábrea. Para tal, as amostras de fêmeas consideradas ingurgitadas foram submetidas a extração de DNA e amplificação por reação em cadeia da polimerase dirigida ao alvo *CYTb*. Um total de 48 fêmeas foram submetidas a esta análise, contudo não foi constatada a amplificação em nenhuma das amostras.

É possível encontrar na literatura registros de resultados bem sucedidos quando a identificação de repasto sanguíneo em mosquitos, utilizando a amplificação do alvo *CYTb* (TOWNZEN *et al.*, 2008). Há também registro de sucesso no estado de Minas Gerais, onde um estudo de fonte alimentar foi realizado em flebotomíneos. Esta investigação encontrou perfis de *CYTb* para humano, ave e

perfis mistos de roedor/marsupial, humano/galinha, roedor/marsupial/humano (QUARESMA et al., 2012).

Ainda há outros registros bem sucedidos para o estudo de fonte alimentar utilizando o alvo *CYTb* em flebotomíneos, os quais apresentam achados paras as espécies *Phlebotomus papatasi* coletados em Israel (ABBASI et al., 2009), *Ph. argentipes* coletados na Índia (GARLAPATI et al., 2012), *Ph. Alexandri*, *Sergentomyia clydei*, *Se. dubia*, *Se. ghesquierei*, coletados no Paquistão (TIWANANTHAGORN et al., 2012).

Todas as fêmeas utilizadas nesta análise foram consideradas ingurgitadas, porém foi observado um grau avançado no estágio de digestão de acordo com o trabalho de Dolmatova & Demina (1971) que descreve os estágios de digestão do alimento sanguíneo em flebotomíneos (FIGURA 21). Além disso, a sensibilidade do alvo *CYTb* já foi testada em relação ao tempo de digestão do alimento sanguíneo no tubo digestivo do flebotomíneo em um trabalho publicado anteriormente, o qual apresentou que há uma diminuição inversamente proporcional quanto a sensibilidade do alvo *CYTb*, visto que quanto maior o tempo de digestão, menor a sensibilidade (ABBASI et al., 2009).

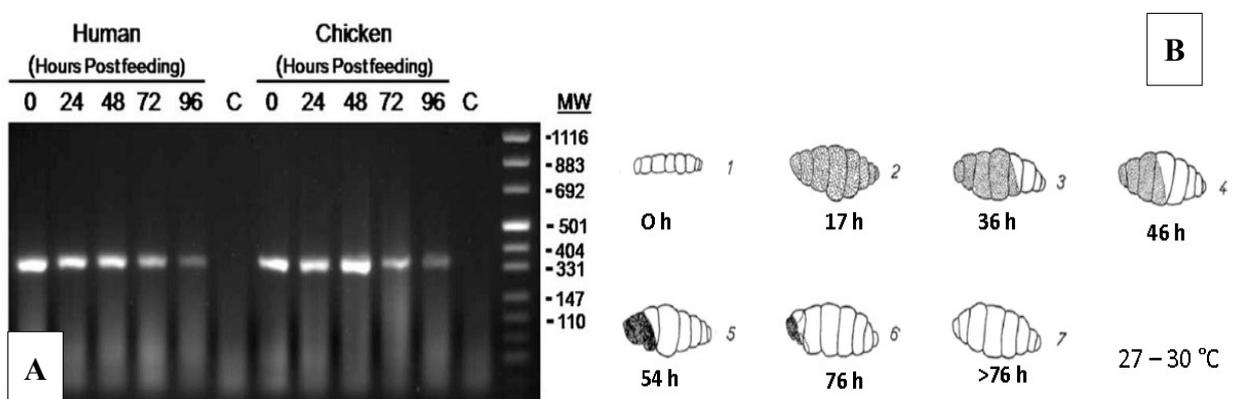


FIGURA 21: A – PCR direcionada ao alvo *CITb*. B – Estágios de digestão do alimento sanguíneo em fêmeas adultas de flebotomíneos.

FONTE: Adaptado de: ABBASI et al. (2009), DOLMATOVA & DEMINA, 1971.

Com estes achados na literatura é possível especular que a sensibilidade do alvo foi comprometida, uma vez que o alimento sanguíneo presente no tubo digestivo das fêmeas testadas estava em estágio avançado de digestão (quanto maior o estágio de digestão do alimento, menor a sensibilidade do alvo). Havendo pouco material a ser analisado a reação de extração de DNA poderia não ter extraído uma quantidade suficiente de DNA para que pudesse ser detectado no experimento, resultando assim em amostras negativas.

8. CONCLUSÃO

- A coleta realizada na Aldeia Castanheira, Terra Indígena Caitiú, município de Lábrea, estado do Amazonas, apresentou um total de 1267 flebotomíneos, distribuídos em três subtribos, 10 gêneros e 32 espécies identificadas. Apesar do pouco tempo de esforço amostral uma fauna flebotomínica bastante diversificada foi encontrada, corroborando com registros feitos por outros trabalhos;
- A detecção de leishmânias em seis espécies de flebotomíneos e o registro de espécies vetoras confirmadas e suspeitas na transmissão de LTA, sugere o risco de infecção na área estudada;
- Para este trabalho o alvo *ITS1* se mostrou mais sensível para a detecção do parasito e uma ferramenta satisfatória quando utilizada em abordagens de identificação de *Leishmania*;
- A identificação das espécies de *Leishmania* detectadas só foi possível pela abordagem PCR-sequenciamento, uma vez que a outra abordagem utilizada,

PCR-RFLP, não apresentou resultados satisfatórios;

- A detecção de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, e uma amostra identificada somente ao nível de subgênero *Leishmania (Viannia)* sp. sugere a circulação do parasito na área de estudo;
- A infecção por *Leishmania* detectada nas espécies vetoras encontradas neste trabalho, é um indício da participação das mesmas no ciclo de transmissão de LTA na Aldeia Castanheira, TI Caititú, Lábrea, AM.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, I.; CUNIO, R.; WARBURG, A. **Identification of blood meals imbibed by Phlebotominae sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting.** Vector-Borne and Zoonotic Diseases, v. 9, n.1, 2009.

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. *In Flebotomíneos do Brasil* (E.F. Rangel & R. Lainson, eds.). Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p.207-255, 2003.

AGUIAR, G. M.; SOUCASAUX, T. **Aspectos da ecologia dos flebotomos do parque nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I – Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae).** Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p.197-209, 1984.

ALCOVER, M. M. *et al.* **Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis.** Parasitology Research, v. 111, n. 2, p. 515-23, 2012.

ALENCAR, R. B. **Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: Uso de um modelo modificado de armadilha de emergência.** Acta Amazonica, v. 37, n. 2, p. 287 – 292, 2007.

ALENCAR, R. B.; QUEIROZ, R. G., BARRETT, T. V. **Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil.** *Acta Tropica*, v. 118, p. 204–208, 2011.

ALVES, V. R. *et al.* **Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil.** *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, V. 106, n. 3, p. 353-359, 2011.

ALVES, V. R. *et al.* **Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Central Amazonia and four new records for the Amazonas state, Brazil.** *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 56, n. 2, p. 220–227, 2012.

ANDRADE, R. V. *et al.* **The use of polymerase chain reaction to confirm diagnosis in skin biopsies consistent with American tegumentary leishmaniasis at histopathology: a study of 90 cases.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 5, p. 892-6, 2011.

ANDRADE, R. V. *et al.* **The use of polymerase chain reaction to confirm diagnosis in skin biopsies consistent with American tegumentary leishmaniasis at histopathology: a study of 90 cases.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 5, p. 892-6, 2011.

ARAGÃO, H. B. **Transmissão de leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*.** *Brasília Médica*, v. 36, p. 129–130, 1922.

ARAÚJO-FILHO, N. A. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande.** 1979. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. **On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the central amazona of Brazil. 4. Sand fly emergence from a “terra firme” forest floor.** *Acta Amazonica*. V. 12, n. 3, p. 609-611, 1982.

ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. **The known geographical distribution of sand flies in state of Acre, Brasil (Diptera: Psychodidae).** *Acta Amazonica*, v. 12, n. 2, p. 401-408, 1992.

ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. **Flebótomos da Amazônia central do Brasil I.**

Resultados obtidos das capturas feitas com isca humana e equina (Diptera: Psychodidae). Acta Amazonica, v. 12, p. 599-608, 1977.

ARIAS, J. R. *et al.* **Observation on the parasite *Leishmania mexicana amazonensis* and its natural infection of the sandfly *Lutzomyia olmeca nociva*.** PAHO Bulletin, v. 21, n. 1, p. 48-54, 1987.

ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. **Sobre os vetores de leishmaniose cutânea da Amazônia central do Brasil. 2: incidência de flagelados em flebótomos selváticos.** Acta Amazonica, v. 8, n. 3, p. 387-396, 1978.

ARIAS, J. R. *et al.* **Falagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation *in vitro* and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 34, p. 1096-1108, 1985.

ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D. **The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, central Amazon of Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 76, n. 3, p. 279-286, 1981.

AZEVEDO, A. C. R. *et al.* **Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103(8): 760-767, 2008.

AZEVEDO, A. C. R.; LUZ, S. L. B.; VILELA, M. L.; RANGEL, E. F. **Studies on the sandfly of Samuel ecological station, Porto Velho municipality, Rondônia state, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 88, n. 4, p. 509-512, 1993.

BACA, H. A. *et al.* ***Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 105, p. 173-178, 2011.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. **Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans.** Ed. Elsevier, 2007.

BARBOSA, M. G. V. **Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus,**

Estado do Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, n. 5, p. 485-491, 2008.

BARRETO, M.; BURBANO, M. E.; BARRETO, P. ***Lutzomyia* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from Middle and Lower Putumayo Department, Colombia, with New Records to the Country.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 5, p. 633-639, 2000.

BARRETT, T. V. *et al.* **Report on a Collection of *Lutzomyia* Sand Flies (Diptera:Psychodidae) from the Middle Solimões (Amazonas, Brazil).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 91, n.1, p. 27-35, 1996.

BATES, P. A. **Transmission of *Leishmania metacyclic* promastigotes by phlebotomine sand flies.** International Journal for Parasitology, v. 37, p. 1097–1106, 2007.

BENÍCIO, E. A. *et al.* **Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 86, n. 6, p. 1141-4, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana, diagnóstico clínico diferencial.** Brasília/DF, 1ª edição, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Leishmaniose Tegumentar Americana.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560 > Data de acesso: Janeiro de 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília/DF, 2ª edição, 2007.

BRAZIL, R. P.; BRASIL, B. G. **Biologia de Flebotomíneos Neotropicais.** In Rangel E F, Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 257-274, 2003.

CABANILLAS, M. R. S.; CASTELLÓN, E. G. **Distribution of Sandflies (Diptera:Psychodidae) on tree-trunks in a Non-flooded Area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, n. 3, p. 289-296, 1999.

CAÑETE, V. R.; SOUZA, N. R; SOUZA, C. L. **Ainda fronteira: comunidades, instituições e recursos naturais na bacia do rio purus**. 26ª Reunião Brasileira de Antropologia. 2008.

CASTELLÓN, E. C. *et al.* **Os flebotomíneos da região amazônica, estrada Manaus – Humaita, estado do Amazonas, Brasil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**. Acta Amazonica, v. 24, n. 1/2, p. 91-102, 1994.

CASTELLÓN, E. G.; FÉ, N. F.; BUHRNHEIM, P. F.; FÉ, F. A. **Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na Amazônia. II. Listagem das espécies coletadas na bacia petrolífera no Rio Urucu, Amazonas, Brasil, utilizando diferentes armadilhas e iscas**. Revista Brasileira de Zoologia, v. 17, n. 2, p. 455-462, 2000.

CHRUSCIAK-TALHARI, A *et al.* **Case Report: Tegumentary Leishmaniasis as the Cause of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in a Patient Co-infected with Human Immunodeficiency Virus and Leishmania guyanensis**. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, n. 4, p. 559–564, 2009.

COELHO, L. I. C. *et al.* **Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil**. Parasitology Research, v. 108, p. 671–677, 2011.

CRUZ, I. *et al.* **A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immuno-deficiency virus**. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 2002.

CRUZ, I. *et al.* **A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in co-infected patients with human immunodeficiency virus**. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, v. 96, p. 185-189, 2006.

DAVILA, A. M.; MOMEN, H. **Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships with in *Leishmania***. Annals of Tropical Medicine of Parasitology, v. 94, p. 651–654, 2002.

DEPAQUIT, J. *et al.* **ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica***. International Journal for Parasitology. p.

1123–1131, 2002.

DIAS-LIMA, A. G.; GUEDES, M. L. S.; SHERLOCK, I. A. **Horizontal Stratification of the Sand Fly Fauna (Diptera: Psychodidae) in a Transitional Vegetation between Caatinga and Tropical Rain Forest, State of Bahia, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 6, p. 733-737, 2003.

DIAS-LIMA, A. *et al.* **Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil.** Caderno de Saúde Pública, v. 18, n. 3, p. 823-832, 2002.

DOLMATOVA, A. V.; DEMINA, N. A. **Les Phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent.** 1971.

FACUNDES, S. S. **Morfemas “flutuantes” em Apurinã e a Tipologia dos Clíticos.** pp. 61-83, Primavera 2002.

FALQUETO, A. *et al.* **Epidemiological and Clinical Features of Leishmania (Viannia) braziliensis American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 8, p. 1003-1010, 2003.

FEITOSA, M. A. C.; CASTELLÓN, E. C. **Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal.** V. 34, n. 1, p. 121-127, 2004.

FEITOSA, M. A. C.; CASTELLÓN, E. C. **Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical.** v. 36, n. 4, p. 539- 548, 2006.

FERREIRA, R. C. *et al.* **A Phylogenetic lineage of closely related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia.** Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 55, p. 5, 427–435, 2008.

FIGUEIRA, E. A. G. *et al.* **Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from**

Lábrea, state of Amazonas, Brazil, with a description of *Evandromyia (Aldamyia) apurinan* Shimabukuro, Figueira & Silva, sp. nov. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, n. 2, p. 280-287, 2013.

FIGUEIRA, L. P. *et al.* **Caracterização isoenzimática de isolados humanos de Leishmaniasp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, n. 5, p. 512-514, 2008.

FONSECA, F. O. R.; BERMÚDEZ, E. G. C; DESMOULIÈRE, S. J. M. **DISTRIBUIÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDEA) NA AMAZÔNIA LEGAL ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE INFORMÁTICA E GEOPROCESSAMENTO.** Caminhos de geografia, v. 11, n. 36, p. 142-149, 2010.

FREITAS, R. A.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V. **Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 53-59, 2002.

Fundação de medicina tropical. **Casos Novos, Confirmados de Doenças de Notificação Compulsória e Outros Agravos registrados no ano 2012.** Disponível em: < http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vigiwebcons2.asp?tp_dado=3 > Acesso em: janeiro de 2013.

GALATI, E. A. B. *et al.* **Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 8, p. 1148-1158, 2009.

GALATI, E.A.B. **Classificação de Phlebotominae.** In **Flebotomíneos do Brasil** (E.F. Rangel & R. Lainson, eds.). Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-52, 2003.

GARCIA, A. L. *et al.* **Epidemiological monitoring of American tegumentar leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 101, p. 1208-1213, 2007.

GARCIA, L. *et al.* **Culture-Independent Species Typing of Neotropical Leishmania for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes.** Journal of clinical microbiology, v. 42, n. 5, p. 2294–2297, 2004.

GARLAPATI, R. B. *et al.* **Identification of Bloodmeals in Wild Caught Blood Fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using Cytochrome b PCR and Reverse Line Blotting in Bihar, India.** *Journal of Medical Entomology*, v. 49, n. 3, p. 515-521, 2012.

GENARO, O.; REIS, A. B. *Leishmaniose Tegumentar Americana.* In NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana.** 11 ed. São Paulo: Ateneu, 2005.

Gil, L. H. S. *et al.* **Recent Observations on the Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the Importance of *Psychodopygus davisi* as a Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 6, p. 751-755, 2003.

GRAÇA, G. C. *et al.* **Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 5, p. 664-674, 2012.

GRIMALDI, G. J. R. *et al.* **Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil.** *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 44, n. 6, p. 645-661, 1991.

GUERRA, J. A. O. *et al.* **Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil.** *Acta Amazonica*, v. 37, n. 1, p. 133-138, 2007.

GUERRA, J. A. O. *et al.* **Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 3, 2011.

GUERRA, J. A. O. *et al.* **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil.** *Caderno de Saúde Pública*, v. 22, n. 11, p. 2319-2327, 2006.

GUERRA, J. A. O. *et al.* **Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 5, p. 587-590, 2003.

HANSON, W. J. **The breeding places of Phlebotomus in Panama (Diptera: Psychodidae)**. Annals of The Entomological Society of America. v. 54, p. 317-322, 1961.

IBGE/CIDADES. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: dezembro de 2011.

JORQUERA, A. *et al.* **Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. 1, p. 45-48, 2005.

KAMHAWI, S. **Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?** Trends in Parasitology, v. 22, n. 9, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. **Phlebotominae vectors of the leishmaniasis: a review**. Medical and Veterinary Entomology, v. 4, p. 1-24, 1990.

KUMAR, S.; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. **Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences**. Brief Bioinformatics. V. 9, p. 299-306, 2008.

LAINSON, R. **Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, v. 321, p. 389-404, 1988.

LAINSON, R. *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, v. 67, p. 184-96. 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Leishmaniasis of the new world: taxonomic problems**. British Medical Bulletin, v. 28, n. 1, p. 44-48, 1972.

LAINSON, R. *et al.* **The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R. *et al.* **Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 87, n. 3, p. 437-439, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **Leishmaniasis in Brazil: 1. Observation on enzootic rodent leishmaniasis - incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 62, n. 3, p. 396-405, 1968.

LAINSON, R. *et al.* **Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*), observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 73, p. 239-242, 1979.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. **Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector.** Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, v. 70, n. 2, p. 171-172, 1976.

LAINSON, R. *et al.* **Preliminary entomological studies in Humboldt, Aripuanã, Mato Grosso State, Brazil.** Acta Amazonica, v. 6, n. 4, p. 55-60, 1976.

LEELAYOOVA, S. *et al.* **Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand.** BMC Microbiology, 2013.

LIMA, A. C. S. *et al.* ***Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years.** Parasitology Research, v. 108, p. 1525–1531, 2011.

LINS R. M. M. A, *et al.* **Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies.** Insect Molecular Biology, v. 11, p. 117-122, 2002.

MICHALICK, M. S. M.; **Gênero *Leishmania*.** In NEVES, D. P., *et al.* **Parasitologia humana.** 11 ed. São Paulo: Ateneu, p. 41-46, 2005.

MICHALSKY, E. M. *et al.* **Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, n. 1, p. 58-62, 2011.

MIRANDA, J. C *et al.* **Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with**

Leishmania braziliensis in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 2, p. 185-188, 2002.

NEVES, L. O. *et al.* **Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 86, n. 6, p. 1092-101, 2011.

PAIVA, B. R. *et al.* **Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase.** Cadernos de Saúde Pública, v. 23, n. 1, p. 87-94, 2007.

PEREZ, J. E. *et al.* **Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru.** Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, v. 88, p. 161-16, 1994.

PEREZ, J. E. *et al.* **Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera:Psychodidae) in the Peruvian Andes.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n. 6, p. 655-658, 2007.

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, v. 102, n. 5, p. 593-599, 2007.

Pessoa, S. B.; Coutinho, J. O. **Infecção natural e experimental dos flebótomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo.** Hospital, v. 20, p. 25-35, 1941.

PIMENTA, P. F. P., SECUNDINO, N. F. C., BLANCO, E. E. N. **Interação *Leishmani*-Hospedeiro Invertebrado.** In Rangel E F, Lainson R (orgs). **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, 2003.

PINHEIRO, F. G.; LUZ, S. L. B.; FRANCO, A. M. R. **Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil.** Acta Amazonica, v. 38, n. 1, p. 165-172, 2008.

PINHEIRO, F. G.; LUZ, S. L. B.; FRANCO, A. M. R. **Infecção natural em *Lutzomyia***

(*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Amazonas, Brasil. 2010. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

PINTO, I. S. *et al.* **Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in south-eastern Brazil.** *Journal of Vector Ecology*, v. 35, n. 2, p. 325-332, 2010.

PUGEDO, H. *et al.* **HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p. 70-72, 2005.

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

QUARESMA, P. F. *et al.* **Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; v. 105, n. 10, p. 579-585. 2011.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003.

RANGEL, E. F.; RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) Fauna of Além Paraíba, state of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsute*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, n. 3, p. 373-374, 1985.

READY, P. D. *et al.* **The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Frahia (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-easter Amazonia Brazil.** *Bulletin of Entomological Research*, v. 76, p. 21-40, 1986.

RIBEIRO, A. L. M.; MISSAWA, N. A.; ZEILHOFER, P. **Distribution of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of medical importance in Mato Grosso state, Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*, v. 49, n. 5, p. 317-321, 2007.

ROMERO, G. A. S. *et al.* **The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis.** *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 96, n. 2, 131-136, 2002.

ROTUREAU, B. *et al.* **Use of pcr-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples.** *Journal of clinical microbiology*, p. 459–467, 2006.

RYAN, L. *et al.* **Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil.** *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, v. 78, p. 547-548, 1984.

SANTAMARÍA, E. *et al.* **Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia.** *Biomédica*, v. 26, n. 1, p. 82-94, 2006.

SCHIEL, J. **Entre padrões e civilizadores: Os Apurinã e a política indigenista no médio rio Purús na primeira metade do século XX.** 2000. Dissertação (Mestrado em Antropologia) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

SCHONIAN, G. *et al.* **PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 47, p. 349 –358, 2003.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. **Leishmaniasis in Brazil II. Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the lower amazon region – The feeding habits of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals.** *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, v. 62, n. 3, p. 396-405, 1968.

SHERLOCK, I. A. A importância dos flebotomíneos. *In* Rangel E F, Lainson R (orgs). **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, 2003, p.15-22. 2003.

SHIMABUKURO, P.H.F. & GALATI, E.A.B. **Checklist of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from São Paulo State, Brazil, with notes on their geographical distribution.** *Biota Neotropica*, v. 11, n. 1. 2010.

SILVA, D. F.; FREITAS, R. A.; FRANCO, A. M. R. **Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM.** Neotropical Entomology, v. 36, n. 1, p. 138-144, 2007.

SILVA, L. A. *et al.* **Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil.** Infection, Genetics and Evolution, v. 10, p. 77-83, 2010.

SILVEIRA, F. T. *et al.* **Cutaneous leishmaniasis in the amazona region: Natural infection of sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 86, n. 1, p. 127-130, 1991.

SILVEIRA, F.T. *et al.* **An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region.** Parasitology, v. 85, p. 43-50, 2002.

SOARES, M. R. A. *et al.* **Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil.** Caderno de Saúde Pública, v. 26, n. 12, p. 2409-2413, 2010.

TEIXEIRA, A. C. *et al.* **Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 49, n. 4, p. 235-238, 2007.

TEIXEIRA, A. C. *et al.* **Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 50, n. 3, p. 157-160, 2008.

TELES, C. B. G. *et al.* **Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 46, n. 1, p. 60-66, 2013.

TIWANANTHAGORN, S. *et al.* **Zoophilic feeding behaviour of phlebotomine sand flies in the endemic areas of cutaneous leishmaniasis of Sindh Province, Pakistan.** Parasitological Research, v. 111, p. 125–133, 2012.

TOWNZEN, J. S.; BROWER, A. V. Z.; JUDD, D. D.; **Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences**. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 22, p. 386–393, 2008.

VAN EYS, G. J. *et al.* **Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 51, p. 133-142, 1992.

VÁSQUEZ-TRUJILLO, A. *et al.* ***Lutzomyia antunesi*, Probable Vector de Leishmaniasis Cutánea en el Área Rural de Villavicencio**. *Revista de Salud Pública*. v. 10, n. 4, p. 625-632, 2008.

VEXENAT, J. A. *et al.* **Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 3, p. 293-301, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical report series. **Control of leishmaniases**. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniases, Geneva, 2010.

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*, v. 54, 1994.

ZAPATA, S. *et al.* **A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador**. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 144, 2012.