CAROLINA BIONI GARCIA TELES

**LEISHMANIOSE EM ASSIS BRASIL COM ÊNFASE NA
FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS E AGENTES ETIOLÓGICOS
CIRCULANTES NA ÁREA DE FRONTEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

CAROLINA BIONI GARCIA TELES

**LEISHMANIOSE EM ASSIS BRASIL COM ÊNFASE NA FAUNA DE
FLEBOTOMÍNEOS E AGENTES ETIOLÓGICOS CIRCULANTES NA
ÁREA DE FRONTEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Dr. Luís Marcelo Aranha Camargo.

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Teles, Carolina Bioni Garcia.

Leishmaniose em Assis Brasil, AC, com ênfase na fauna de flebotomíneos e agentes etiológicos circulantes na área de fronteira / Carolina Bioni Garcia Teles. – São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha Camargo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia e controle de zoonoses parasitárias.

Versão do título para o inglês: Leishmaniasis in Assis Brasil, AC, with emphasis on sandfly fauna and etiological agents current in the border region.

1. Leishmaniose Tegumentar Americana 2. Díptera 3. Fauna 4. Epidemiologia 5. Reação em cadeia por polimerase 6. *Leishmania*
I. Camargo, Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB01/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Bioni Garcia Teles.

Título da Tese: Leishmaniose em Assis Brasil, AC, com ênfase na fauna de flebotomíneos e agentes etiológicos circulantes na área de fronteira.

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha Camargo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (11) 38130900 - telefax: (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbiedir@icb.usp.br

Decl. CEPIS. 082/2013

DECLARAÇÃO

Declaro que o relatório Final apresentado pelo pesquisador Prof. Dr. LUIZ MARCELO ARANHA CAMARGO e aluna CAROLINA BIONI GARCIA TELES, referente ao projeto, intitulado: *"Caracterização faunística de flebotomíneos etiologia e epidemiologia de leishmaniose tegumentar Americana em Assis-Brasil-Acre, Amazonia Ocidente"*, foi analisado e considerado satisfatório por esta Comissão, conforme prevê a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

São Paulo, 11 de novembro de 2013.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Dedico este trabalho àqueles que sempre foram o meu porto seguro, me ensinaram os valores da vida, me deram todas as oportunidades e educação de qualidade. Aos meus pais, Marcos e Nancy, que sempre acreditaram na minha capacidade. Vocês fazem parte desta caminhada que venho construindo. Serei uma eterna admiradora de vocês. Obrigada, AMO VOCÊS!

Ao meu marido Benedito Teles que faz parte do meu caminho e das minhas escolhas. A riqueza que construímos durante 15 anos juntos é com certeza o que me inspira no mundo da Ciência e da vida. Obrigada pelo cuidado comigo, pelo apoio e amor infinito, pelos preciosos conselhos e por compartilhar todos os momentos felizes e difíceis vividos ao longo desse tempo. O seu abraço nas horas mais difíceis foi primordial para a conclusão deste trabalho. Você me completa! Te amo!

Ao meu filho Pedro a luz da minha vida. Que me ensina a cada dia ser mãe. Não há palavra alguma que expresse meu amor por você. Eu te amo para sempre!

A Camila, que sempre foi companheira, me incentivou e depositou em mim confiança e cuidados dignos de uma irmã que foram absolutos e incondicionais.

A minha família Bioni que sempre torceu por mim e compreenderam a minha ausência. Muito obrigada por me esperarem em Bauru sempre com muito carinho e alegria. A vocês todo o meu amor.

A DEUS,

Obrigada por tudo que me concedeu e tem me concedido. Obrigada por me dar forças e iluminar o meu caminho. Nada do que faço ou aspiro tem sentido, senão, em sua plenitude divina.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Luís Marcelo Aranha Camargo pela confiança e oportunidade dada para a realização desse trabalho. Pela sua orientação e por proporcionar vivências que contribuíram de forma especial para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Jansen Medeiros sempre pronto a me ajudar, pelas valorosas sugestões e discussões, dedicação e carinho. Sua colaboração direta foi fundamental para a realização desse trabalho.

Ao Prof Dr. Odécio Cáceres pelo convívio sempre agradável, conselhos e por repassar as suas experiências laboratoriais para que as análises moleculares desta tese se iniciassem.

À Dra. Izaltina Silva-Jardim, pela amizade verdadeira, apoio e contínua orientação que contribui de forma especial para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Meu agradecimento especial a Paula Azevedo, hoje bióloga e bolsista da Fiocruz Rondônia, pelo apoio incondicional durante todas as etapas de execução desse trabalho, pela preocupação e excelentes momentos de descontração.

Aos queridos estagiários da Faculdade São Lucas Priscila, Franciene, Edson, Edicarlos, Paulo e Renê pela agradável convivência e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos entomólogos do INPA Rui Freitas, Felipe Pessoa, Arley Oliveira e Antônio Marques pela colaboração, dedicação e ensinamentos sobre flebotomíneos.

A enfermeira Dometila pelo apoio e por ter facilitado o estabelecimento da parceria com o ICB-5 e a Unidade de Saúde municipal de Assis Brasil.

À amiga, Maísa Araújo, pelo companheirismo, força e otimismo, além do apoio nas análises de biologia molecular.

Ao pesquisador Dr. Moreno Rodrigues pelo apoio da análise estatística dos resultados obtidos.

Ao pesquisador Tony Katsuragawa pela colaboração na elaboração dos mapas publicados nesse estudo.

Ao Dr. Luiz Antônio R. de Freitas e equipe do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ Bahia pela colaboração na análise histopatológica.

Ao Dr. Ricardo Godoi e Lilian Cantanhêde pela disposição do laboratório de Genética da Fiocruz Rondônia que foi imprescindível para finalizar o trabalho, Unidade em que tomei posse recentemente como pesquisadora em saúde pública.

A todos que de algum modo me incentivaram e contribuíram para realização desse trabalho.

A agência de fomento à pesquisa CNPq e FAPESP (proc. 2008/11319-0) pelos recursos financeiros proporcionados nos projetos envolvidos nesse estudo.

RESUMO

TELES, C. B. G. **Leishmaniose em Assis Brasil, AC, com ênfase na fauna de flebotomíneos e agentes etiológicos circulantes na área de fronteira.** 2015. 146 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) persiste de forma endêmica no Brasil, especialmente no Norte, com uma das maiores taxas de incidência da doença no país. O município de Assis Brasil situa-se na tríplice fronteira Brasil/ Peru/ Bolívia e constitui uma antiga área de transmissão de LTA no estado do Acre. O objetivo desse trabalho foi: identificar as espécies de flebotomíneos nessa região, estimar a taxa de infecção dos flebotomíneos, identificar os agentes etiológicos envolvidos na transmissão da LTA e descrever os aspectos epidemiológicos da LTA de pacientes atendidos pela equipe médica local no período de agosto de 2012 a dezembro de 2013. Foi realizada a reação em cadeia polimerase (PCR) para a identificação de espécies de *Leishmania* em amostras de flebotomíneos e biópsias humanas. Os flebotomíneos foram capturados entre agosto de 2009 a junho de 2010, com o uso de armadilhas luminosas do tipo CDC. As armadilhas foram fixadas em fragmentos de matas no ambiente rural e na mata ciliar da margem do rio Acre. Um total de 6.850 exemplares foram capturados pertencentes a 66 espécies de flebotomíneos, sendo três do gênero *Brumptomyia* e 63 do gênero *Lutzomyia*. Doze espécies incriminadas como vetores de LTA foram coletadas, e dessas *Lu. davisi*, *Lu. antunesi* e *Lu. whitmani* foram as mais abundantes. As espécies *Lu. auraensis*, *Lu. davisi*, *Lu. choti* e *Lu. shawi* representaram 71,8% do total. Nesse trabalho, 16 espécies foram registradas pela primeira vez no estado do Acre: *Lu. georgii*, *Lu. tarapacaensis*, *Lu. evangelistai*, *Lu. reducta*, *Lu. christensensi*, *Lu. bispinosa*, *Lu. yucumensis*, *Lu. complexa*, *Lu. melloi*, *Lu. abunaensis*, *Lu. brasiliensis*, *Lu. dreisbachi*, *Lu. andersoni*, *Lu. termitophila*, *Lu. williamsi* e *Lu. wilsoni*, e uma nova espécie foi descrita *Lu. naiffi* sp. nov. Um total de 368 pools de fêmeas de flebotomíneos foram analisados por PCR. Trinta e dois pools foram positivos para a presença de DNA de *Leishmania* (16 pools correspondem a *Lu. davisi* e 16 a *Lu. auraensis*), com uma prevalência mínima de infecção de 1,85% para *Lu. davisi* e de 2,05% para *Lu. auraensis*. As espécies de *Leishmania* detectadas foram: *Le. (Viannia) guyanensis* e *Le. (V.) braziliensis*; e outras amostras identificadas somente ao nível de complexo de *Le. braziliensis*. Foi caracterizado o perfil epidemiológico de 37 pacientes com leishmaniose cutânea. A doença foi encontrada em pacientes de idade entre 5 e 46 anos, foi mais prevalente no sexo masculino (81,6%) e residente na zona rural (75,7%). Quatro espécies de *Leishmania*, a partir das biópsias de lesões, foram identificadas: *Leishmania (V.) braziliensis* (65,6%), *Le. (V.) shawi* (28,2%), *Le. (V.) guyanensis* (3,1%), e uma infecção mista por *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (Le.) amazonensis* (3,1%). Esse é o primeiro registro de *Le. (V.) shawi* e *Le. (L.) amazonensis* no Acre. Assis Brasil apresenta diversos fatores que contribuem para o crescente índice de notificação de LTA na região. Ressalta-se a necessidade de intervenções na área de educação em Saúde para prevenir e minimizar a incidência da endemia no município.

Palavras-chave: Leishmaniose. Fauna de Flebotomíneos. Epidemiologia. Estado do Acre.

ABSTRACT

TELES, C. B. G. **Leishmaniasis in Assis Brasil, AC, with emphasis on sandfly fauna and etiological agents current in the border region.** 2015. 146 p. Ph. D. thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) persists endemically in Brazil, especially in the north, where incidences of the disease are among the highest in the country. The municipality of Assis Brasil is located in the Brazil-Peru-Bolívia tri-border region; historically, it constitutes an area of ATL transmission in Acre state. The objectives of this study were: to identify phlebotominae species in this area, to estimate infection rates of phlebotomines, to identify the etiological agents involved in ATL transmission, and to describe the epidemiological aspects of ATL among patients attended to by local health professionals between August 2012 and December 2013. Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify *Leishmania* species in phlebotomine and human biopsy samples. Phlebotomine sandflies were captured between August 2009 and June 2010, using CDC light traps. Traps were set in forest fragments near rural environments and in riparian vegetation along the Acre River. A total of 6,850 sandflies comprising 66 species were captured; three species were of the genus *Brumptomyia*, and 63 were of the genus *Lutzomyia*. Twelve sandfly species incriminated as vectors of ATL were captured, and of these *Lu. davisi*, *Lu. antunesi*, and *Lu. whitmani* were the most abundant. The species *Lu. auraensis*, *Lu. davisi*, *Lu. choti*, and *Lu. shawi* accounted for 71.8% of all sandflies collected. In this study, 16 species were found in the state of Acre for the first time: *Lu. georgii*, *Lu. tarapacaensis*, *Lu. evangelistai*, *Lu. reducta*, *Lu. christensensi*, *Lu. bispinosa*, *Lu. yucumensis*, *Lu. complexa*, *Lu. melloi*, *Lu. abunaensis*, *Lu. brasiliensis*, *Lu. dreisbachi*, *Lu. andersoni*, *Lu. termitophila*, *Lu. williamsi*, and *Lu. wilsoni*; and one previously undescribed species was found: *Lu. naiffi* sp. nov. In all, 368 pools of female sandflies were analyzed by PCR. Thirty-two pools tested positive for the presence of *Leishmania* DNA (16 pools corresponding to *Lu. davisi*, and 16 corresponding to *Lu. auraensis*), with a minimum infection rate of 1.85% in *Lu. davisi* and 2.05% in *Lu. auraensis*. The *Leishmania* species were identified as *Le. (Viannia) guyanensis* and *Le. (V.) braziliensis*; other samples was identified only at the complex level *Le. braziliensis*. An epidemiological profile was developed for 37 patients with cutaneous leishmaniasis. The disease was found in patients aged 5 to 46 years old, and it was most common among males (81.6%) and persons living in rural areas (75.7%). Four *Leishmania* species were identified from lesion biopsies: *Leishmania (V.) braziliensis* (65.6%), *Le. (V.) shawi* (28.2%), *Le. (V.) guyanensis* (3.1%), and one mixed infection by *Le. (V.) guyanensis* and *Le. (Le.) amazonensis* (3.1%). This is the first record of *Le. (V.) shawi* and *Le. (Le.) amazonensis* in Acre. Assis Brasil is subject to several factors that contribute to the increasing rate of ATL reported in the region. It is noteworthy that efforts to minimize the incidence of disease in the municipality have required interventions in the area of health education.

Keywords: Leishmaniasis. Phlebotomine fauna. Epidemiology. Acre state.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	26
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. no inseto vetor	26
Figura 3 – Diagrama da classificação das espécies de <i>Leishmania</i> , modificado por Lainson & Shaw, 1998	30
Figura 4 – Distribuição das principais espécies dermatrópicas de <i>Leishmania</i> sp. causadoras da doença humana no Brasil	30
Figura 5 – Esquema das sequências repetitivas espaçadoras do gene minixon de <i>Leishmania</i> spp.	38
Figura 6 – Mapa geográfico indicando os municípios do estado do Acre e cinco microrregiões	40
Figura 7 – Distribuição do coeficiente de detecção de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Assis Brasil e nas cinco microrregiões do estado do Acre, entre 2003 a 2010	40
Figura 8 – Distribuição anual dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Assis Brasil, AC, entre o período de 2007 a 2012	42
Figura 9 – Mapa dos locais com registro de infecção de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica municipal de Assis Brasil	43
Figura 10 – Estimador de intensidade Kernel com base na notificação de casos de LTA em Assis Brasil no período de 2010 a 2013	43
Figura 11 – Incidência de Leishmaniose cutânea e mucosa no Peru em 2012	45
Figura 12 – Incidência de LTA na Bolívia no período de 2006	46
Figura 13 – Distribuição geográfica das espécies de <i>Leishmania</i> do Peru	46
Figura 14 – Vista das áreas urbanas e rurais de Assis Brasil, Acre	52
Figura 15 – Rio Acre e estrada não pavimentada do município Assis Brasil, AC, no período de seca e chuva	53
Quadro 1 – Coordenadas dos pontos de capturas de flebotomíneos nos ambientes de ramal e mata ciliar no município de Assis Brasil, AC	54
Quadro 2 – Esforço amostral das coletas de flebotomíneos em Assis Brasil, AC	54

Figura 16 – Mapa do Brasil destacando o estado do Acre, localização da sede municipal de Assis Brasil e pontos de coletas de flebotomíneos	55
Figura 17 – Ambiente de captura no Ramal do Museu (ponto 4) com fragmentos florestais alterados em área do município Assis Brasil, no período de abril de 2010 e junho de 2010	56
Figura 18 – Ambientes de captura na mata ciliar do rio Acre, Assis Brasil, no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010	56
Quadro 3 – Descrição dos alvos moleculares utilizados para detecção de DNA de <i>Leishmania</i>	59
Figura 19 – Produtos amplificados de <i>hsp70</i> após digestão pelas enzimas <i>HaeIII</i> e <i>Bstul</i> de linhagens de referência cedidas pelo CLIOC isoladas de cultura	64
Figura 20 – Distribuição dos subgêneros e grupos do gênero <i>Lutzomyia</i> coletados no município de Assis Brasil – AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010	70
Figura 21 – <i>Lutzomyia naiffi</i> Freitas & Oliveira, 2013	77
Figura 22 – Curva de acumulação de espécies de flebotomíneos coletadas no município de Assis Brasil – AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010	78
Figura 23 – Índice de diversidade de Simpson dos flebotomíneos coletados em ambientes de ramal e mata ciliar do município de Assis Brasil – AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010	79
Figura 24 – Análise da composição de espécies de flebotomíneos indicada por NMDS nos dois ambientes de coletas (ramal e mata ciliar do rio Acre) no município de Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010	79
Figura 25 – Produtos de PCR <i>mkDNA</i> e PCR Multiplex resultantes dos <i>pools</i> de flebotomíneos	82
Figura 26 – Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais onde foram encontrados <i>pools</i> de flebotomíneos infectados por <i>Leishmania</i> spp. em Assis Brasil, Acre	83
Figura 27 – Produtos amplificados de <i>hsp70</i> (234pb) após digestão pelas enzimas <i>HaeIII</i> e <i>Bstul</i> em amostras de <i>pools</i> de flebotomíneos	84
Figura 28 – Produtos amplificados da PCR <i>hsp70</i> (234pb) após digestão pelas enzimas <i>HaeIII</i> e <i>Bstul</i> em amostras de pacientes com suspeita de LTA	85
Figura 29 – Distribuição da frequência dos casos de LTA em Assis Brasil, atendidos no período de julho de 2012 a março de 2014, conforme a idade dos pacientes	86

Figura 30 – Estimador de densidade de Kernel atribuídos a localidade dos casos de LTA desse estudo em Assis Brasil, AC	88

Figura 31 – Distribuição geográfica das espécies de <i>Leishmania</i> spp. identificadas através da PCR <i>hsp70</i> nos isolados de pacientes desse estudo atendidos em Assis Brasil, AC	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas de referência de <i>Leishmania</i> provenientes da CLIOC/FIOCRUZ utilizadas para controle de qualidade nesse estudo	58
Tabela 2 – Descrição da reação utilizada para a PCR <i>mkDNA</i>	60
Tabela 3 – Descrição da reação utilizada para a PCR Multiplex dirigida para gene RNA mini-exon SL de <i>Leishmania</i>	61
Tabela 4 – Descrição da reação utilizada para a PCR <i>hsp70</i> de <i>Leishmania</i>	62
Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010	71
Tabela 6 – Frequência dos flebotomíneos do gênero <i>Lutzomyia</i> incriminados na veiculação de <i>Leishmania</i> separados por ambiente, capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010	80
Tabela 7 – Distribuição dos <i>pools</i> de flebotomíneos positivos para PCR <i>mkDNA</i> de acordo com a espécie e ambiente de coleta, no município de Assis Brasil, AC	82
Tabela 8 – Taxa de infecção dos flebotomíneos por espécies de <i>Leishmania</i> e identificação dos parasitos através da PCR <i>hsp70</i>	84
Tabela 9 – Perfil epidemiológico de pacientes examinados em Assis Brasil, AC, com lesões cutâneas utilizadas para o estudo de diagnóstico histopatológico e por PCR de <i>Leishmania</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Acre

BstuI - *Bacillus stearothermophilus* UI

CDC – armadilha Center Disease Control

D – Diversidade de Simpson

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxirribonucleosídeo trifosfato

DO – densidade óptica

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

Hae III – *Haemophilus aegyptius* III

hsp 70 – proteína de choque térmico 70

ICB-5 – Instituto de Ciências Biomédicas 5

IOCL – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

kDNA – DNA extranuclear do cinetoplasto

LCA – Leishmaniose Cutânea Difusa

Le. – *Leishmania*

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu. – *Lutzomyia*

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

mkDNA – minicírculo do DNA do cinetoplasto

NMDS – Escalonamento multidimensional não paramétrico

pb – pares de bases

PBS – Salina tamponada com fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

RFLP – restrição de fragmento no comprimento do polimorfismo

rpm – rotações por minuto

SAC - curvas de acumulação de espécies

SINAN – Sistema de informações de agravos de notificação/ Secretária de Vigilância em Saúde

SL – gene *Spliced leader*

TBE – Tris-Borato-EDTA

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

IFN- γ – Interferon gama

U – unidade

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses	20
1.2 Flebotomíneos: Biologia e Taxonomia	22
1.3 Interação <i>Leishmania</i> -Hospedeiros	24
1.4 Principais espécies de flebotomíneos com competência vetorial	27
1.5 Caracterização Clínico-Epidemiológica da LTA	29
1.6 Epidemiologia molecular	35
1.7 LTA no Brasil, Acre e Assis Brasil e Tríplice Fronteira	38
1.8 Controle e Prevenção da LTA	47
2 OBJETIVOS	50
2.1 Geral	50
2.2 Específicos	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Área e população de estudo	51
3.2 Captura e identificação de flebotomíneos	53
3.3 Extração de DNA de fêmeas de flebotomíneos	57
3.4 Alvos moleculares para detecção de DNA de <i>Leishmania</i>	58
3.4.1 PCR dirigida para o gene <i>mkDNA</i>	59
3.4.2 PCR Multiplex dirigida para o Gene RNA mini-exon Spliced leader (SL) ...	60
3.4.3 PCR específica dirigida para a região <i>hsp70</i>	61
3.5 Eletroforese dos produtos de PCR	62
3.6 RFLP dos produtos da PCR da região <i>hsp70</i>	62
3.7 Reação de sequenciamento dos produtos da PCR <i>hsp70</i>	64
3.8 Pacientes	65
3.8.1 Biópsias e caracterização do parasito	65
3.9 Estimador de intensidade de Kernel	66
3.10 Análise de dados	67
4 RESULTADOS	69
4.1 Composição faunística de flebotomíneos	69
4.2 Infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	81

4.3 Caracterização de <i>Leishmania</i> spp. em pacientes	85
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	110
APÊNDICES	127
APÊNDICE A - TELES, C. B. G.; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; OGAWA, G. M.; CAVALCANTE, E. A.; MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A.; CAMARGO, L. M. A.. Description of a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) and new records of sand flies from the State of Acre, northern Brazil. Zootaxa (Online), v. 3609, p. 85-90, 2013.	128
APÊNDICE B – TELES, C. B. G.; MEDEIROS, J. F.; SANTOS, A. P. A.; FREITAS, L. A. R.; KATSURAGAWA, T. H.; CANTANHÊDE, L. M.; FERREIRA, R. G. M.; CAMARGO, L. M. A. Molecular Characterization Of American Cutaneous Leishmaniasis in the Tri-Border Area of Assis Brasil, Acre, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo . 2014. No prelo.	134
APÊNDICE C – TELES, C. B. G.; DOS SANTOS, A. P. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; CUNHA, P. N. A.; CAVALCANTE, E. A.; FREITAS, R. A.; OGAWA, G. M.; MEDEIROS, J. F.; CACERES, O.; CAMARGO, L. M. A.. Characterization of Phlebotomine Infection with the <i>Leishmania braziliensis</i> Complex using Multiplex PCR in a Brazilian High Endemic Area Assis Brasil, State of Acre, Western Amazon, Brazil. In: Fifth World Congress on Leishmaniasis. (Resumo). 2013, Porto de Galinhas, Brasil. p. 345.	135
APÊNDICE D – TELES, C. B. G.; DOS SANTOS, A. P. A.; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; OGAWA, G. M.; MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; CAMARGO, L. M. A.. Infecção Natural por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> em Flebotomíneos de Assis Brasil, Acre, Tríplice Fronteira do Brasil, Peru e Bolívia. In: 50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. (Resumo). 2014, Rio Branco, Acre, Brasil. p. 253.	136
ANEXOS	137
ANEXO A – Polígonos de caracterização da Reserva Extrativista de Chico Mendes (RESEX) e áreas vizinhas como Terras Indígenas e propriedades particulares distribuídas no Alto e Baixo Acre	138
ANEXO B – Ocupações rurais em Assis Brasil, Acre	139
ANEXO C – Distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos encontradas nesse estudo	140
ANEXO D – Quadro de espécies de flebotomíneos e autores responsáveis pela sua descrição	142
ANEXO E – Alinhamento múltiplo das sequências do gene <i>hsp70</i> (234pb) obtidas de flebotomíneos infectados por <i>Leishmania</i> com a sequência de referência do	

<i>GenBank</i>	143
ANEXO F – Alinhamento das sequências do gene <i>hsp70</i> (234pb) obtidas de biópsias humanas infectadas por <i>Leishmania</i> obtidos no estudo	144
ANEXO G – Alinhamento das sequências do gene <i>hsp70</i> (234pb) obtidas do paciente 32Hu infectados por <i>Le. (V.) guyanensis</i> e dos flebotomíneos infectados pela mesma espécie obtidos no estudo	145
ANEXO H – <i>Lutzomyia columbiana</i> (Ristorcelli & Van ty, 1941)	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses

As leishmanioses são doenças negligenciadas que ocorrem em várias regiões do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). O ciclo de transmissão da doença envolve mamíferos infectados e insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneos, da ordem Diptera e família Psychodidae. O parasitismo dessa doença é causado por protozoários heteroxenos da ordem Kinetoplastida, família Trypanossomatidae e gênero *Leishmania* (GALATI, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

No ciclo natural deste protozoário os animais silvestres como marsupiais (mucuras), edentados (tatus, preguiças e tamanduás), roedores (ratos e camundongos) são reconhecidos como reservatórios vertebrados. No entanto, grande parte das lesões nestes animais não é aparente. O homem e animais domésticos podem ser infectados secundariamente ao estabelecer contato com as áreas florestais ou em áreas com predominância de mata secundária onde existem as enzoontias pelas diferentes espécies de *Leishmania*. Em decorrência de processos socioambientais particulares e dinâmicos, além dessa transmissão clássica, também têm surgido focos de transmissão periurbano e urbano veiculados por espécies de flebotomíneos pré-adaptados às novas situações em ambientes alterados (LAINSON; SHAW, 1988; MARZOCHI et al., 2014).

As leishmanioses são doenças que apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas-patológicas com diferenças marcantes na gravidade e impacto na saúde. A gravidade da doença varia da forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas, dependendo da virulência do parasito, da resposta imune do hospedeiro e fatores genéticos (SHAW, 1997; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Basicamente podem-se diferenciar duas formas de leishmaniose: a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) também conhecida como Calazar, que acomete o sistema linfomonocitário de forma sistêmica grave; e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que pode apresentar desde um envolvimento cutâneo localizado (Leishmaniose Cutânea) até uma destruição de grandes extensões das mucosas (Leishmaniose Mucosa). A forma mucosa é caracterizada pela disseminação do parasito para as áreas da nasofaringe, acompanhada por infecções secundárias, resposta imune hiper-inflamatória e possível desfiguração da face. Também são encontradas formas disseminadas cutâneas, infiltrativas e não-ulcerosas com caráter evolutivo crônico

(Leishmaniose Cutâneo Difusa) que se apresentam em indivíduos anérgicos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

No mundo, nos últimos cinco anos foram registrados 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea em 98 países, sendo que aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão (WHO, 2014). As populações mais afetadas, majoritariamente, estão localizadas na América Latina e em países em desenvolvimento.

No Brasil, a LTA apresenta níveis elevados de prevalência, com franca expansão geográfica e notificação de casos em todos os estados da federação. No período de 2010 a 2012, foram notificados no Brasil 68.855 casos de LTA, sendo 40% desses notificados na região Norte, área de maior incidência da doença; seguida pelas regiões Nordeste (37%), Centro-Oeste (13%), Sudeste (8%) e Sul (2%). No ano de 2010 o Acre foi a unidade da federação com maior incidência de casos de LTA/10.000 habitantes (14,16), sem registro de casos para a forma visceral (SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÕES, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2010) são considerados coeficientes muito altos os registros acima de 7,1 casos/ 10.000 habitantes.

O encontro de diferentes perfis epidemiológicos, com registro de focos tanto no ambiente silvestre quanto periurbano (SINAN, 2014; WHO, 2014), reforça a hipótese da possível adaptação dos vetores e parasitos a ambientes modificados e também a incorporação de animais domésticos na relação de reservatórios (COSTA et al., 2007; LAINSON; SHAW, 1988; MICHALSKY et al., 2011; TELES et al., 2013a), fato que levou a doença a ocupar um lugar de destaque entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 2014).

No Novo Mundo (desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina) são reconhecidas 14 espécies de *Leishmania* sp. responsáveis pela doença no homem. Aproximadamente 20 espécies de flebotomíneos foram assinaladas como transmissoras de *Leishmania* em condições naturais (RANGEL; LAINSON, 2009). Em decorrência da grande variedade de agentes etiológicos, vetores e reservatórios encontrados nos diferentes contextos ambientais de transmissão da leishmaniose, as ações de controle são dificultadas e necessitam de estratégias específicas que considerem o padrão epidemiológico regional e comportamento da transmissão em cada localidade.

1.2 Flebotomíneos: Biologia e Taxonomia

Os flebotomíneos são insetos pequenos de 1,5 a 3 mm de comprimento, de cor palha ou castanho claro, muito piloso, olhos grandes, com pernas longas e delgadas (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Esses insetos apresentam dimorfismo sexual (Figura 1). Quando estão em repouso, são facilmente reconhecíveis por permanecerem com suas asas em posição semieretas e entreabertas. Seus voos saltitantes são curtos e baixos, com pequena capacidade de dispersão, geralmente não superior a 200 metros. Esses insetos apresentam hábitos crepusculares ou noturnos e costumam abrigar-se em bases e copas de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo e frestas de rochas, podendo invadir residências e abrigar-se em locais mais escuros (BRAZIL; BRAZIL, 2003; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos que diferentemente dos outros Psychodidae, a fêmea põe seus ovos no solo das florestas ou em outros substratos orgânicos. Os ovos são pequenos, brancos e elipsóides e medem aproximadamente 0,3 mm, passando depois a uma coloração castanha ou negra. Após a eclosão dos ovos, as larvas vermiformes passam por quatro estádios larvários que se desenvolvem e alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo. Os criadouros naturais dos flebotomíneos são difíceis de ser encontrados, pois os ovos são pequenos e as larvas, além de pequenas, são bastante ativas. As formas imaturas têm sido encontradas em uma variedade de ambientes silvestres (cavernas, formigueiros, raízes tubulares e tocas de animais), domésticos (fendas de chão e paredes, porões de casas e construções abandonadas) e peridomésticos (estábulo, galinheiros, chiqueiros, aterros e embaixo de rochas) (ALENCAR; QUEIROZ; BARRETT, 2011; FELICIANGELI, 2004).

Após um período de no mínimo 21 dias, as larvas se transformam em pupas que se fixam no substrato. A duração do período pupal varia de oito a nove dias (TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKO, 2014). Sabe-se que a duração de cada estágio varia de acordo com a espécie, disponibilidade de matéria orgânica e condições climáticas. Estima-se cerca de 30 a 40 dias o ciclo completo de ovo a forma adulta (KILLICK-KENDRICK, 1999). Provavelmente as poucas informações sobre a ecologia dos estádios de desenvolvimento dos flebotomíneos sejam devido à dificuldade e insucesso no estabelecimento e manutenção de colônias desses insetos em laboratório (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

Quando o flebotomíneo atinge a fase adulta alimenta-se de seiva para manter a homeostase e somente as fêmeas são hematófagas, sendo o sangue fonte de proteínas e aminoácidos importantes para a maturação ovariana. A quantidade de sangue ingerido influencia diretamente no número de ovos produzidos, sendo que a postura varia entre 40 a 70

ovos (YOUNG; DUNCAN, 1994). Algumas espécies realizam o repasto sanguíneo apenas uma vez entre uma postura e outra, enquanto outras podem se alimentar de fontes sanguíneas mais de uma vez durante um único ciclo de oviposição, aumentando as chances de transmissão de agentes patogênicos se for considerada uma espécie vetora, como é o caso de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lu. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) e *Lu. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (BRAZIL; BRAZIL, 2003; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Os estudos internacionais sobre taxonomia e identificação de fauna de flebotomíneos utilizam a tradicional chave de identificação proposta por Young e Duncan (1994) e uma segunda fonte mais atual publicada por Galati (2003, 2014). Estas chaves de identificação foram baseadas na combinação de caracteres morfológicos externos e internos que resistem ao processo de clarificação.

Segundo Young e Duncan (1994) os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) são representados por seis gêneros: *Phlebotomus* Rondani, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987 no Velho Mundo e *Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948 no Novo Mundo. A chave de classificação, utilizada nesse estudo, subdivide o gênero *Lutzomyia* em 15 subgêneros e 11 grupos de espécies.

Galati (2003, 2014) propôs a classificação de Phlebotominae, com abordagem filogenética, em que os flebotomíneos estão incluídos em duas tribos: Hertigiini Abonnenc & Leger, 1976 e Phlebotomini Rondani, 1840. A primeira inclui duas subtribos: Hertigia Fairchild, 1949 com espécies do Novo Mundo e Idiophlebotomina Artemiev, 1991 para o Velho Mundo. Enquanto que Phlebotomini foi subdividido em seis subtribos: Phlebotomina Rondani, 1840, Australophlebotomina Artemiev, 1991, Brumptomyiina Artemiev, 1991, Sergentomyiina Artemiev, 1991, Lutzomyina Abonnenc & Leger, 1976 e Psychodopygina Galati, 1995; com a distribuição das espécies no Novo Mundo entre as quatro últimas. Nessa nova classificação muitos subgêneros foram elevados ao nível de gênero. Na subtribo Lutzomyiina destacam-se os gêneros *Sciopemyia* Barretto, 1962, *Lutzomyia* França, 1924, *Migonemyia* Galati, 1995, *Pintomyia* Costa Lima, 1932 e *Trichopygomyia* Barretto, 1962; e em Psychodopygina os gêneros *Bichromomyia* Artemiev, 1991, *Nyssomyia* Barretto, 1962, *Psychodopygus* Mangabeira, 1941, *Trichophoromyia* Barretto, 1962 e *Viannamyia* Mangabeira, 1941.

No Novo Mundo o gênero *Lutzomyia* possui o maior número de espécies e a mais ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o Norte da Argentina (SHIMABUKURO; GALATI, 2011; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Além dos métodos tradicionais de identificação, técnicas bioquímicas isoenzimáticas (AZEVEDO et al., 2000; REMY-KRISTENSEN et al., 1996) e moleculares através de sequências de DNA conhecidas (DNA ribossômicos e genes mitocondriais) tem sido aplicadas em casos pontuais e principalmente para identificar espécies crípticas (GUTIÉRREZ et al., 2014; SCARPASSA; ALENCAR, 2013).

Os flebotomíneos possuem grande importância epidemiológica devido à capacidade de algumas espécies transmitirem arboviroses, bartoneloses, tripanossomíases e principalmente das leishmanioses (SHAW et al., 2003). Dessa maneira, surgiram muitos estudos na área entomológica envolvendo esses insetos. O número de espécies de flebotomíneos assinalados até 2003 era de 464 (GALATI, 2003) atingindo um quantitativo de 927 espécies descritas até 2011 (SHIMABUKURO; GALATI, 2011). A maioria das espécies do continente Americano com importância médica está distribuída nos subgêneros *Nyssomyia* Barretto, 1962 e *Psychodopygus* Mangabeira, 1941, com existência de aproximadamente 20 espécies com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* dermatrópicas tanto no ciclo enzoótico, quanto no ciclo zoonótico (RANGEL; LAINSON, 2009; YOUNG; DUNCAN, 1994).

1.3 Interação *Leishmania*-Hospedeiros

O ciclo biológico heteroxeno do parasito envolve dois estágios distintos de desenvolvimento com alteração morfológica da *Leishmania* nos dois hospedeiros: forma amastigota intracelular de células do sistema fagocítico mononuclear que envolve o hospedeiro vertebrado; e a forma promastigota flagelada extracelular que se desenvolve no intestino das fêmeas de flebotomíneos (GALATI, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003; SHAW, 1997).

A infecção por *Leishmania* sp. no homem ocorre durante o repasto sanguíneo quando a fêmea de flebotomíneo infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas sobre a pele lesionada. Após a inoculação, as formas promastigotas precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro e invadir a célula alvo. Os parasitos inoculados são fagocitados por macrófagos teciduais do hospedeiro e no interior do vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em formas amastigotas e multiplicam-se por divisão binária. Estas amastigotas podem ser liberadas após o rompimento do macrófago e são capazes de infectar novas células, causando a disseminação do parasito e o desenvolvimento das lesões características das leishmanioses (Figura 2) (SILVEIRA, LAINSON; CORBETT, 2004).

A evolução da doença dependerá dos passos iniciais da transmissão incluindo a quantidade de parasitos inoculados, a presença de substâncias com atividades farmacológicas presentes na saliva do vetor (como vasodilatadoras, anti-agregadoras de plaquetas, anti-hemostáticas, imunossupressoras) (ALMEIDA; BARRAL; BARRAL-NETTO, 2003; ANDRADE et al., 2007), além de diversos fatores bioquímicos e moleculares relacionados à infectividade e virulência dos parasitos como a expressão de lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína gp63 de superfície (OLIVIER et al., 2012; SACKS; KAMHAWI, 2001), proteína de membrana do kinetoplasto 11 (KMP-11) (CARVALHO et al., 2005), cisteíno-proteases, superóxido dismutase (SOD), tripanotona redutase, entre outras enzimas que desempenham importantes funções na fisiologia destes protozoários (ALVES et al., 2014). Diversos fatores do sistema imunológico do hospedeiro são ativados após infecção, mas a resposta imune celular, específica para *Leishmania*, tem papel determinante no controle da infecção (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

As formas amastigotas podem ser ingeridas pelo flebotomíneo através da alimentação sanguínea, onde no interior de seu tubo digestório, transformam-se em promastigotas procíclicas com longos flagelos, as quais se multiplicam rapidamente no meio do bolo alimentar nas primeiras 48 horas após o repasto. Também nesse período o sangue é envolvido por uma matriz de glicoproteínas e quitina denominada de matriz peritrófica que funciona como uma barreira à difusão das enzimas digestivas atuando como um filtro seletivo (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). Após dois a cinco dias, a matriz peritrófica se degenera e o bolo fecal começa a ser excretado passando pelo piloro e pelo íleo. Para completar o ciclo de vida no vetor, as formas procíclicas de *Leishmania* deverão resistir às atividades das enzimas digestivas presentes no intestino, evadir a matriz peritrófica produzindo uma enzima conhecida como quitinase, aderir ao epitélio intestinal (para permanecer no intestino frente aos movimentos peristálticos da digestão) e passar por vários estágios de diferenciação (promastigotas haptomonas, nectomonas, paramastigotas) até formarem as promastigotas metacíclicas infectivas que migram para a região anterior do intestino médio do flebotomíneo (Figura 3) (KILLICK-KENDRICK, 1999; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

Quanto maior for o número de amastigotas ingerido durante o repasto sanguíneo, maiores serão as chances para o estabelecimento e infecção no inseto. No entanto, esse não é um fator determinante, pois a competência vetorial é espécie-específica e depende do polimorfismo da molécula LPG, principal ligante do parasito aos receptores do intestino do vetor (SACKS; KAMHAWI, 2001). Após cinco dias ou mais, a metaciclogênese se completa e as promastigotas metacíclicas apresentam mudanças bioquímicas complexas, expressão de

moléculas diferentes na superfície celular como LPG e gp63 que conferem às mesmas, resistência aumentada. O ciclo de transmissão é repetido quando a fêmea infectada realiza a hematofagia e inocula as formas infecciosas metacíclicas em um novo hospedeiro mamífero (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

Figura 1 – Ciclo biológico da *Leishmania*.

CL: Leishmaniose cutânea. VL: Leishmaniose visceral. Fonte: CDC (2014).

Figura 2 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp. no inseto vetor.

Fonte: Sacks modificado por Pimenta Freitas e Secundino (2012).

1.4 Principais espécies de flebotomíneos com competência vetorial

Observa-se, portanto, que a presença de *Leishmania* no intestino dos flebotomíneos não significa necessariamente que este é capaz de transmitir o parasito para o homem, pois o mesmo precisa vencer diversas barreiras naturais encontradas dentro do vetor para completar o seu ciclo de desenvolvimento. Para se comprovar que uma espécie de flebotomíneo é vetor de uma determinada espécie de *Leishmania* sp., faz-se necessário o isolamento e identificação da mesma espécie de *Leishmania* sp. no flebotomíneo e nos pacientes da área de transmissão; é preciso comprovar a infecção experimental do flebotomíneo e a transmissão através da picada em animais de laboratório; demonstrar antropofilia ou atração por reservatórios, bem como a distribuição espacial em concordância com a ocorrência dos casos de infecção humana (BRASIL, 2010; KILLICK-KENDRICK, 1990; LAINSON; SHAW, 1988).

No entanto, atender a todos os critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial é muito difícil, principalmente quando se trata da relação entre vetor e parasito do complexo *Le. braziliensis*. A maioria desses flebotomíneos é de difícil manutenção ou baixa produtividade em laboratório, enquanto que *Leishmanias* desse complexo variam na adaptação ao cultivo *in vitro* e apresentam desenvolvimento lento em modelos experimentais *in vivo* (COSTA et al., 2009). Dessa maneira, muitas espécies de flebotomíneos são incriminadas como vetores em potencial por atenderem parcialmente aos critérios propostos por Killick-Kendrick (1990), geralmente por existirem em abundância em locais coincidentes com as manifestações da doença.

Embora as etapas do ciclo evolutivo do protozoário no inseto invertebrado e no reservatório sejam as mesmas para todas as espécies do gênero *Leishmania*, o ciclo específico de cada espécie varia de acordo com a região geográfica, sendo influenciado pela vegetação, barreiras físicas, umidade e abundância de hospedeiros vertebrados (SHAW, 1997). Os ciclos de transmissão podem ser silvestres onde a infecção humana geralmente é acidental relacionada a atividades de agricultura, pesca, caça e exploração de minerais. No entanto, o processo de modificação ambiental decorrente da ação antrópica, tem destruído constantemente os ecótopos naturais dos vetores e reservatórios, favorecendo a adaptação de espécies antropofílicas de flebotomíneos a animais sinantrópicos ou domésticos próximos a habitações humanas, aumentando o risco de transmissão e o surgimento de novos focos peridomiciliares e periurbanos da leishmaniose (BASANO; CAMARGO, 2004; CASTELLÓN, 2009; MARZOCHI et al., 2014).

No Brasil, muitos estudos sobre a distribuição geográfica de flebotomíneos vetores envolvidos na transmissão de diversas espécies de *Leishmanias* foram publicados. As espécies *Lu. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Lu. migonei* (França, 1920), *Lu. flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) e *Lu. umbratilis* Ward & Fraiha, 1977 estão bem distribuídas em todas as regiões do Brasil (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) são os principais vetores encontrados em áreas de transmissão dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Espírito Santo e Minas Gerais (AGUIAR et al., 2014; RANGEL; LAINSON, 2009; SHIMABUKURO; GALATI, 2011). Enquanto que *Lu. neivai* (Pinto, 1926) é a espécie vetora com destaque no Sul do Brasil (SILVA et al., 2008; TEODORO et al., 2001). Na região Nordeste as espécies *Lu. wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lanson, 1971), *Lu. whitmani* e *Lu. migonei* são as mais abundantes em áreas de transmissão de LTA (QUEIROZ et al., 1994; SILVA et al., 2010a). Na região Norte é encontrada uma ampla cadeia de focos geograficamente diferentes e uma diversidade de reservatórios e espécies de vetores dos subgêneros *Nyssomyia*; *Psychodopygus*; *Lutzomyia* e *Trichophoromyia* Barretto, 1962 (CASTELLÓN, 2009; GALATI, 2003). No Pará destacam-se principalmente as espécies *Lutzomyia complexa* (Mangabeira, 1941) e *Lu. wellcomei* (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). No Amazonas os principais vetores são *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* (Rozeboom, 1942), *Lu. flaviscutellata* e *Lu. wellcomei* (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; BRASIL, 2010; GUERRA et al., 2006). Em Rondônia os vetores incriminados mais abundantes da região são *Lu. davisi* (Root, 1934) e *Lu. whitmani* (GIL et al., 2003, 2009; TELES et al., 2013a). E no Acre *Lu. davisi*, *Lu. whitmani*, *Lu. antunesi* (Coutinho, 1939), *Lu. ubiquitalis* (Mangabeira, 1942) e *Lu. umbratilis* foram as espécies vetores registradas no estado (AZEVEDO et al., 2008; SILVA-NUNES et al., 2008).

Portanto, entende-se que o ciclo é dinâmico e a dispersão das espécies de *Leishmania* em vários ambientes e a adaptação deste parasito a diferentes mamíferos, estão associadas à adaptação dos vetores a diferentes condições ecológicas propícias ao seu desenvolvimento. Esse cenário de interações com diversas espécies de parasito/hospedeiros/vetores possibilita a ocorrência de polimorfismos, clones com diferentes características biológicas e plasticidade genotípica tanto dos parasitos como vetores das leishmanioses presentes nas diferentes regiões (PACHECO; CARVALHO-COSTA, 2014; SHAW, 1997).

1.5 Caracterização Clínico-Epidemiológica da LTA

As formas promastigotas flageladas de *Leishmania* diferem nos padrões de desenvolvimento no trato digestivo dos insetos flebotomíneos, e dessa maneira essas características foram utilizadas como base para a revisão proposta por Lainson e Shaw (1987) para a divisão do gênero *Leishmania* em três subgêneros. O subgênero *Sauroleishmania* inclui espécies de parasitos encontrados apenas em répteis do Velho Mundo, e é restrita ao intestino posterior do flebotomíneo. Enquanto que as espécies de *Leishmania* de mamíferos são divididas no subgênero *Leishmania*, que inclui espécies com desenvolvimento suprapilário, ou seja, predominante nos intestinos médio e anterior, e *Viannia* composto por espécies com desenvolvimento peripilário, cujo desenvolvimento apresenta uma fase que se passa no intestino posterior (LAINSON, 2010).

Atualmente, no Novo Mundo as 15 espécies pertencentes aos dois subgêneros que infectam o homem são classificadas em três complexos fenotípicos (Figura 4): complexo *Leishmania braziliensis* (todas as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* estão associadas às doenças tegumentares), complexo *Leishmania mexicana* (espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* envolvidas num espectro de doenças tegumentares) e complexo *donovani* (espécies do subgênero *Leishmania* responsáveis por doença visceral de caráter crônico) (LAINSON, 2010; LAINSON; SHAW, 1973).

No Brasil oito espécies de *Leishmania* são agentes etiológicos das diferentes formas clínicas da leishmaniose: *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, *Le. (V.) guyanensis* Floch, 1954, *Le. (V.) lainsoni* Silveira et al., 1987, *Le. (V.) naiffi* Lainson & Shaw, 1989, *Le. (V.) shawi* Lainson et al., 1989 e *Le. (V.) lindenbergi* Silveira et al., 2002 representantes do complexo *Le. braziliensis*; *Le. (Le.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 e *Le. (Le.) infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937 espécies dos complexos *mexicana* e *donovani*, respectivamente (Figura 4). Sendo a última espécie mencionada agente etiológico da leishmaniose visceral (COSTA et al., 2009; LAINSON, 2010; LAINSON; SHAW, 1973). A Figura 5 mostra a distribuição das sete espécies de *Leishmania* causadoras de LTA humana no Brasil.

Figura 3 – Diagrama da classificação das espécies de *Leishmania*, modificado por Lainson e Shaw, 1998.

Figura 4 – Distribuição das principais espécies dermatrópicas de *Leishmania* sp. causadoras da doença humana no Brasil.

Fonte: Brasil (2010), adaptado por Carolina B. G. Teles através das descrições de Corrêa, Brazil e Soares (2005); Shaw et al. (2007); Guerra et al. (2011); Jennings et al. (2014).

A infecção humana restrita por um grupo de espécies de *Leishmania* provavelmente se deve a uma combinação de fatores, incluindo a susceptibilidade intrínseca do homem à doença e aos hábitos antropofílicos dos vetores. As espécies envolvidas na transmissão de LTA em humanos diferem uma das outras nas suas manifestações clínicas, resposta aos quimioterápicos, transmissão, imunidade que provocam nos hospedeiros, distribuição geográfica e seus padrões de recidivas (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

No Brasil, *Le. (Le.) amazonensis*, *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) guyanensis* são as espécies mais amplamente distribuídas, principalmente na região Amazônica (LAINSON et al., 1994; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A *Le. (Le.) amazonensis* foi registrada primeiramente na região Amazônica e atualmente ocorre em áreas florestais primárias e secundárias nas cinco regiões do Brasil. Essa espécie causa úlceras cutâneas localizadas e ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) de ocorrência fortemente ligada à região amazônica brasileira, principalmente no Pará e Amapá (LAINSON; SHAW, 1988; SILVEIRA, 2009). Na LCD, a *Le. (Le.) amazonensis* é capaz de induzir a imunossupressão celular específica, caracterizada por baixa proliferação de linfócitos e baixa produção de citocinas, como interferon gama (IFN- γ), que estimulam a produção de reativos tóxicos contra as formas amastigotas infectantes. Consequentemente, ocorre falha na regulação e ativação dos macrófagos e susceptibilidade de disseminação do parasito. Desse modo, o quadro clínico da doença é caracterizado por infiltração difusa da pele e o surgimento de lesões cutâneas fechadas, tais como, pápulas, placas infiltradas e nódulos, que raramente ulceram. Embora os casos de LCD sejam raros, a doença tem caráter evolutivo crônico, sem sucesso ao tratamento convencional (antimonial pentavalente, anfotericina B, pentamidina), com tendência de recidivas e piora, reduzindo a capacidade de trabalho e de convívio social (SILVEIRA, 2009).

No exame microscópio as *Le. (Le.) amazonensis* são maiores e mais facilmente detectadas que os parasitos do subgênero *Viannia*; sendo a espécie mais estudada não só pela sua importância epidemiológica, mas também pelo sucesso do cultivo *in vitro* (COSTA et al., 2009). O vetor conhecido é o flebotomíneo *Lu. flaviscutellata*, com hábitos noturnos, muito atraídos por pequenos roedores silvestres do gênero *Proechimys* Allen, 1899 e *Oryzomys* Baird, 1857 dos quais já foram isolados na Amazônia (FREITAS; BARRETT; NAIFF, 1989; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LAINSON et al., 1994). No estado do Amazonas e em Rondônia as espécies *Lu. reducta* (Felicangeli et al., 1988) e *Lu. olmeca nociva* (Young & Arias, 1982) também já foram consideradas vetores suspeitos (FREITAS; BARRETT; NAIFF, 1989; LAINSON, 2010). Fonteles (2009) mostrou que *Lu. whitmani* é susceptível a

infecção experimental por *Le. (Le.) amazonensis*, sugerindo que essa espécie de flebotomíneo também seja um possível vetor, apesar de nunca ter sido encontrada naturalmente infectada.

A *Le. (V.) braziliensis* foi o primeiro agente etiológico descrito da LTA e a espécie mais comum da doença no Brasil. Atualmente apresenta maior distribuição geográfica não só no Brasil, mas em toda a América Latina (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). O parasitismo por essa espécie constitui um sério problema de saúde pública não só por sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também pela sua infecção (frequente das úlceras cutâneas) poder evoluir para formas graves de lesões mucosas destrutivas e desfigurantes (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Os fatores que predisõem as complicações clínicas estão associados a fatores de virulência do parasito; polimorfismos genéticos do parasito ou do hospedeiro (ROGERS et al., 2011) e resposta imune excessiva e não modulada do hospedeiro aos antígenos do parasito caracterizada pela produção exacerbada de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- γ levando a destruição tecidual (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Ao longo das últimas décadas a transmissão de *Le. (V.) braziliensis* tem sido associada a diferentes biomas do país, com aumento de sua ocorrência no ambiente domiciliar em áreas periurbanas (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; TOLEZANO et al., 2001). Esse achado pode ser explicado pelo grande número de espécies de flebotomíneos (*Lu. intermedia*, *Lu. neivai*, *Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. wellcomei* e *Lu. complexa*) associados a sua transmissão e sua adaptação a diferentes reservatórios silvestres e sinantrópicos (BRAZIL; BRAZIL, 2003; CUPOLLILLO et al., 2003). Como reservatórios infectados naturalmente já foram encontrados roedores *Necromys lasiurus* (Lund, 1841) e *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) em Pernambuco (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), em animais domésticos como felídeos (*Felis catus* Linnaeus, 1758) no Rio de Janeiro, canídeos (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) no Ceará, Bahia, Espírito Santo; Rio de Janeiro e São Paulo (FALQUETO et al., 1991; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994), equídeos (*Equus caballus* Linnaeus, 1758; *Equus asinus* Linnaeus, 1758) no Rio de Janeiro (AGUILAR et al., 1989).

Essa plasticidade e capacidade de se adaptar às novas condições ecológicas justifica o elevado nível de polimorfismos intra-espécie encontrados em cepas de *Le. (V.) braziliensis*, principalmente nos isolados da bacia Amazônica onde esse parasito está relacionado ao grande número de diferentes vetores flebotomíneos e/ou reservatórios envolvidos nas áreas de transmissão (CUPOLLILLO et al., 2003). Essa variabilidade genética pode ser um fator que contribui para o seu tropismo tecidual levando a formas mucosas e virulência aumentada em relação às outras espécies de *Leishmania* (ROGERS et al., 2011).

A *Le. (V.) guyanensis* causa predominantemente lesões cutâneas ulcerativas únicas ou múltiplas e é considerado o agente etiológico mais comum dos casos de LTA ao Norte da Bacia Amazônica (Amazonas, Amapá, Pará e Roraima), com elevada incidência em bairros periféricos na cidade de Manaus, AM (COELHO et al., 2011; GUERRA et al., 2006; GUERRA et al., 2011; LAINSON et al. 1994). Poucos casos humanos de LTA por essa espécie foram registrados provenientes de outras regiões do país como, por exemplo, no Acre (TOJAL DA SILVA et al., 2006) e Rondônia (GUERRA et al., 2011). Morfologicamente a *Le. (V.) guyanensis* apresenta semelhança a *Le. (V.) braziliensis* através de análises microscópicas, no entanto, com o progresso do diagnóstico molecular foi possível distinguir essas espécies e identificar sua importância nos casos de LTA humana na Amazônia (BENÍCIO et al., 2011; COELHO et al., 2011; GUERRA et al., 2011; JENNINGS et al., 2014). Embora a infecção por essa espécie tenha sido raramente associada ao comprometimento nasofaríngeo (BASANO; CAMARGO, 2004; LAINSON; SHAW, 1973), questões sobre as complicações e surgimento de quadros clínicos na forma mucosa por este parasito tem sido recentemente levantadas (GUERRA et al., 2011; WALKER et al., 2006). Ives et al. (2011) explicam que a variação da manifestação clínica da doença envolvendo *Le. (V.) guyanensis*, pode estar associada à infecção da *Leishmania* por um vírus contendo RNA dupla fita, *Leishmania* RNA vírus (LRV), capaz de modular o sistema imune do hospedeiro e favorecer o desenvolvimento de lesões mucosas.

A elevada incidência da LTA por *Le. (V.) guyanensis*, ao leste do rio Negro e ao Norte do rio Amazonas provavelmente decorre da presença de populações do vetor altamente antropofílico *Lu. umbratilis*. Os flebotomíneos *Lu. whitmani* e *Lu. anduzei* são considerados vetores secundários de *Le. (V.) guyanensis* (RANGEL; LAINSON, 2009). Dentre os possíveis reservatórios silvestres da *Le. (V.) guyanensis*, se destaca na Amazônia brasileira a preguiça (*Choloepus didactylus* Linnaeus, 1758) e o tamanduá (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758), e secundariamente temos roedores silvestres (*Proechimys* sp.) e o gambá (*Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758) (ARIAS et al., 1981; BASANO; CAMARGO, 2004). Esses dois últimos reservatórios parecem ter significativa importância epidemiológica da doença, pois essas espécies podem desenvolver hábitos sinantrópicos e estabelecer um elo entre o ciclo silvestre e o peridomicílio em áreas de floresta alterada pelo homem (ARIAS et al., 1981; GUERRA et al., 2006).

As espécies *Le. (V.) shawi*, *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) naiffi* e *Le. (V.) lindenbergi* são mais restritas ao ciclo silvestre na região amazônica e são consideradas de menor importância por

causa da sua baixa prevalência e muitas vezes com cura espontânea da lesão cutânea (BRASIL, 2010; SILVEIRA; LAINSON; COBETT, 2004).

A espécie *Le. (V.) shawi* foi descrita em 1989, a partir de isolados de animais silvestres capturados na Serra do Carajás, região Sudeste do Pará. Seus reservatórios naturais são: macacos (*Chiropotes satanas* Hoffmannsegg, 1807 e *Cebus apela* Linnaeus, 1758), quati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) e preguiça (*Choloepus didactylus*) (LAINSON et al., 1989; LAINSON et al., 1994). Desde seu primeiro registro, surgiram poucos estudos sobre infecções humanas por essa espécie, com ocorrência principalmente no Pará (JENNINGS et al., 2014; LAINSON et al., 1994; SHAW et al., 1992) e recentemente em Pernambuco (BRITO et al., 2009). No entanto, a migração humana e a fácil domiciliação do principal vetor *Lu. whitmani* dessa espécie de *Leishmania*, coloca a possibilidade de sua presença e estabelecimento em outras áreas tropicais.

Têm sido registrados casos raros da infecção humana por *Le. (V.) lainsoni* nos estados de Rondônia, Acre, Pará e Amapá (CORRÊA; BRAZIL; SOARES, 2005; SHAW et al., 2007; SILVEIRA et al., 1991; TOJAL DA SILVA et al., 2006). A baixa prevalência dessa espécie possivelmente pode estar associada a subnotificação dos casos, uma vez que as lesões cutâneas únicas geralmente evoluem para cura e pela baixa antropofilia do flebotomíneo vetor *Lu. ubiquitalis* (Mangabeira, 1942), sendo o roedor silvestre a paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) o seu reservatório principal (SILVEIRA et al., 1991).

A *Le. (V.) naiffi* ocorre nos estados do Pará e Amazonas e tem sido associada a três principais espécies de flebotomíneos antropofílicos: *Lu. ayrozai* (Barreto & Coutinho, 1940), *Lu. paraensis* (Costa Lima, 1941) e *Lu. squamiventris* (Lutz & Neiva, 1912) (ARIAS et al., 1985; GRIMALDI et al., 1991; NAIFF et al., 1991). Em Rondônia, Gil et al. (2003) encontraram *Lu. davisi* (Root, 1934) e *Lu. hirsutus* (Mangabeira, 1942) infectados naturalmente com *Le. (V.) naiffi*, enquanto que Naiff et al. (1991) encontraram reservatórios *Dasybus novemcinctus* (Lineu, 1758) infectados pela mesma espécie.

Ao contrário das outras espécies mencionadas, a *Le. (V.) lindenbergi* foi descrita até o momento como um caso de transmissão isolada em área de reserva florestal em Belém, Pará, durante um período de treinamento de soldados. Não existe registro de infecção natural em animais ou flebotomíneos, sendo a espécie *Lu. antunesi* (Coutinho, 1939) indicada como provável vetor pela predominância na localidade de transmissão (SILVEIRA et al., 2002).

Diante do exposto, observa-se que a diversidade de espécies de *Leishmania* encontrada na Amazônia é aparentemente maior e pode estar relacionada a grande fauna de flebotomíneos vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão já descrito na região. Embora, a

presença de *Le. (V.) braziliensis*, *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (V.) naiff* já tenha sido constatada na população humana de Rio Branco, AC (TOJAL DA SILVA et al., 2006), ainda são escassos os estudos sobre a identificação específica dos agentes de leishmanioses em suas áreas de ocorrência no estado.

1.6 Epidemiologia molecular

A avaliação da infecção natural de flebotomíneos por espécies de *Leishmanias*, identificação do parasito no prognóstico individual de LTA, estudo da distribuição geográfica dos vetores/ parasitos, filogenia e análises das condições ambientais dos focos da infecção são fatores importantes para ampliar o conhecimento da ecoepidemiologia das leishmanioses, mapear as áreas de risco de transmissão da doença além de auxiliar no desenvolvimento de novas metodologias de controle da doença (BASANO; CAMARGO, 2004; FLOETER-WINTER, 2010; MICHALSKY et al., 2002).

Os métodos tradicionais mais utilizados para se detectar uma infecção natural ativa e identificar a espécie de *Leishmania* em flebotomíneos é a visualização em microscopia óptica após dissecação e/ou isolamento da cepa *in vitro*. No entanto, estes métodos requerem *in loco* muito tempo, um número limitado de amostras e habilidade na detecção do parasito, pois além de se trabalhar com os flebotomíneos vivos, outros flagelados como *Trypanosoma* e *Endotrypanum* encontrados no intestino das fêmeas desses insetos podem dificultar o diagnóstico microscópico, diminuindo a sensibilidade e eficácia do método utilizado. Enquanto que, o cultivo *in vitro* de *Leishmania* spp. é susceptível à contaminação por outros microrganismos o que poderá diminuir a precisão dos dados obtidos (BRITTO; PITA-PEREIRA, 2014; MICHALSKY et al., 2002).

Em relação ao método padrão de diagnóstico laboratorial em amostras clínicas suspeitas de leishmaniose utiliza-se a pesquisa microscópica do parasito em preparações coradas, confeccionadas a partir de fragmentos de biópsias dos pacientes. Este método é muito útil na fase inicial da doença e em áreas endêmicas com poucos recursos laboratoriais, porém não é capaz de diferenciar as espécies de *Leishmania* sp. e é pouco eficaz no diagnóstico das infecções crônicas, ocasionando frequentemente resultados falso negativos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Entretanto, com os avanços da biologia molecular e a utilização de suas técnicas nas investigações epidemiológicas houve uma contribuição significativa no aumento da sensibilidade na detecção e identificação do parasito em materiais biológicos diversos, além

de oferecer resultados mais eficazes, confiáveis e capazes de identificar as diferentes espécies de *Leishmania* sp. circulantes em áreas endêmicas (BENÍCIO et al., 2011; FLOETER-WINTER, 2010; MICHALSKY et al., 2002). Dentre as modalidades das técnicas moleculares disponíveis tem-se a detecção do parasito através de anticorpos monoclonais (GRIMALDI; MCMAHON-PRATT, 1996), reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), PCR em Tempo Real e a mobilidade eletroforética de isoenzimas (BRASIL, 2010; CUPOLILLO et al., 2003; PACHECO; CARVALHO-COSTA, 2014). Essa última metodologia é considerada o padrão ouro para determinar as similaridades e diferenças entre as cepas de *Leishmania* baseada no perfil complexo de bandas obtido na análise de eletroforética das enzimas (COELHO et al., 2011; CUPOLILLO et al., 2003). Os resultados obtidos através dessa técnica possibilitam o conhecimento das relações genéticas empregadas na identificação e classificação taxonômica do parasito, entretanto, tem a desvantagem de requerer o isolamento e cultivo do parasito *in vitro*, que muitas vezes não é possível ou ocorre contaminação que impossibilita a análise (PACHECO; CARVALHO-COSTA, 2014).

Sendo assim, a técnica de PCR baseada na amplificação de DNA alvo do estudo, constitui-se em uma ferramenta molecular alternativa e vantajosa para pesquisa de infecção de *Leishmania* spp. capaz de identificar gênero e espécie do parasito em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados sem a necessidade de cultivo do parasito (MICHALSKY et al., 2002; PAIVA et al., 2007). Essa metodologia permite o exame de grande quantidade de amostras biológicas; o processamento não necessita ser de imediato após a coleta, podendo o material biológico ser congelado ou conservado em álcool até a aplicação da técnica; é capaz de detectar quantidades mínimas de DNA do parasito; e pouco depende do estágio e localização dos parasitos no trato digestivo do inseto. No entanto, quando se trabalha com amostras de *pools* de flebotomíneos, o encontro de DNA não é uma evidência conclusiva para a incriminação de vetor, pois a positividade da PCR não permite distinguir entre as formas amastigotas (presentes no sangue do mamífero ingerido durante o repasto sanguíneo) e as formas promastigotas (colonizadas no intestino do vetor), necessitando de outros métodos complementares para a comprovação da competência vetorial (BRITTO; PITA PEREIRA, 2014).

Mesmo assim, a aplicação da PCR tem sido útil para o levantamento de risco de transmissão em áreas endêmicas e incriminação de espécies suspeitas ou que antes não estavam envolvidas com a transmissão das leishmanioses. Como exemplos, estudos recentes em áreas endêmicas de LVA, onde o vetor primário *Lu. longipalpis* s.l. (Lutz & Neiva, 1912) está ausente, tem sugerido através de ferramentas moleculares a participação de outros vetores

na transmissão de *Le. (Le.) infantum chagasi*, como *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) e *Lu. forattinii* Galati Rego, Nunes & Teruya 1985 no Mato Grosso do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2008) e *Lu. migonei* (França, 1920) em Pernambuco (CARVALHO et al., 2010a).

Vários alvos do genoma de *Leishmania*, com características distintas e graus variáveis de resolução, têm sido empregados na técnica de PCR incluindo o DNA extranuclear do cinetoplasto (kDNA), sequências de DNA da subunidade menor do ribossomo (SSU rDNA), assim como genes codificantes da DNA polimerase α , proteína de choque térmico *hsp70* (sigla do inglês *heat shock protein*), regiões espaçadoras transcritas (ITS), sequências repetitivas espaçadoras do gene minixon, entre outros alvos (BRITTO; PITA PEREIRA, 2014; OLIVEIRA et al., 2011).

Tendo como base a extensa diversidade de espécies de *Leishmania* e geralmente a baixa parasitemia nas amostras biológicas, a sensibilidade da PCR pode ser aumentada utilizando como alvos moleculares sequências representadas em múltiplas cópias no genoma do parasito e escolha de regiões conservadas em nível de gênero e complexo. Nesse contexto, o kDNA tem sido considerado um importante alvo molecular a ser empregado na detecção desse patógeno (BENÍCIO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Esse material genético é constituído por dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos, esses últimos se repetem de cinco a dez mil vezes por células e apresentam, além das regiões variáveis, regiões conservadas (de 120 a 200 pares de bases) constantes entre todas as espécies do gênero *Leishmania* (ROGERS; WIRTH, 1987).

Outro alvo que tem sido explorado para fins de diagnóstico de protozoários kinetoplastida inclui os genes nucleares minixon que estão representados em aproximadamente duzentas cópias de repetições *em tandem* e são divididos em regiões transcritas conservadas e não transcritas variáveis com alto nível de variação intra e interespecíficas (Figura 6). Protocolos para identificação individual dos complexos utilizando esse alvo molecular já foram publicados utilizando *primers* isolados e específicos (MICHALSKY et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011) no entanto, a utilização de dois ou mais pares de iniciadores numa mesma reação pode otimizar a PCR minimizando o tempo e gastos com enzimas, como foi proposto por Harris et al. (1998). Nesse ensaio denominado PCR multiplex a detecção dos três principais complexos de *Leishmania* (complexo *Leishmania mexicana*, complexo *Leishmania braziliensis* e complexo *Leishmania donovani*) é mediante a observação de fragmentos de DNA de tamanhos variados em gel de agarose. Essa técnica tem sido uma ferramenta útil por permitir a identificação de dois ou mais alvos de interesse simultaneamente.

Figura 5 – Esquema das sequências repetitivas espaçadoras do gene minixon de *Leishmania* spp.

Box preto: região transcrita constituída por um exon conservado (39 nucleotídeos); Box aberto: região transcrita constituída por um íntron moderadamente conservado (55 a 101 nt); Linha sólida região não transcrita com alto nível de variação entre os subgêneros. Iniciadores LU-5A para gênero *Leishmania*; LB-3C para subgênero *Viannia*; LM-3A para subgênero *Leishmania* e LC-3L para *Leishmania infantum chagasi*. Fonte: adaptado por Harris et al. (1998).

A PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) é outra técnica de interesse clínico e epidemiológico que permite a identificação específica de *Leishmania* spp. Essa metodologia é baseada na amplificação de genes específicos do parasito por PCR, seguido da digestão do produto do DNA parasitário por enzimas de restrição. A análise das diversas bandas de DNA visualizadas nos géis de eletroforese são resultados da clivagem da dupla fita pelas endonucleases, o que permite a diferenciação de espécies de *Leishmania*, possibilitando inclusive a detecção de polimorfismos nas sequências nucleotídicas e infecção mista nos isolados de interesse (PACHECO; CARVALHO-COSTA, 2014). Como aplicações práticas dessa técnica, alguns estudos têm demonstrado que o loco gênico que codifica a proteína *hsp70* é bastante polimórfico em *Leishmania* e é capaz de gerar padrões de bandas espécie-específicos discriminando as espécies de importância médica (DA GRAÇA et al., 2012; GARCIA et al., 2004; MONTALVO et al., 2010).

Embora a análise por biologia molecular ainda seja pouco utilizada na rotina de diagnóstico e mais difundida para fins de pesquisa, é provável que a longo prazo seja um método tradicional utilizado nos programas de controle em áreas endêmicas visando a identificação das espécies de *Leishmania* circulantes, indicar as espécies de vetores suspeitos e compreender o ciclo de transmissão da doença em diferentes áreas geográficas.

1.7 LTA no Brasil, Acre e Assis Brasil e Tríplice Fronteira

Segundo o Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN, 2014) uma média anual de aproximadamente 24.230 casos novos de LTA tem sido registrada nos últimos anos no Brasil. Ao analisar a evolução da LTA no país, observa-se uma diminuição do

coeficiente de detecção com registro de 1,7 por 10.000 habitantes em 2001 atingindo um valor de 1,2/ 10.000 habitantes em 2010. A epidemiologia das leishmanioses é complexa, pois seu risco de transmissão envolve múltiplos fatores que varia desde condições ambientais, de saúde, desenvolvimento socioeconômico e de políticas públicas de controle da doença (MARZOCHI et al., 2014). Teles et al. (2013a) sugerem que a diminuição dos casos de LTA no Brasil está associada a melhoria socioeconômica da população (aumento de emprego formal) e maior controle de desmatamento ao longo dos últimos 15 anos. No entanto, observa-se uma expansão geográfica da doença com notificação em todos os estados brasileiros e a coexistência de um duplo perfil epidemiológico da doença em algumas regiões, que inicialmente era limitado às zonas florestais e agora passou a ocorrer também em zonas rurais desmatadas e periurbanas (CORTE et al., 1996; GUERRA et al., 2006; MIRANDA et al., 2011; SILVA; MUNIZ, 2009).

O Acre, considerada a unidade da federação com maiores índices de LTA nos últimos anos, está dividido geograficamente em duas mesorregiões (Vale do Juruá e Vale do Acre) e cinco microrregiões (Cruzeiro do Sul, Tarauacá, Sena Madureira, Rio Branco e Brasiléia) (Figura 7). O Vale do Juruá, com 206.084 habitantes no ano de 2010, é formado pelas microrregiões de Cruzeiro do Sul e de Tarauacá. As microrregiões de Sena Madureira, Rio Branco e Brasiléia formam o Vale do Acre, o qual possuía 527.475 habitantes no ano de 2010 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014). Analisando os dados de LTA referentes às cinco microrregiões do Acre (Cruzeiro do Sul, Tarauacá, Sena Madureira, Rio Branco e Brasiléia) verificou-se que a microrregião de Brasiléia e Sena Madureira constituem uma endemia de maior relevância epidemiológica no estado do Acre nos últimos anos (SILVA et al., 1999; SILVA; MUNIZ, 2009), concentrando as duas juntas 43,6% e 44,2% dos casos de LTA em 2011 e 2012 respectivamente (Figura 8) (SINAN, 2014).

Figura 6 – Mapa geográfico indicando os municípios do estado do Acre e cinco microrregiões.

Elaborado por Tony Katsuragawa.

Figura 7 – Distribuição do coeficiente de detecção de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Assis Brasil e nas cinco microrregiões do estado do Acre, entre 2003 a 2010.

Fonte: SINAN (2014).

A transmissão da LTA no estado ao longo dos anos foi associada às zonas florestais, acometendo de forma típica homens adultos expostos a regiões de mata. No entanto, nos últimos anos tem apresentado mudanças em relação ao seu comportamento epidemiológico, com aumento de registros de casos da doença em mulheres e crianças na região de Rio Branco. Essa mudança pode ser atribuída à expansão de fronteiras agrícolas, atividades de exploração de produtos florestais (frutas, borracha e madeira), surgimento de áreas de garimpos, desmatamento progressivo e formação de novos núcleos urbanos em ambientes favoráveis à transmissão da doença (SILVA; MUNIZ, 2009; TOJAL DA SILVA et al., 2006). Um estudo do censo demográfico IBGE sobre os deslocamentos populacionais no Brasil, entre 2000 e 2010, revela que ocorreu um crescimento da população em toda a região Norte. Esse cenário se torna importante para a saúde pública quando se observa o crescimento demográfico acreano significativo de 2,8% ao ano, sendo que em menos de 70 anos a população aumentou de 79.768 para 733.559 habitantes (IBGE, 2014). Esses movimentos migratórios favorecem alterações ambientais tanto nas áreas suburbanas e áreas de florestas residuais, e podem desempenhar um papel importante na manutenção e disseminação da LTA principalmente quando se trata de regiões com processo histórico dessa endemia (DESJEUX, 2004).

O caráter endêmico e elevada incidência da LTA no estado do Acre contrasta com a carência de informações sobre a endemia e sua epidemiologia. Foram publicados até o momento cinco estudos entomológicos descrevendo a fauna de flebotomíneos envolvendo os municípios de Cruzeiro do Sul, Feijó, Bujari, Xapuri, Rio Branco e Acrelândia (ARAÚJO-PEREIRA et al., 2014; ARIAS; FREITAS, 1982; AZEVEDO et al., 2008; MARTINS; SILVA, 1964; SILVA-NUNES et al., 2008); três estudos sobre a descrição do perfil epidemiológico de LTA baseados nos dados notificados pelo Ministério da Saúde do estado (OLIART-GUZMÁN et al., 2013; SILVA et al., 1999; SILVA; MUNIZ, 2009) e somente um estudo epidemiológico de caracterização de espécies de *Leishmania* em biópsias humanas utilizando técnicas moleculares foi descrito em Rio Branco (TOJAL DA SILVA et al., 2006).

No contexto do estado, o município de Assis Brasil de “Integração Fronteiriça com Peru e Bolívia”, localizado na microrregião de Brasiléia, é uma das importantes zonas endêmicas com altíssimos índices de LTA. No período de 2003 a 2010 foi assinalada uma prevalência média da doença de 108,8 casos/ 10.000 habitantes (Figura 8) (SINAN, 2014). No período de 2007 a 2012, 331 casos humanos foram registrados pelas autoridades de Saúde, sendo 71 casos da forma mucosa (Figura 9). Análises parciais da distribuição espacial dos casos notificados (213) pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica do município foram

realizadas pelo nosso grupo de pesquisa considerando o indicador de densidade de casos, no período de 2010 a 2013, mostrando que existem três focos de LTA de importância epidemiológica (Figura 10 e Figura 11). Verifica-se que aproximadamente 54% desses casos estão distribuídos nos Seringais Icuriã, Paraguaçu, São Francisco e Guanabara caracterizados por áreas florestais com ocupação humana que apresentam características propícias para a transmissão da doença.

Figura 8 – Distribuição anual dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Assis Brasil, AC, entre o período de 2007 a 2012.

Fonte: SINAN (2014).

Figura 9 – Mapa dos locais com registro de infecção de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica municipal de Assis Brasil.

Coordenadas geográficas foram obtidas de um ponto centróide da localidade.

Figura 10 – Estimador de intensidade Kernel com base na notificação de casos de LTA em Assis Brasil no período de 2010 a 2013.

Fonte: Sistema de Vigilância Epidemiológica de Assis Brasil (2014).

A localização geográfica da cidade requer uma prática de vigilância epidemiológica mais cuidadosa. Assis Brasil está localizada junto à margem esquerda do rio Acre, o qual banha também os municípios de Brasiléia, Xapuri e Rio Branco. O rio estabelece a fronteira entre Brasil, Peru (Iñapari), Bolívia (Bolpebra). Os três países são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose mucosa no mundo, enquanto que Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose cutânea (WHO, 2014). Cesário, Cesário e Andrade-Morrave (2011) explica que a tríplice fronteira (Brasil-Peru-Bolívia) merece atenção no monitoramento eco-epidemiológico de leishmaniose pelo intenso fluxo migratório, principalmente nos últimos anos após a construção da Rodovia do Pacífico; e também por abranger países vizinhos que apresentam alta incidência de LTA como Madre de Dios/ Peru (Figura 12) com registros de 38 casos/ 10.000 habitantes no período de 2000 a 2012 (PERU, 2012) e Pando/ Bolívia com registros de 67,4 casos/ 10.000 habitantes no ano de 2008 (Figura 13) (REYES; HERBAS, 2012).

Dados epidemiológicos do Peru mostram que as espécies de *Leishmania* circulantes são: *Le. (V.) braziliensis*, *Le. (V.) peruviana* (Velez, 1913), *Le. (V.) guyanensis*, *Le. (V.) lainsoni* e *Le. (Le.) amazonensis* (Figura 14) (LUCAS et al., 1998). Na Bolívia, com exceção da *Le. (V.) peruviana*, todas essas espécies já foram encontradas (GARCIA et al., 2009). Sendo os principais vetores no Peru *Lu. peruensis* (Shannon, 1929), *Lu. verrucarum* (Townsend, 1913) e *Lu. ayacuchensis* Cáceres & Galati, 1988 (PERU, 2012). Enquanto que na Bolívia são descritos como prováveis vetores de *Leishmania*: *Lu. carrerae carrerae* (Barretto 1946), *Lu. llanosmartinsi* (Fraiha, Ward, 1980), *Lu. yucumensis* (Le Pont, Caillard, Tibayrenc, Desjeux, 1986), *Lu. nuneztovari anglesi* (Le pont & Desjeux, 1984), *Lu. shawi* Fraiha, Ward. & Ready, 1973, *Lu. ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940), *Lu. flaviscutellata*, *Lu. neivai* e *Lu. longipalpis* (GARCIA et al., 2009).

Os dados evidenciados nas Figuras 12 e 13 destacam a elevada incidência de LTA na região de fronteira de Assis Brasil (Madre de Dios/ Peru e Departamento de Pando/ Bolívia) e mostram a importância do município na epidemiologia da LTA no Brasil.

Figura 11 – Incidência de Leishmaniose cutânea e mucosa no Peru em 2012.

Fonte: Shender et al. (2014).

Figura 12 – Incidência de LTA na Bolívia no período de 2006.

A) Apresentação dos departamentos da Bolívia. B) Estratificação dos municípios de acordo com a incidência. Fonte: Garcia et al. (2009).

Figura 13 – Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* do Peru.

Fonte: Lucas et al. (1998).

1.8 Controle e Prevenção da LTA

Conhecer os fatores epidemiológicos em áreas onde há focos ativos de LTA em nosso país é de fundamental importância para o estabelecimento de medidas eficazes de controle da doença. Marzochi e Marzochi (1994) explicam que a seleção de estratégias adequadas para cada região geográfica, depende da análise epidemiológica descritiva considerando os seguintes dados:

- a) origem dos casos humanos, incluindo a forma clínica da doença e do gênero, idade e as viagens de pacientes;
- b) estudos epidemiológicos para conhecimento da dinâmica de transmissão (transmissão domiciliar/ peridomiciliar e extradomiciliar) para isso deve-se incluir os estudos entomológicos para definir os principais vetores associados à transmissão (dispersão, antropofilia, zoofilia e o grau de infecção natural); além dos estudos de reservatórios envolvidos (animais domésticos e não domésticos);
- c) estudos sobre a caracterização das espécies de agente etiológico circulantes no foco de transmissão que podem melhorar a complementação diagnóstica e prognóstica, pois algumas cepas induzem alterações cutâneas não complicadas, enquanto outras são capazes de induzir lesões evolutivas, disseminando-se por todo o corpo ou comprometer secundariamente a região nasofaríngea;
- d) estudos sobre a avaliação de fatores socioeconômicos e ambientais que favorecem a presença, adaptação ou aumento dos potenciais vetores de flebotomíneos, incluindo áreas urbanas, periurbanas, rurais e florestais, a fim de investigar as possibilidades de situações de risco e monitoramento.

Independente dos padrões epidemiológicos de transmissão de leishmaniose, são consideradas medidas básicas: a vigilância clínica, laboratorial e notificação dos casos, tratamento dos pacientes e monitoramento entomológico principalmente em casos de suspeita de transmissão no ambiente domiciliar (BRASIL, 2010). No entanto, algumas medidas de controle diferenciais podem ser introduzidas quando se conhece o perfil da área de transmissão. A esse exemplo, nas áreas de transmissão silvestre, onde o combate aos insetos e reservatórios silvestres é inviável, são recomendáveis cuidados individuais como o uso de repelentes e proteção por roupas, construção de moradias distantes, mais de 400 metros dos limites florestais, além do controle dos vetores nas casas por meio do uso de inseticidas,

mosquiteiros e telagem de portas e janelas. Em áreas de transmissão rural também é indicado construção de depósitos agrícolas e abrigos de animais domésticos longe dos domicílios; o combate aos roedores sinantrópicos nesses depósitos e manutenção de limpeza em torno do domicílio. Enquanto que em áreas de transmissão periurbana está indicada o georreferenciamento das áreas de ocorrência de casos suspeitos, identificação de animais domésticos infectados e eutanásia dos mesmos, vacinação e uso de coleiras inseticidas caninas, controle dos vetores com inseticidas nos domicílios e abrigos de animais, vigilância entomológica de áreas públicas (parques, praças e terrenos arborizados) e a triagem diagnóstica de leishmaniose em doadores de sangue e órgãos de áreas endêmicas (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MARZOCHI et al., 2014).

Dessa maneira, para que medidas mais eficazes de prevenção e controle das leishmanioses sejam bem desenvolvidas, devem ser enfatizadas as ações de equipes multiprofissionais e multi-institucionais que visem acompanhamentos de longo prazo instituindo ações de interesse sanitário, educação continuada em saúde, vigilância ambiental e epidemiológica. Levando-se em consideração os aspectos políticos de planejamento urbano e crescimento populacional, principalmente nas periferias das cidades (MARZOCHI et al., 2014). Nesse contexto, o Acre passa por um crescimento populacional nos últimos anos e esse cenário pode desempenhar um papel importante na disseminação da LTA e mudanças no comportamento epidemiológico da doença na região.

Assis Brasil figura entre os principais focos amazônicos de LTA. No entanto, existem lacunas de informações sobre os aspectos epidemiológicos, clínicos, vetoriais e espécies de *Leishmania* spp. circulantes nessa e entre as várias microrregiões do estado, o que dificulta a adoção de medidas eficazes de controle da endemia na região. O controle desta endemia no município de Assis Brasil faz-se a partir da busca ativa e passiva de casos suspeitos de LTA, que são confirmados na maioria das vezes através de história clínica, diagnóstico por Intradermoreação de Montenegro e exame parasitológico direto (OLIART-GUZMÁN et al., 2013).

O panorama com elevada prevalência de LTA no município aliado a escassez de recursos para controle e atenção às comunidades afetadas, torna imperativa a necessidade de estudos que compõem a cadeia epidemiológica dessa doença no município. O trabalho relaciona, pela primeira vez, vetores e agentes etiológicos presentes nos hospedeiros desta região de fronteira do Acre.

Dessa maneira, os dados desse estudo podem contribuir para uma melhor compreensão da transmissão da LTA na região, com clareza sobre a distribuição geográfica

dos potenciais vetores e patógeno. Além disso, propõem tendências do perfil epidemiológico da doença, e traz informações consistentes capazes de auxiliar estudos futuros e o aperfeiçoamento das medidas de controle desta endemia na área de estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente estudo visa determinar a composição faunística de flebotomíneos no município de Assis Brasil e identificar a variedade de espécies de *Leishmania spp.* que circulam nesta área endêmica do Acre.

2.2 Específicos

- Identificar a fauna flebotomínica e estimar sua riqueza coletada no município de Assis Brasil - AC;
- Assinalar quais os potenciais vetores da LTA na região de Assis Brasil;
- Estimar a taxa de infecção natural por *Leishmania sp.* em flebotomíneos através da técnica de PCR utilizando os iniciadores dirigidos para a região conservada do minicírculo de kDNA;
- Identificar os possíveis complexos de *Leishmanias* (*Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania donovani*) e espécies do parasito nas fêmeas de flebotomíneos utilizando a técnica de PCR selecionada para diferentes alvos moleculares (*spliced leader* e gene *hsp70*);
- Caracterizar as espécies de *Leishmania spp.* a partir do DNA de biópsias de lesões de pacientes com LTA.
- Caracterizar o perfil epidemiológico de pacientes com LTA atendidos no Posto de Saúde de Assis Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área e população de estudo

O município de Assis Brasil (Figura 7 e Figura 15) está localizado na mesorregião do Vale do Acre (10°56'29"S e 69°34'01"O), estado do Acre, ocupa uma área de 4.974 km² e está situado a 330 km a leste de Rio Branco. Localiza-se na tríplice fronteira Brasil/Peru/Bolívia (Acre-BR, Madre de Dios-PE e Pando-BO), junto à margem esquerda do rio Acre. O clima é equatorial, quente e úmido. Apresenta uma estação chuvosa entre novembro e abril, e uma estação seca entre maio e outubro (IBGE, 2014). No período de seca são formadas extensas áreas de praias ao longo do rio Acre, enquanto que na estação chuvosa muitos ramais (estradas não pavimentadas) da zona rural tem seu acesso prejudicado (Figura 16). A temperatura média anual é de 26,5 °C, a umidade relativa do ar é de 80-90% durante o ano todo (ACRE, 2008).

Segundo IBGE (2014) no início da década de 90 a população de Assis Brasil era de 2.917 e a estimativa para 2014 é de 6.610. Aproximadamente 40% da população de Assis Brasil ainda vive na zona rural (IBGE, 2014). Essa permanência de uma população tão significativa na área rural destoia da tendência nacional. Na capital Rio Branco menos de 10% da população permanece no campo e no Brasil o percentual está na faixa de 17%.

O município possui a paisagem formada por um mosaico de terras indígenas, reservas extrativistas, pequenas e grandes propriedades rurais, e está passando por transformações em suas dimensões física e social, com a pavimentação de rodovias (Rodovia do Pacífico) e consequente viabilização de migração e aumento do trânsito de pessoas (ACRE, 2008). Assis Brasil possui unidades de conservação como Estação Ecológica do Rio Acre e parte da maior Reserva Extrativista do Brasil a Reserva Extrativista Chico Mendes - RECM (presente também nos municípios Brasiléia, Etipaciolândia, Capixaba, Xapuri e Sena Madureira) (Anexo A). A RECM está dividida em 45 Seringais e com uma população estimada de 12.000 habitantes distribuídos nos seis municípios. O Bioma predominante é a floresta tropical aberta (ACRE, 2008). De acordo com os dados da FUNASA a população ribeirinha de Assis Brasil, é de aproximadamente 700 pessoas, distribuídas em sete localidades ao longo do rio Acre, em 180 casas. No município são reconhecidas três Terras Indígenas (TI): TI Mamoadate, Cabeceiras do Rio Acre e Manchinieri do Seringal Guanabara.

A produção extrativista (castanha, látex, óleos vegetais e frutas silvestres) é uma característica econômica da região, mas também se pratica a criação de gado em pequena escala (carne e leite), agricultura de subsistência (café, milho e arroz) e pequena exploração madeireira, fazendo uso do sistema itinerante de corte e queima da floresta (ACRE, 2008). A coleta de castanha do Pará saltou de seis toneladas em 2004 para 180 toneladas em 2010.

Figura 14 – Vista das áreas urbanas e rurais de Assis Brasil, Acre, 2012.

- A) Vista da entrada e área urbana do município de Assis Brasil. B) Área rural, estrada não pavimentada (Ramal) São Francisco. C) Área rural, Escola Francisco Menezes de Araújo com densa vegetação nas suas proximidades. (Foto: Carolina Teles, 2012).

Figura 15 – Rio Acre e estrada não pavimentada do município Assis Brasil, AC, no período de seca e chuva.

A) Banco de areia e galhadas formadas pelo assoreamento e baixo nível das águas do rio Acre durante a estação de seca (setembro de 2009). B) Ramal São Francisco com precárias condições de tráfego durante a estação chuvosa (novembro 2009). (Foto: Walkyria Ramos, 2009).

3.2 Captura e identificação de flebotomíneos

Os flebotomíneos foram coletados com armadilhas de luz CDC (*Center on Disease Control*) instaladas a 150 cm do chão no período de 18h às 6h, entre os meses de agosto de 2009 a junho de 2010. As coletas foram realizadas em localidades rurais em três ramais (estradas não pavimentadas) conhecidos como Ramal Irecê, Ramal São Francisco, Ramal do Museu e na margem esquerda do Rio Acre - Mata ciliar (Quadro 1 e Figura 17).

Na época da seca (abril a setembro) as capturas foram realizadas nos ambiente de ramal de acordo com a acessibilidade das estradas e relatos de casos recentes de LTA (Figura 17), enquanto que na época de chuva (outubro a março), período de cheia, as coletas aconteceram em quatro pontos fixos (localidade) na mata ciliar a margem esquerda do Rio Acre. Em cada ponto de coleta foram instaladas 3-5 armadilhas (Quadro 2) com uma distância de aproximadamente 200 metros entre elas. Todas as armadilhas foram instaladas durante 5-8 noites consecutivas por mês em cada ambiente. A amostragem geral consistiu de 49 visitas com um total de 780 armadilhas CDC instaladas. No ambiente de ramal foram efetuadas 26 visitas totalizando 448 armadilhas, enquanto que na margem esquerda do rio Acre foram efetuadas 23 visitas totalizando 332 armadilhas (Quadro 2).

Quadro 1 – Coordenadas dos pontos de capturas de flebotomíneos nos ambientes de ramal e mata ciliar no município de Assis Brasil, AC.

Ambiente	Coordenadas
Ramal Irecê	Ponto 1 (10°53'40.55"S/ 69°36'2.53"O)
	Ponto 2 (10°53'3.35"S/ 69°35'25.95"O)
	Ponto 3 (10°52'46.11"S/ 69°35'12.81"O)
Ramal São Francisco	Ponto 1 (10°56'49.5"S/ 69°38'17.4"O)
	Ponto 2 (10°55'49.40"S/ 69°38'49.96"O)
	Ponto 3 (10°55'52.4"S/ 69°38'38.6"O)
	Ponto 4 (10°55'22.6"S/ 69°38'36.0"O)
Ramal do Museu	Ponto 1 (10°56'0,95"S/ 69°31'33,54"O)
	Ponto 2 (10°56'4.49"S/ 69°30'45.71"O)
	Ponto 3 (10°55'46.97"S/ 69°29'47.54"O)
	Ponto 4 (10°55'58.30"S/ 69°29'11.07"O)
Mata Ciliar	Ponto 1 (10°58'09.4"S/ 69°43'07.8"O)
	Ponto 2 (10°56'4.49"S/ 69°30'45.71"O)
	Ponto 3 (10°55'46.97"S/ 69° 29'47.54"O)
	Ponto 4 (10°55'58.30"S/ 69°29'11.07"O)

Nota: S: Sul; O: Oeste.

Quadro 2 – Esforço amostral das coletas de flebotomíneos em Assis Brasil, AC.

Ambiente (Período)	Visitas (dias)	Nº de Pontos	Armadilhas/ Ponto	Armadilhas Totais
Ramal Irecê (Agosto/ 2009)	8	3	5	120
Ramal São Francisco (Setembro/ 2009)	8	4	4	128
Ramal do Museu (Abril/ 2010)	5	4	5	100
(Junho/ 2010)	5	4	5	100
Mata Ciliar – Rio Acre (Novembro/ 2009)	8	4	3	96
(Dezembro/ 2009)	8	4	3	96
(Fevereiro/ 2010)	7	4	5	140
Total	49	27	--	780

Figura 16 – Mapa do Brasil destacando o estado do Acre, localização da sede municipal de Assis Brasil e pontos de coletas de flebotomíneos.

As imagens de satélite foram obtidas através do Google Earth (maio de 2010).

Os pontos próximos dos ramais foram caracterizados por áreas rurais próximas, a pelo menos 800 metros de domicílios com criação de animais (como galinhas, porcos, cachorros e

bovinos) (ver Anexo B) com paisagem predominante de fragmentos florestais alterados e em regeneração (Figura 18). Os pontos 1-3 do ambiente de mata ciliar do rio Acre apresentavam vegetação nativa composta por floresta Ombrófila contínua e o ponto 4 era ambiente de peridomicílio (casa com criação de animais) localizado em fragmento florestal próximo a uma residência de ribeirinhos (Figura 19).

Figura 17 – Ambiente de captura no Ramal do Museu (ponto 4) com fragmentos florestais alterados em área do município Assis Brasil, no período de abril de 2010 e junho de 2010.

Figura 18 – Ambientes de captura na mata ciliar do rio Acre, Assis Brasil, no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010.

A) Ponto 1 com características de floresta Ombrófila nativa contínua. B) Casa de ribeirinho localizada no ponto 4 onde foram realizadas as coletas em ambiente peridomiciliar e extradomiciliar.

Após a retirada das armadilhas, os flebotomíneos foram separados por sexo e armazenados em tubos com etanol 70% contendo informações do local de coleta, data e ambiente. Antes de serem montados em lâminas no laboratório do Instituto de Ciências

Biomédicas 5 (ICB-5), os machos foram diafanizados utilizando Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% por 4 horas, em seguida lavados com solução de ácido acético a 10% e água corrente e montados inteiros entre lâmina e lamínula contendo fluído de Berlese com observação em lupa. As fêmeas capturadas foram dissecadas, sendo a cabeça e os três últimos segmentos do abdômen clarificados igualmente aos machos e montadas na posição dorso-ventral em lâminas de Berlese; e o restante do corpo foi armazenado no microtubo contendo etanol 70% para a posterior extração de DNA e pesquisa de infecção natural através de PCR. Os espécimes foram identificados no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus – AM, através da observação morfológica de estruturas internas e externas com a utilização de microscópio óptico no aumento de 40x seguindo a classificação proposta por Young e Duncan (1994).

3.3 Extração de DNA de fêmeas de flebotomíneos

As fêmeas de flebotomíneos foram agrupadas (2-20 indivíduos) em 368 *pools* considerando as espécies, mês e pontos de coleta para a extração de DNA de acordo com Mukhopadhyay et al. (2000) e Paiva et al. (2007). Em cada *pool* armazenado em microtubo de fundo cônico de 1,5 mL foi adicionado 20 µL de tampão STE (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0) para *pools* de até dez indivíduos e 35 µL nos microtubos acima de dez indivíduos. A solução foi incubada a 95 °C por 10 minutos. Posteriormente, foram macerados com o auxílio de um homogeneizador e foram adicionados mais 20 µL (até dez fêmeas/ *pool*) ou 35 µL (acima de dez fêmeas/ *pool*) de tampão STE. Esse macerado foi novamente incubado a 95 °C por 10 minutos e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e transferido para um novo microtubo, onde 0,1 volume de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto gelado foram acrescentados e a mistura foi mantida a -20 °C por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos e o precipitado lavado em etanol 70% sob as mesmas condições de centrifugação. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi mantido à temperatura ambiente para evaporação do etanol. Após a secagem, o DNA foi solubilizado em 20 µL de água ultrapura estéril. A pureza e concentração de DNA foram determinadas através de espectrofotometria a 260/ 280 nm em um Nanodrop NanoVue Plus (GE Healthcare, Japan, Tokyo, Japan). As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C até o momento de uso na reação de PCR.

Flebotomíneos machos foram utilizados como controle negativo para PCR e para o controle positivo foram utilizados flebotomíneos machos mais cepas de referência de *Leishmania* sp. provenientes da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC/ FIOCRUZ (Tabela 1). As formas promastigotas de cada cepa de referência foram mantidas a 24 °C em meio de cultura Schneider Himedia (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) suplementado com 10% de soro fetal bovino Gibco (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 2% de urina humana filtrada e 50 µg/ mL de gentamicina até sua estabilização e após, mantida em freezer -80 °C.

Tabela 1 – Cepas de referência de *Leishmania* provenientes da CLIOC/ FIOCRUZ utilizadas para controle de qualidade nesse estudo.

Cepas	Código de Referência
<i>Le. (V.) braziliensis</i>	IOCL 566
<i>Le. (V.) guyanensis</i>	IOCL 565
<i>Le. (V.) lainsoni</i>	IOCL 1023
<i>Le. (V.) naiffi</i>	IOCL 1365
<i>Le. (V.) shawi</i>	IOCL 1545
<i>Le. (Le.) amazonensis</i>	IOCL 575
<i>Le. (Le.) chagasi</i>	IOCL 0579

3.4 Alvos moleculares para detecção de DNA de *Leishmania*

Para a detecção da infecção de flebotomíneos por *Leishmania* através de PCR foram utilizados três diferentes alvos moleculares conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3 – Descrição dos alvos moleculares utilizados para detecção de DNA de *Leishmania*.

Alvo Molecular	Produto PCR	Referência
Minicírculo do DNA cinetoplasto (<i>mkDNA</i>)	120pb	Oliveira et al. (2005)
Gene RNA mini-exon <i>Spliced leader (SL)</i>	<i>C. braziliensis</i> : 146-149pb <i>C. mexicana</i> : 218-240pb <i>C. donovani</i> : 351-397pb	Harris et al. (1998)
Proteínas de Choque térmico 70 (<i>hsp70</i>)	234pb	Da Garça et al. (2012)

Nota: C: Complexo

3.4.1 PCR dirigida para o gene *mkDNA*

A amplificação para o gênero *Leishmania* foi feita através da técnica PCR utilizando os iniciadores 5'-GGG(GT)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA-3' e 5'-(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3' dirigidos para a região conservada do minicírculo de kDNA entre todas as espécies de *Leishmania* sp. (fragmento de 120pb) de acordo com Oliveira et al. (2005). A reação foi preparada e adaptada de acordo com a Tabela 2. A amplificação foi processada em aparelho termociclador Veriti (Applied Biosystems, Califórnia, USA), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95 °C por cinco minutos, seguido de 40 repetições de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto 30 segundos. A extensão final foi a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 2 – Descrição da reação utilizada para a PCR *mkDNA*.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
PCR Buffer Green (GoTaq)	2,5	1X
MgCl ₂ (Invitrogen)	0,75	2 mM
dNTP mix (Invitrogen)	0,50	0,2 mM
<i>Primer mkDNA</i>	0,38 de cada <i>primer</i>	1 pmol
Taq (1,25 U) (Invitrogen)	0,25	1 uni
H ₂ O Mili-Q	Qsp p/ 25	-----
DNA	2,5	-----
Volume total	25	-----

Nota: Buffer Green GoTaq (Promega Corporation, Madison, WI, USA); Invitrogen (Invitrogen life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

3.4.2 PCR Multiplex dirigida para o Gene RNA mini-exon Spliced leader (SL)

Para determinar os possíveis complexos de *Leishmania* envolvidos na infecção, as amostras de DNA positivas para a PCR de *mkDNA* foram analisadas através de uma segunda técnica, a PCR Multiplex, com os iniciadores específicos para o gene RNA mini-exon SL. Essa reação de amplificação é capaz de diferenciar simultaneamente na mesma amostra os três principais complexos de *Leishmania*: *Leishmania mexicana*, *Le. braziliensis* e *Le. donovani* (HARRIS et al., 1998). Os complexos se distinguem em *primers* com iniciadores distintos para cada complexo de *Leishmania*, com as seqüências: complexo *Leishmania braziliensis* LB-3C 5'-CGT(C/G)CCGAACCCCGTGTC-3'; complexo *Leishmania mexicana* LM-3A 5'-GCACCGCACCGG(A/G)CCAC-3'; complexo *Leishmania donovani* (LC-3L) 5'-GCCCCGCG(C/T)GTCACCACCAT-3' e uma seqüência conservada aos três complexos LU-5A 5'-TTTATTATGCGAAACTTC-3'.

Para a PCR Multiplex esses *primers* foram misturados simultaneamente na mesma reação contendo o DNA extraído das amostras conforme descrição da Tabela 3. A amplificação foi realizada utilizando um termociclador Veriti nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 54 °C por 55 segundos (hibridização dos *primers*), 72 °C por 30 segundos (extensão da fita), e uma extensão final de 72 °C por cinco minutos.

Tabela 3 – Descrição da reação utilizada para a PCR Multiplex dirigida para gene RNA mini-exon SL de *Leishmania*.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
PCR Buffer Green (GoTaq)	5	1X
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5	1,5 mM
dNTP mix (Invitrogen)	2	200 mM
<i>Primers</i>	0,75 - LU 0,37 - Outros (LB-3C, LM-3A, LC-3L)	0,4 pmol - LU 0,2 pmol - Outros
Taq (1,25 U) (Invitrogen)	0,5	1 uni
H ₂ O Mili-Q	Qsp p/ 50	-----
DNA	5	-----
Volume total	50	-----

Foram considerados positivos os fragmentos amplificados do mini-exon visualizados no gel de agarose (item 3.5) de acordo com os tamanhos especificados no Quadro 3.

3.4.3 PCR específica dirigida para a região *hsp70*

Para a detecção da espécie de *Leishmania* as amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando como alvo o gene da proteína do choque térmico 70 (*hsp70*) cuja reação gera um fragmento de 234pb. Para a amplificação foram empregados os iniciadores Hsp 70cF 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e Hsp 70cR 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3' de acordo com Da Graça et al. (2012). O mix da reação foi preparado de acordo com a Tabela 4 e a amplificação foi realizada utilizando termociclador Veriti com desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 61 °C por 1 minuto, 72 °C por três minutos, e extensão final de 72 °C por oito minutos.

Os produtos obtidos dessa amplificação foram visualizados no gel de agarose (item 3.5).

Tabela 4 – Descrição da reação utilizada para a PCR *hsp70* de *Leishmania*.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
PCR Buffer Green (GoTaq)	5	1X
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5	1,5 mM
dNTP mix (Invitrogen)	2	200 mM
<i>Primers</i>	1 de cada <i>primer</i>	1 pmol
Taq (1,25 U) (Invitrogen)	0,5	1 uni
H ₂ O Mili-Q	Qsp p/ 50	-----
DNA	5	-----
Volume total	50	-----

3.5 Eletroforese dos produtos de PCR

As análises dos produtos de PCR para os alvos *mkDNA*, gene mini-exon SL e *hsp70* foram feitas em gel de agarose a 2% diluída em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,004M; EDTA 0,001M, pH 8). Em cada canaleta foi aplicado 10 µL da mistura contendo 6 µL da amostra corada com 4 µL de GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 1kb Invitrogen, conforme instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram submetidas a eletroforese em tampão de corrida TAE 1X com uma corrente constante aplicada de 100 volts por, aproximadamente 20 minutos. A imagem de cada gel foi registrada em fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Japan, Tokyo, Japan).

3.6 RFLP dos produtos da PCR da região *hsp70*

Os produtos da PCR *hsp70* foram submetidos à restrição enzimática pelas enzimas *HaeIII* (*Haemophilus aegyptius*) e *Bstul* (*Bacillus stearothermophilus*) e os resultados interpretados segundo Da Graça et al. (2012).

O mix da reação para digestão pela enzima *HaeIII* Invitrogen foi realizado nas seguintes concentrações: 34 µL de água Mili-Q, 5 µL de tampão recomendado pelo fabricante, 1,0 U da

enzima *HaeIII* e 10 µL do produto amplificado *hsp70*. Para a enzima *Bst*uI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) o mix foi realizado de acordo com as seguintes concentrações: 7 µL de água Mili-Q, 2 µL de tampão recomendado pelo fabricante, 1,0 U da enzima *Bst*uI e 10 µL do produto amplificado. As soluções foram incubadas *overnight* em diferentes temperaturas: 37 °C para as amostras digeridas pela *HaeIII* e 60 °C para as amostras digeridas pela *Bst*uI.

Os produtos obtidos pela PCR-RFLP *hsp70* foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 12% revelados pela prata (Figura 20). Foram aplicados 8 µL da mistura contendo 5 µL do produto de restrição e 3 µL do tampão de amostra Bluejuice 5x em cada canaleta do gel de poliacrilamida não desnaturante, aplicando-se uma corrente de 100 volts por aproximadamente 2 horas com tampão de corrida TAE 1X. Para a confirmação do tamanho das bandas foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb, conforme instruções do fabricante. Os géis foram fixados por 5 minutos sob agitação suave em uma solução contendo metanol, ácido acético e água destilada na proporção 40:10:50 v/v. Posteriormente, foi adicionado 1,5% de nitrato de prata (AgNO_3) e mantido sob agitação por mais 5 minutos. Após a impregnação pela prata, os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e a revelação foi finalizada com uma solução de NaOH 0,75M e formaldeído 0,1M diluídos em água destilada com agitação até a visualização das bandas. Em seguida, os géis foram lavados em água deionizada, transferidos para a solução fixadora de metanol e analisados em fotodocumentador ImageQuant LAS 4000.

Figura 19 – Produtos amplificados de *hsp70* após digestão pelas enzimas *HaeIII* e *Bst*uI de linhagens de referência cedidas pelo CLIOC isoladas de cultura.

CN: Controle negativo; La: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; Lg: *Leishmania (Viannia) guyanensis*; Lb: *Le. (V.) braziliensis*; Ll: *Le. (V.) lainsoni*; Ln: *Le. (V.) naiffi*; Ls: *Le. (V.) shawi*. M: Marcador de peso molecular 100 pb.

3.7 Reação de sequenciamento dos produtos da PCR *hsp70*

Para a confirmação das espécies de *Leishmania*, os produtos da amplificação obtidos pela PCR *hsp70* (234 pb) com rendimento de DNA satisfatório (20 ng/ 5µL) foram submetidos ao processo de purificação e sequenciamento de DNA de uma das fitas através da empresa Genomic. De acordo com a empresa os produtos da PCR foram sequenciados com o uso do produto BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Brazil, São Paulo, Brasil) no sequenciador automático modelo 3130xl da Applied Biosystems.

Os eletroferogramas obtidos foram previamente analisados e editados através dos programas Pregap4 e Gap4 do pacote *Staden Package* 1.7.0 (BONFIELD; SMITH; STADEN, 1995). Posteriormente foi analisada a identidade e similaridade das sequências obtidas através do BLASTn-*Basic Alignment Search Tool Program for Nucleotides* (ALTSCHUL et al., 1990) comparando com sequências de referência depositadas no NCBI/*GenBank* (disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). O alinhamento dos isolados *hsp70* deste estudo juntamente a sequência de referência de cada espécie de *Leishmania* depositada no *GenBank* foi realizado através do método de múltipla progressão de *Clustal W*

Multiple Alignment (THOMPSON et al., 1994) por meio do programa MEGA4-*Molecular Evolutionary Genetics Analysis – Software Version 4* (TAMURA et al., 2007).

3.8 Pacientes

O estudo da LTA em pacientes baseou-se num modelo epidemiológico descritivo de casos, prospectivo com amostra de conveniência. O diagnóstico da doença foi realizado por médicos no Posto de Saúde de Assis Brasil localizado na zona urbana do município de Assis Brasil, entre agosto de 2012 a dezembro de 2013. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas - USP sob nº 77885/2012. Os critérios de inclusão foram pacientes com hipótese diagnóstica de LTA que concordaram participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Durante o atendimento médico foram coletadas as seguintes informações: sexo, idade, local de moradia (rural ou urbano), tipo de lesão (cutânea, cutânea-mucosa e cutânea difusa), número de lesões, tempo de lesão, se houve recidiva, tratamento utilizado (tipo de fármaco) e se houve evolução para a cura clínica da lesão. Também, foram colhidos informações sobre a ocupação dos pacientes que foram agrupadas em três categorias: rural (como agricultor, pecuarista, peão, professores e estudantes da zona rural), não rural (militar, diarista e motorista) e outras (doméstica, pensionista e crianças).

3.8.1 Biópsias e caracterização do parasito

Foram incluídos nesse estudo 37 pacientes que procuraram espontaneamente atendimento médico, residentes no próprio município e que apresentavam lesões suspeitas para LTA caracterizadas por úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas. Os pacientes foram submetidos ao exame clínico e coletas de biópsias para o diagnóstico histopatológico e amplificação pela PCR (BRASIL, 2010). Duas biópsias foram coletadas da borda da lesão ativa com “punch” de três milímetros (mm) de diâmetro após anestesia local com xilocaína a 2%. Em seguida, um fragmento foi colocado em tampão RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) para posterior extração de DNA realizado no ICB-5 e o outro fragmento foi fixado em formalina 10% para a aplicação de técnicas histopatológicas e diagnóstico realizado no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia.

Os resultados histopatológicos foram categorizados de acordo com os seguintes critérios: a presença de formas amastigotas típicas de leishmania indicando resultado positivo; a ausência de amastigotas, porém descrição de processo inflamatório crônico tardio e formação de granuloma indicando resultado compatível com LTA; e consideradas negativas os diagnósticos de presença de infiltrado inflamatório mononuclear.

O DNA das biópsias humanas foi extraído seguindo as recomendações do kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e posteriormente foi submetido a amplificação pela PCR *mkDNA* para identificação do gênero *Leishmania* de acordo com Oliveira et al. (2005) (Ítem 3.4.1). Para a identificação dos complexos de *Leishmania* sp. foi utilizada a metodologia descrita no ítem 3.4.2 e a identificação das espécies foi utilizada a metodologia PCR-RFLP *hsp70* descrita anteriormente por Da Graça et al. (2012) (Ítem 3.4.3 e 3.6). Uma amostragem de cada espécie de *Leishmania* obtida foi submetida ao sequenciamento de DNA de acordo com o ítem 3.7.

3.9 Estimador de intensidade de Kernel

Utilizou-se o estimador de densidade de Kernel para identificar visualmente quais as localidades que apresentavam aglomerados espaciais de casos de LTA. Foram construídas três imagens considerando a distribuição dos casos de LTA notificados em Assis Brasil (Figura 11), os casos positivos desse estudo (Figura 31) e os *pools* de flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp. (Figura 27).

Foi incluído nessa análise um total de 213 casos de LTA notificados no período de 2010 a 2013, registrados pela Vigilância Epidemiológica municipal. As localidades onde estavam localizadas as residências dos 213 casos de LTA foram plotadas no campo do mapa considerando um ponto de referência para cada localidade (por exemplo, escola, núcleo de base ou associações de referência dos Seringais) com o auxílio de Sistema de Posicionamento Global (GPS). As mesmas coordenadas foram utilizadas para cada localidade referente aos casos de LTA desse estudo. As coordenadas foram exportadas para o programa de análise espacial de acesso público TerraView 4.1.0 (INPE, 2014), para posteriormente proceder a análise de densidade Kernel.

Para a investigação entomológica dos *pools* de flebotomíneos infectados por *Leishmania* sp. foram utilizadas as coordenadas de cada ponto de coleta nos ambientes de ramal e mata ciliar. Não foi aplicado o modelo “lineares generalizados” para análise de riscos.

3.10 Análise de dados

Uma análise descritiva foi realizada para expor os resultados de levantamento de fauna de flebotomíneos. Curvas de acumulação de espécies (SAC) foram construídas para representar o número acumulado de espécies em função do esforço amostral. Essa análise é usada para medir a diversidade de espécies em uma determinada comunidade. A análise foi realizada com o pacote Vegan utilizando o método random proposto por Gotelli e Cowell (2001). Para tanto, o método calcula a SAC média e seu desvio padrão para permutações dos dados de cada localidade.

Posteriormente foi calculado o índice de diversidade de cada área (i.e Ambiente de ramal e mata ciliar) através da função “*diversity*”. Nesse caso foi utilizado o índice de diversidade de Simpson (D) cujo algoritmo é 1-D. Esse índice leva em consideração a abundância relativa de cada espécie na amostra. O índice de Simpson varia de 0 a 1, sendo que para valores próximos de 1 a diversidade é maior (KREBS; HICKMAN; HICKMAN, 1994).

Para comparar a dissimilaridade da composição de espécies de flebotomíneos entre as áreas foi realizada a técnica de Escalonamento Multidimensional não Paramétrico (NMDS) seguido pela análise de similaridade (ANOSIM). A análise por NMDS é uma forma útil de reduzir a dimensionalidade dos dados. Para esse método foi construída uma matriz com a distribuição e abundância das espécies em cada ponto de coleta que, posteriormente foram submetidas a uma ordenação cujo teste atribui valores de proximidade ou distância aos eixos ordenados. A fidelidade da análise por NMDS é baseada no valor de *Stress* gerado, cujos valores de referência podem variar: $\leq 0,05$ (excelente), $\leq 0,1$ (Boa ordenação), $\leq 0,2$ (Ordenação Razoável), acima de 0,2 (ordenação inviável – as amostras estão posicionadas aleatoriamente) (BORCARD; GILLET; LEGENDRE, 2011).

A contribuição de cada espécie na similaridade observada entre as áreas foi acessada através da porcentagem de similaridade (SIMPER). Essa análise permite identificar quais foram as espécies mais importantes na determinação do padrão observado (KREBS; HICKMAN; HICKMAN, 1994).

A proporção de vetores em cada localidade foi comparada através de ANOVA utilizando a distribuição de erros Binomial.

Todas as análises foram realizadas no software estatístico gratuito R (R Core Development Team 2013) em nível de significância de 5%.

O programa Pool - screen (KATHOLI et al., 1995) foi usado para estimar a frequência de flebotomíneos infectados com *Leishmania* sp. com um intervalo de confiança (IC) de 95%.

Foi realizada a análise descritiva para expor as variáveis clínico-epidemiológicas dos pacientes com suspeita de LTA. Os resultados obtidos foram apresentados em tabelas ou gráficos incluindo o uso de medidas de tendência central (média, Md = mediana, desvio padrão e Q = quartis), bem como o cálculo de proporções e o intervalo de confiança (IC 95%) para cada variável.

4 RESULTADOS

4.1 Composição faunística de flebotomíneos

Um total de 6.850 flebotomíneos foi coletado, sendo 3.545 machos (51,8%) e 3.305 fêmeas (48,2%), apresentando uma razão de fêmeas/ machos de 0,93. Foram identificadas 66 espécies pertencentes aos gêneros *Brumptomyia*¹ (73 indivíduos – 1%) e *Lutzomyia* (6.777 indivíduos – 99%). No gênero *Lutzomyia* foram identificados os subgêneros: *Trichophoromyia* (2.705 – 39,51%), *Psychodopygus* (1.872 – 27,34%), *Pressatia* (677 – 9,89%), *Nyssomyia* (585 – 8,58%), *Lutzomyia* (181 – 2,64%), *Psathyromyia* (146 – 2,12%), *Evandromyia* (48 indivíduos – 0,7%), *Sciopemyia* (44 – 0,63%), *Pintomyia* (8 – 0,12%), *Viannamyia* (8 – 0,11%), *Micropygomyia* (1 – 0,01%); e nos seguintes grupos: *Aragaoi* (163 – 2,35%), *Verrucarum* (163 – 2,35%), *Saulensis* (119 – 1,74%), *Migonei* (44 – 0,63%), *Oswaldoi* (9 – 0,21%) e *Dreisbachi* (4 – 0,06%) (Figura 21; Tabela 5).

As espécies mais abundantes foram *Lu. auraensis* (38,2% do total coletado), *Lu. davisi* (21,1%), *Lu. choti* (9,8%) e *Lu. shawi* (2,7%) que representaram 71,8% do total. Já as espécies menos abundantes foram: *Lu. micropyga*, *Lu. umbratilis*, *Lu. abonnenci*, *Lu. punctigeniculata*, *Lu. complexa*, *Lu. melloi*, *Lu. peresi* e *Lu. villelai*, que somaram 0,08% do total (Tabela 5).

Foram registradas 16 espécies pela primeira vez para o estado do Acre: *Lu. georgii*, *Lu. tarapacaensis*, *Lu. evangelistai*, *Lu. reducta*, *Lu. christensensi*, *Lu. bispinosa*, *Lu. yucumensis*, *Lu. complexa*, *Lu. melloi*, *Lu. abunaensis*, *Lu. brasiliensis*, *Lu. dreisbachi*, *Lu. andersoni*, *Lu. termitophila*, *Lu. williamsi* e *Lu. wilsoni* (Tabela 5). A distribuição geográfica das espécies encontradas nesse estudo por região do Brasil e nos países vizinhos do município de Assis Brasil está sumarizada no Anexo C.

---

¹Espécies e respectivos autores de descrição – Anexo D

Figura 20 – Distribuição dos subgêneros e grupos do gênero *Lutzomyia* coletados no município de Assis Brasil – AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

Uma nova espécie foi descrita e nomeada de *Lutzomyia naiffi* sp. nov. Freitas & Oliveira (2013); ver Apêndice A com descrição completa Teles et al. (2013b). A nova espécie pertence ao Grupo *Verrucarum* Theodor (1965) cujas principais características descritas foram: fórmula palpal 1.4.(2.3).5, com palpômero 5 (P5) menor que P2 + P3; ascóides simples alongados inseridos próximos e no mesmo nível; fórmula antenal AIII-AXIV2, AXV-AXVI.0; espinhos de Newstead presentes na face interna do P3 implantados no mesmo nível. Estilo ornamentado com quatro espinhos assim distribuídos: três espinhos fortes no 1/3 apical (1 apical, 1 subapical e 1 externo, logo abaixo do subapical), e 1 espinho interno menor e mais delgado implantado na metade de 1/3 médio da estrutura. Presença de cerda espiniforme subapical. Coxito ornamentado por um tufo de aproximadamente 20 cerdas foliáceas e flexíveis agrupadas em forma circular na face interna mediana da estrutura. Seu Parâmero apresenta-se largo até o meio da estrutura, estreitando-se suavemente em direção ao ápice, o qual é dilatado, voltado para cima e revestido de cerdas longas e finas. Edeago cônico, alongado, de ápice delgado, chegando a atingir a metade do comprimento do lóbulo lateral. Ductos ejaculadores longos, delgados e superficialmente estriados, cinco vezes maiores que o comprimento da bomba genital (Figura 22).

Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

(continua)

AMBIENTES										
Gênero	Subgênero/ Grupos	Espécie	Ramal			Mata Ciliar	Total		TOTAL	%
			Irecê	São Francisco	Museu	Rio Acre				
							F/M	F/M		
<i>Brumptomyia</i>		<i>Brumptomyia avellari</i>	-	-	0/13	0/2	0	15	15	0,22
		<i>B. pentacantha</i>	0/3	3/23	0/15	2/1	5	42	47	0,7
		<i>B. sp.</i>	-	-	11/0	-	11	0	11	0,16
<i>Lutzomyia</i>	<i>Evandromyia</i>	<i>Lutzomyia monstrosa</i>	-	-	6/1	-	6	1	7	0,1
		<i>Lu. georgii (a)</i>	-	-	7/0	-	7	0	7	0,1
		<i>Lu. tarapacaensis (a)</i>	-	-	17/6	7/4	24	10	34	0,5
	<i>Lutzomyia</i>	<i>Lu. evangelistai (a)</i>	-	-	4/0	2/0	6	0	6	0,09
		<i>Lu. flabellata</i>	-	0/2	0/4	-	0	6	6	0,09
		<i>Lu. sherlocki</i>	0/14	1/27	55/57	13/2	69	100	169	2,46
	<i>Micropygomyia</i>	<i>Lu. micropyga</i>	-	-	-	0/1	0	1	1	0,01
	<i>Nyssomyia</i>	<i>Lu. antunesi (b)</i>	-	-	77/28	31/0	108	28	136	2
		<i>Lu. flaviscutellata (b)</i>	0/2	-	1/4	2/4	3	10	13	0,19
		<i>Lu. reducta (a,b)</i>	0/3	-	0/1	1/1	1	5	6	0,09

Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

(continua)

AMBIENTES										
Gênero	Subgênero/ Grupos	Espécie	Ramal			Mata Ciliar	Total		TOTAL	%
			Irecê	São Francisco	Museu	Rio Acre				
			F/M	F/M	F/M	F/M	Fêmeas	Machos		
		<i>Lu. richardwardi</i>	5/0	1/0	4/0	35/1	45	1	46	0,67
		<i>Lu. shawi</i>	3/37	4/0	80/16	43/1	130	54	184	2,7
		<i>Lu. umbratilis (b)</i>	-	-	1/0	-	1	0	1	0,01
		<i>Lu. whitmani (b)</i>	0/3	-	67/53	6/0	73	56	129	1,89
		<i>Lu. yuilli yuilli</i>	-	-	51/17	-	51	17	68	1
		<i>Lu. christenseni (a)</i>	-	-	0/2	-	0	2	2	0,03
	<i>Pintomyia</i>	<i>Lu. calcarata</i>	-	-	1/1	0/6	1	7	8	0,12
	<i>Pressatia</i>	<i>Lu. choti</i>	12/2	96/23	19/10	131/380	258	415	673	9,83
		<i>Lu. triacantha</i>	-	1/0	0/3	-	1	3	4	0,06
	<i>Psathyromyia</i>	<i>Lu. abbonenci</i>	-	-	0/1	-	0	1	1	0,01
		<i>Lu. campbelli</i>	-	-	1/1	-	1	1	2	0,03
		<i>Lu. dendrophyla</i>	0/6	0/1	12/70	2/0	14	77	91	1,33
		<i>Lu. lutziana</i>	0/3	-	8/27	0/2	8	32	40	0,58

Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

(continua)

AMBIENTES										
Gênero	Subgênero/ Grupos	Espécie	Ramal			Mata Ciliar		Total	TOTAL	%
			Irecê	São Francisco	Museu	Rio Acre				
			F/M	F/M	F/M	F/M	Fêmeas	Machos		
		<i>Lu. punctigeniculata</i>	-	-	0/1	-	0	1	1	0,01
		<i>Lu. shannoni</i>	-	0/1	5/5	-	5	6	11	0,16
	<i>Psychodopygus</i>	<i>Lu. amazonensis</i>	0/2	1/0	10/7	5/0	16	9	25	0,36
		<i>Lu. ayrozai (b)</i>	-	-	2/0	2/0	4	0	4	0,06
		<i>Lu. bispinosa (a)</i>	-	-	1/0	1/0	2	0	2	0,03
		<i>Lu. carrerae carrerae</i>	1/0	2/0	17/7	15/1	35	8	43	0,63
		<i>Lu. davisi (b)</i>	26/8	58/1	233/121	729/267	1046	397	1443	21,07
		<i>Lu. geniculata</i>	6/0	5/0	12/2	65/22	24	88	112	1,64
		<i>Lu. hirsutus hirsutus(b)</i>	0/5	2/0	21/15	36/11	59	31	90	1,31
		<i>Lu. llanosmartinsi</i>	-	-	0/2	0/2	0	4	4	0,06
		<i>Lu. lainsoni</i>	-	-	1/0	5/1	6	1	7	0,1
		<i>Lu. paraensis (b)</i>	-	-	3/1	1/0	4	1	5	0,07
		<i>Lu. yucumensis (a)</i>	2/0	-	1/0	71/62	74	62	136	2

Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

(continua)

AMBIENTES										
Gênero	Subgênero/ Grupos	Espécie	Ramal			Mata Ciliar	Total		TOTAL	%
			Irecê	São Francisco	Museu	Rio Acre				
			F/M	F/M	F/M	F/M	Fêmeas	Machos		
		<i>Lu. complexa (a,b)</i>	-	-	-	0/1	0	1	1	0,01
	<i>Sciopemyia</i>	<i>Lu. preclara</i>	0/1	-	3/0	6/11	9	12	21	0,3
		<i>Lu. servulolimai</i>	-	9/0	3/1	4/0	16	1	17	0,25
		<i>Lu. sordellii</i>	-	-	1/2	0/3	1	5	6	0,08
	<i>Trichophoromyia</i>	<i>Lu. auraensis</i>	24/16	62/0	146/213	665/1490	897	1719	2616	38,2
		<i>Lu. melloi (a)</i>	-	-	-	1/0	1	0	1	0,01
		<i>Lu. ubiquitalis (b)</i>	5/0	1/0	27/51	4/0	37	51	88	1,3
	<i>Viannamyia</i>	<i>Lu. furcata</i>	-	0/1	6/1	-	6	2	8	0,11
	<i>Grupo Aragaoi</i>	<i>Lu. abunaensis (a)</i>	1/5	-	0/1	0/1	1	7	8	0,11
		<i>Lu. aragaoi</i>	0/16	1/2	30/48	14/41	45	107	152	2,22
		<i>Lu. brasiliensis (a)</i>	-	-	0/3	-	0	3	3	0,04
	<i>Grupo Dreisbachi</i>	<i>Lu. dreisbachi (a)</i>	-	3/0	0/1	-	3	1	4	0,06

Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

(continua)

Gênero	Subgênero/ Grupos	Espécie	AMBIENTES						TOTAL	%
			Ramal			Mata Ciliar		Total		
			Irecê	São Francisco	Museu	Rio Acre		Fêmeas Machos		
			F/M	F/M	F/M	F/M				
	Grupo Migonei	<i>Lu. andersoni (a)</i>	-	-	5/6	-	5	6	11	0,16
		<i>Lu. bacula</i>	-	-	1/4	-	1	4	5	0,07
		<i>Lu. migonei (b)</i>	-	-	1/1	0/1	1	2	3	0,04
		<i>Lu. sallesi</i>	-	-	-	1/1	1	1	2	0,03
		<i>Lu. termitophila (a)</i>	-	-	9/6	-	9	6	15	0,22
		<i>Lu. walkeri</i>	-	-	0/2	3/0	3	2	5	0,07
		<i>Lu. williamsi (a)</i>	-	-	2/1	-	2	1	3	0,04
	Grupo Oswaldoi	<i>Lu. longipennis</i>	0/1	0/1	3/0	0/2	3	4	7	0,1
		<i>Lu. peresi</i>	-	-	0/1	-	0	1	1	0,01
		<i>Lu. villelai</i>	-	-	1/0	-	1	0	1	0,01
	Grupo Saulensis	<i>Lu. saulensis</i>	-	-	45/12	3/1	48	13	61	0,89
		<i>Lu. wilsoni (a)</i>	-	-	46/11	1/0	47	11	58	0,85

Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

(conclusão)

AMBIENTES										
Gênero	Subgênero/ Grupos	Espécie	Ramal			Mata Ciliar	Total		TOTAL	%
			Irecê	São Francisco	Museu	Rio Acre	Fêmeas	Machos		
			F/M	F/M	F/M	F/M				
	Grupo Verrucarum	Lu. nevesi	1/1	3/10	14/11	34/10	52	32	84	1,2
Lu. serrana		0/2	4/4	13/51	1/2	18	59	77	1,12	
Lu. naiffi		-	0/2	-	-	0	2	2	0,03	
Total		86/130	257/98	1084/918	1942/2335	3305	3545	6850	100	

Nota: **F:** Fêmeas; **M:** Machos; “-” ausente; *(a)* Novo Registro para o Estado do Acre; *(b)* Vetores/ vetores suspeitos de LTA (BRASIL, 2010; RANGEL; LAINSON, 2009). A abundância relativa de cada espécie nessa área de estudo foi expressa em porcentagem do total de 6.850 flebotomíneos coletados. Os respectivos autores de descrição das espécies estão no Anexo D.

Figura 21 – *Lutzomyia naiffi* Freitas & Oliveira, 2013.

Holotipo macho. 1. Visualização frontal da cabeça, Barra: 200 µm. 2, Flagelômero II, Barra: 50 µm. 3, Asa, Barra: 500 µm. 4, Terminalia (a, estilo; b, coxito; c, parâmero; d, lobo lateral; e, bomba, ducto ejaculatório e edeago), Barra: 100 µm. 5, Estilo em posição ventral. 6, Tipo do ducto ejaculatório.

Em relação aos ambientes, foi capturado um maior número de flebotomíneos no ambiente de mata ciliar do rio Acre 4.277 flebotomíneos (62,4%) em relação ao ambiente de ramal 2.573 (37,6% do total coletado). A curva de acumulação de espécies (SAC) indicou que, o esforço amostral foi suficiente para estimar a riqueza de espécies de flebotomíneos nas duas áreas de estudo em Assis Brasil; ou seja, foi observado que a partir do ponto oito houve uma estabilidade na curva indicando que o aumento do esforço de coleta não implicou em aumento no número de espécies (Figura 23).

Considerando os dados relacionados aos dois tipos de ambientes de coleta, o índice de diversidade de Simpson (D) mostrou que os pontos situados no ambiente de ramal apresentaram maior riqueza de espécies (valor médio de $D = 0,82$) do que os pontos de ambiente de mata ciliar (valor de médio de $D = 0,52$) (Figura 24). No ambiente de ramal foram encontradas 2.573 indivíduos em 62 espécies sendo mais abundantes *Lu. auraensis* (18,0% do total do ambiente de ramal), *Lu. davisi* (17,4%), *Lu. choti* (6,3%), *Lu. sherlocki*

(6%), *Lu. shawi* (5,4%), *Lu. whitmani* (4,7%) e outras 56 espécies que ocorreram em menor abundância somando um total de 42,2%. No ambiente de mata ciliar foram capturados 4.277 flebotomíneos em 44 espécies sendo as mais abundantes *Lu. auraensis* (51,4% do total do ambiente de mata ciliar), *Lu. davisii* (23,3%), *Lu. choti* (11,9%), *Lu. yucumensis* (3,1%), *Lu. geniculata* (2,0%), *Lu. aragaoi* (1,3%) e outras 38 espécies que somaram um total de 7% .

Figura 22 – Curva de acumulação de espécies de flebotomíneos coletadas no município de Assis Brasil – AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010.

A análise NMDS mostrou uma diferença na composição de espécies entre o ambiente de ramal e o de mata ciliar (*Stress* 0,17) (Figura 25). Essa observação foi confirmada pela análise de ANOSIM ($R = 0,22$; $p = 0,04$). A dissimilaridade total entre as áreas foi de 81,9%, sendo influenciada diretamente pelas espécies mais abundantes, nesse caso *Lu. auraensis* (22,7% de contribuição), *Lu. davisii* (12,8%) e *Lu. choti* (7,6%); e menor contribuição *Lu. whitmani* (2,8%), *Lu. dendrophyla* (2,8%) e *Lu. shawi* (2,7%).

Figura 23 – Índice de diversidade de Simpson dos flebotomíneos coletados em ambientes de ramal e mata ciliar do município de Assis Brasil – AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010.

Figura 24 – Análise da composição de espécies de flebotomíneos indicada por NMDS nos dois ambientes de coletas (ramal e mata ciliar do rio Acre) no município de Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho 2010.

Entre as espécies incriminadas como vetores de LTA, *Lu. davisi*, *Lu. antunesi* e *Lu. whitmani* foram as mais abundantes, e em menor abundância *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta*, *Lu. umbratilis*, *Lu. ayrozai*, *Lu. hirsutus hirsutus*; *Lu. paraensis*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. migonei* e *Lu. complexa* (Tabela 5). Não foi observada diferença significativa na proporção vetores entre os ambientes de ramal e de mata ciliar ($X^2 = 3,82$; $p = 0,06$; $GL = 25$), no entanto, observa-se que as espécies *Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis* e *Lu. whitmani* foram mais frequentes no ambiente de ramal, principalmente no ramal do Museu (Tabela 6), enquanto que *Lu. davisi* foi capturada em densidades elevadas com maior frequência no ambiente de mata ciliar.

Tabela 6 – Frequência dos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* incriminados na veiculação de *Leishmania* separados por ambiente, capturados em Assis Brasil, AC, no período de agosto de 2009 a junho de 2010.

Espécie	Frequência % (espécimes/ total)	
	Ramal	Mata Ciliar
<i>Lu. antunesi</i>	77,2 (105/136)	22,8 (31/136)
<i>Lu. ayrozai</i>	50 (2/4)	50 (2/4)
<i>Lu. complexa</i>	0 (0/1)	100 (1/1)
<i>Lu. davisi</i>	31 (447/1443)	69 (996/ 1443)
<i>Lu. flaviscutellata</i>	53,8 (7/13)	46,2 (6/13)
<i>Lu. hirsutus hirsutus</i>	47,7 (43/90)	52,3 (47/90)
<i>Lu. migonei</i>	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)
<i>Lu. paraensis</i>	80 (4/5)	20 (1/5)
<i>Lu. ubiquitalis</i>	95,4 (84/88)	4,6 (4/88)
<i>Lu. umbratilis</i>	100 (1/1)	0 (0/1)
<i>Lu. reducta</i>	66,7 (4/6)	33,3 (2/6)
<i>Lu. whitmani</i>	95,4 (123/129)	4,6 (6/129)

4.2 Infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

Um total de 3.218 (97,4%) fêmeas de flebotomíneos foi agrupado em 368 *pools* e a PCR *mkDNA* revelou 32 (8,7%) *pools* positivos para o gênero de *Leishmania* spp. (16 *pools* correspondem a *Lu. davisi* e 16 a *Lu. auraensis*) (Figura 26A). *Lu. davisi* apresentou uma prevalência de *pools* flebotomíneos infectados com *Leishmania* spp. de 1,85% (1.026 espécimes examinados, n = 89 *pools* com 73 negativos; 95% CI = 1,08% - 2,99%) enquanto que *Lu. auraensis* foi de 2,05% (853 espécimes analisados, n = 58 *pools* com 42 negativos; 95% CI = 1,13% - 3,36%). A técnica PCR-Multiplex identificou todas as amostras referente ao complexo *Leishmania braziliensis* (Figura 26B).

O maior número de *pools* positivos foi encontrado no ambiente de mata ciliar do rio Acre (28 *pools* - 87,0% abrangendo todos os pontos), sendo a maioria (14 *pools* - 44,0%) formada de flebotomíneos coletados próximos a uma moradia de ribeirinhos (ponto 4 do ambiente de mata ciliar). Por outro lado, somente quatro *pools* positivos (13,0%) foram de flebotomíneos coletados nos pontos 1 e 2 do ramal do Museu (Tabela 7). A Figura 27 apresenta a distribuição dos *pools* de flebotomíneos infectados por *Leishmania* segundo o ponto de coleta pelo estimador de densidade de Kernel. É possível notar a prevalência de *pools* positivos no ambiente de mata ciliar. Os *pools* positivos foram encontrados em quatro meses de coleta: no ano de 2009 nos meses de novembro (6%) e dezembro (12%), e em 2010 nos meses de fevereiro (70%) e abril (12%).

Figura 25 – Produtos de PCR *mkDNA* e PCR Multiplex resultantes dos *pools* de flebotomíneos.

Gel de agarose 2% corado com GelRed. A. PCR *mkDNA*. Linhas 1-3: amostras de *pools* de *Lu. davisi*, Linha 4: *pool* de *Lu. auraensis*, Linha 5: *Le. (Le.) amazonensis* e Linha 6: Machos *Lutzomyia* sp. B. PCR Multiplex para complexos de *Leishmania*. Linha 1: Machos *Lutzomyia* sp., Linha 2 e 5: amostras de *pools* de *Lu. davisi*; Linhas 3 e 4: amostras de *pools* de *Lu. auraensis*; Linha 6: *Le. (V.) braziliensis*; 7: *Le. (Le.) amazonensis*; 8: *Le. chagasi*. M: Marcador de peso molecular 100pb.

Tabela 7 – Distribuição dos *pools* de flebotomíneos positivos para PCR *mkDNA* de acordo com a espécie e ambiente de coleta, no município de Assis Brasil, AC.

Espécie	Ambientes								Total	%
	Ramal do Museu				Mata Ciliar					
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4		
<i>Lu. auraensis</i>	3	1	-	-	9	1	-	2	16	50
<i>Lu. davisi</i>	-	-	-	-	-	3	1	12	16	50
Total	3	1	0	0	9	4	1	14	32	100

Nota: P = pontos de coleta de flebotomíneos.

Figura 26 – Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais onde foram encontrados *pools* de flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp. em Assis Brasil, Acre.

Pontos vermelhos representam os locais de coleta de flebotomíneos, no período de agosto de 2009 a junho 2010. Pontos azuis representam o ponto centróide das localidades com registro dos casos de LTA de acordo com a Agência de Vigilância Sanitária local no ano de coleta 2010.

Através da PCR utilizando como alvo o gene *hsp70* de *Leishmania* spp. e da digestão do fragmento amplificado pelas enzimas *Hae*III e *Bst*uI foram identificadas as espécies de *Leishmania* de 15 *pools* de flebotomíneos (Tabela 8). Duas espécies de *Leishmania* foram identificadas com padrões de restrição igual ao de *Le. (V.) guyanensis* (aproximadamente *Hae*III 190pb/ *Bst*uI 50pb) e *Le. (V.) braziliensis* (*Hae*III 160pb/ *Bst*uI 50pb) (Figura 28). Para *Lu. auraensis* foram encontrados oito *pools* positivos: *Le. (V.) guyanensis* (3 *pools*), *Le. (V.) braziliensis* (1) e *Le. (V.) braziliensis/ Le. (V.) guyanensis* (4). Em *Lu. davis*i foram encontrados sete *pools* positivos: *Le. (V.) guyanensis* (6) e *Le. (V.) guyanensis/ Le. (V.) braziliensis* (1). As outras amostras de flebotomíneos não foram incluídas na digestão pelas enzimas para a identificação da espécie por não apresentarem resultados satisfatórios da reação de *hsp70*, no entanto, foram positivas para o complexo de *Le. braziliensis* através da PCR Multiplex.

Cinco amostras com maior rendimento de DNA amplificado a partir do alvo *hsp70* foram analisadas pela técnica de sequenciamento genético. Todas as amostras positivas para *Le. (V.) guyanensis* de acordo com a PCR-RFLP *hsp70* (3 *pools* correspondente a *Lu. davis*i e 2 *Lu. auraensis*) confirmaram a identificação e apresentaram 95-100% de similaridade com as sequências de *Le. (V.) guyanensis* depositadas no *GenBank* (GU368213.1) (Anexo E).

Tabela 8 – Taxa de infecção dos flebotomíneos por espécies de *Leishmania* e identificação dos parasitos através da PCR *hsp70*.

Espécie	PCR <i>mkDNA</i>	% Infecção	PCR <i>hsp70</i>
	Nº <i>pools</i> positivos/ Nº avaliados		(Nº <i>pools</i>) Identificação <i>Leishmania</i>
<i>Lu. auraensis</i>	16/ 58	2,05%	(1) <i>Le. (V.) braziliensis</i>
		(95% CI = 1,13-3,36%)	(3) <i>Le. (V.) guyanensis</i>
			(4) <i>Le. (V.) guyanensis/ Le. (V.) braziliensis</i>
<i>Lu. davisi</i>	16/ 89	1,85%	(1) <i>Le. (V.) guyanensis/ Le. (V.) braziliensis</i>
		(95% CI = 1,08-2,99%)	(6) <i>Le. (V.) guyanensis</i>

Figura 27 – Produtos amplificados de *hsp70* (234pb) após digestão pelas enzimas *HaeIII* e *Bstul* em amostras de *pools* de flebotomíneos.

Gel de poliacrilamida 12% corado por prata. Linhas 1 e 11: Controle negativo; Linhas 2 e 12: *pool I* de *Lu. auraensis*; Linha 3 e 13: *pool II* de *Lu. davisi*; Linhas 4 e 14: *pool III* de *Lu. auraensis*; Linhas 5 e 15: *pool IV* de *Lu. auraensis*; Linhas 6 e 16: *pool V* de *Lu. davisi*; Linhas 7 e 17: *Le. (V.) braziliensis*; Linhas 8 e 18: *Le. (V.) guyanensis*; Linhas 9 e 19: *Le. (Le.) amazonensis*. M: marcador de peso molecular de 100pb.

4.3 Caracterização de *Leishmania* spp. em pacientes

Um total de 37 amostras de pacientes foram coletadas e caracterizadas, sendo 8,1% (3/37) equivalentes a recidivas. O exame histopatológico da biópsia foi positivo em 75,6% (28/37) dos casos, 10,8% (4/37) mostrou ser compatível com LTA e 13,5% (5/37) das biópsias foram diagnosticadas com infiltrado inflamatório mononuclear.

A PCR *mkDNA* para o gênero *Leishmania* spp. foi positiva nas 37 amostras. A PCR *hsp70* identificou as espécies em 32 (86,4%) amostras: *Leishmania* (V.) *braziliensis* (21/32; 65,6%), *Le. (V.) shawi* (9/32; 28,2%), *Le. (V.) guyanensis* (1/32; 3,1%) e uma infecção mista (1/32; 3,1%) por *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (Le.) amazonensis* na mesma lesão (Figura 29).

Duas amostras humanas de *Le. (V.) braziliensis*, duas de *Le. (V.) shawi* e uma de *Le. (V.) guyanensis* com maior rendimento de DNA amplificado a partir do alvo *hsp70* foram analisadas pela técnica de sequenciamento genético. Todas as amostras sequenciadas confirmaram a identificação da espécie por PCR-RFLP *hsp70* e apresentaram 95-100% de similaridade com as sequências de *Leishmania* spp. depositadas no *GenBank* (Anexo F).

Figura 28 – Produtos amplificados da PCR *hsp70* (234pb) após digestão pelas enzimas *HaeIII* e *Bstul* em amostras de pacientes com suspeita de LTA.

Gel de poliacrilamida 12% corado por nitrato de prata. Linhas 1 e 10: Controle negativo; Linhas 2 e 11: amostra do paciente 01; Linha 3 e 12: amostra do paciente 02; Linhas 4 e 13: amostra do paciente 03; Linhas 5 e 14: amostra do paciente 04; Ls: *Le. (V.) shawi*; Lb: *Le. (V.) braziliensis*; Lg: *Le. (V.) guyanensis*; La: *Le. (Le.) amazonensis*. M: peso molecular de 100pb.

O número de casos de leishmaniose foi predominante nos homens (81,6%; IC95%: 66,1-91,3) (Tabela 9). A idade dos indivíduos com a infecção variou entre 5 e 46 anos (Md=23 anos), sendo que 35,1% dos indivíduos com a doença tinham entre 11 e 20 anos (Figura 30). A maioria dos casos clínicos foi procedente da zona rural (75,7%; IC95%: 60,0-87,4) sendo mais frequente em relação à urbana, e a infecção foi encontrada em maior proporção (70,3%; IC95%: 54,2-83,3) nos pacientes que viviam há mais de três anos na mesma localidade. Quando se avaliou a ocupação profissional, observou-se maior ocorrência de pacientes com ocupação rural (59,4% - 22/37) seguido por ocupação não rural (18,9% - 7/37), já aqueles representados “outras” (doméstica, pensionista e crianças) apresentaram (22,6% - 8/37).

Figura 29 – Distribuição da frequência dos casos de LTA em Assis Brasil, atendidos no período de julho de 2012 a março de 2014, conforme a idade dos pacientes.

Tabela 9 – Perfil epidemiológico de pacientes examinados em Assis Brasil, AC, com lesões cutâneas utilizadas para o estudo de diagnóstico histopatológico e por PCR de *Leishmania*.

Variáveis		Positivo	% (95% CI)
Sexo	Homem	30	81,1 (66,1-91,3)
	Mulher	7	18,9 (8,7-33,8)
Tempo de residência	< 3 anos	11	29,7 (16,7-45,8)
	> 3 anos	26	70,3 (54,2-83,3)
Ocupação	Rural	22	59,4 (43,2-74,3)
	Não-Rural	7	18,9 (8,7-33,8)
	Outras	8	22,6 (10,6-36,9)
Área	Rural	28	75,7 (60,0-87,4)
	Urbana	9	24,3 (12,5-39,9)
Localidades	Seringal Paraguaçu	5	13,5
	Seringal Icuriã	5	13,5
	Seringal São Francisco	4	11
	Seringal Guanabara	3	8
	BR 317	3	8
	Área Urbana	9	24
	Outras	8	22
Espécies Identificadas	<i>Le. (V.) braziliensis</i>	21	65,6
	<i>Le. (V.) shawi</i>	9	28,2
	<i>Le. (V.) guyanensis</i>	1	3,1
	<i>Le. (V.) guyanensis/ Le. (Le.) amazonensis</i>	1	3,1

Entre as oito localidades, três bairros da área urbana somaram nove casos (24%), e na zona rural o Seringal Paraguaçu, Seringal Icuriã, Seringal São Francisco e Seringal Guanabara apresentaram os maiores índices de LTA (13,5%, n=5; 13,5%, n=5; 11%, n=4; 8%, n=3 respectivamente). A Figura 31 ilustra a distribuição espacial dos casos de LTA desse estudo

segundo a localidade de residência através do estimador de densidade de Kernel. Observa-se uma maior densidade dos casos na zona rural margeando a área urbana. As espécies predominantes *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) shawi* foram encontradas em moradores de áreas rurais e urbanas, sendo a primeira com maior distribuição geográfica no município (Figura 32).

Foram observadas 59 lesões em 37 pacientes; 14 pacientes (40%) apresentaram manifestações clínicas com mais de uma lesão (2-6 lesões). Foram encontradas 33 (56%) lesões na perna, 15 (26%) nos braços, 6 (10%) no quadril, 2 (3%) na mão, 2 (3%) na nuca e 1 (2%) nas costas.

O tempo médio de história clínica foi de $55,9 \pm 40,7$ dias ($Q1=30,0$, $Q3=90$ dias, $Md=33$ dias e $n=72,9\%$). A evolução da doença no grupo em estudo teve índice de cura de 97,3% (36/37), abandono do tratamento de 2,7% (1/37) e em 16,2% (6/37) dos indivíduos foram administrados dois ciclos de tratamento com estibogluconato de meglumina, sendo cinco desses infectados por *Le. (V.) braziliensis* e um por *Le. (V.) shawi*.

Figura 30 – Estimador de densidade de Kernel atribuído a localidade dos casos de LTA desse estudo em Assis Brasil, AC.

Coordenadas geográficas foram obtidas de um ponto centróide (ponto azul) da localidade de registro.

Figura 31 – Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* spp. identificadas através da PCR *hsp70* nos isolados de pacientes desse estudo atendidos em Assis Brasil, AC .

Cada símbolo representa um ou mais espécimes coletados numa determinada região. Coordenadas geográficas foram obtidas de um ponto centróide da localidade. 1: Reserva Indígena Mamoadate; 2: Seringal Icuriã; 3: Seringal Guanabara; 4: Seringal São Francisco; 5: Seringal Paraguaçu; 6: Estrada Federal BR 317 km 2; 7: Estrada Federal BR 317 km 10; 8: Estrada Federal BR 317 km 13; 9: Centro urbano; 10: Bairro Cascata; 11: Bairro Bela Vista; 12: Seringal Santa Quitéria.

5 DISCUSSÃO

Atualmente são conhecidas cerca de 927 espécies de flebotomíneos no mundo (SHIMABUKURO; GALATI, 2011), 260 espécies no Brasil e mais de 60% dessa fauna foi encontrada na região Norte (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; CASTELLÓN, 2009; YOUNG; DUNCAN, 1994). Estudos sobre fauna de flebotomíneos realizados na Amazônia ocidental brasileira (estados Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima) apresentam maior diversidade de espécies que estudos desenvolvidos em áreas mais ao leste e oeste da Amazônia (AGUIAR; MEDEIROS, 2003).

O número de espécies encontradas nesse trabalho (66 espécies) foi maior do que registrada por outros autores no estado do Acre: Martins e Silva (1964) assinalaram 30 espécies de flebotomíneos com predomínio de *Lu. nevesi* e Arias e Freitas (1982) em um trabalho realizado nos municípios de Cruzeiro do Sul, Feijó e Rio Branco, identificaram 50 espécies, sendo *Lu. auraensis* a mais abundante. Azevedo et al. (2008) identificaram nos municípios de Bujari, Xapuri e Rio Branco 52 espécies, sendo 67% delas *Lu. auraensis*, *Lu. antunesi*, *Lu. whitmani* e *Lu. davisii*. Silva-Nunes et al. (2008) no município de Acrelândia, observaram *Lu. antunesi* (45%) e *Lu. whitmani* (15%) como as mais representativas das 40 espécies coletadas. E Araújo-Pereira et al. (2014) no município de Rio Branco capturaram 23 espécies de flebotomíneos com 53,3% *Lu. auraensis* e 18,8% *Lu. whitmani*.

Nesse trabalho foram registradas pela primeira vez no Acre as espécies *Lu. reducta*, *Lu. georgii*, *Lu. melloi*, *Lu. tarapacaensis*, *Lu. williamsi*, *Lu. abunaensis*, *Lu. andersoni*, *Lu. bispinosa*, *Lu. brasiliensis*, *Lu. complexa*, *Lu. christenseni*, *Lu. dreisbachi*, *Lu. evangelistai*, *Lu. termitophila*, *Lu. wilsoni* e *Lu. yucumensis* (Tabela 5). Sendo as cinco primeiras espécies citadas consideradas endêmicas na região Norte do Brasil e a primeira espécie é considerada possível vetora de *Le. (Le.) amazonensis* no Amazonas (FREITAS; BARRETT; NAIFF, 1989). Entre os novos registros há duas espécies que só ocorrem na região Norte do Brasil, *Lu. abunaensis* com registro no AM, AC e RO, e *Lu. calcarata* encontrada no AC e RO (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; GALATI, 2014). A distribuição regional de algumas espécies encontradas nesse estudo pode estar associada à dependência de habitats especializados ou mesmo à falta de investigações mais sistematizadas nas outras regiões. Quanto mais especializada for a espécie, menor será a sua área de dispersão (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). De acordo com os registros anteriores e o presente trabalho soma-se 90 espécies para o estado do Acre que corresponde a 34,6% das espécies registradas no Brasil.

Estudos realizados nos outros estados da região Norte também apontaram uma fauna rica de flebotomíneos. No Amazonas já foram registradas 133 espécies (FIGUEIRA et al., 2013); no Pará um total de 129 espécies foi levantado (GALATI, 2014); para Rondônia foram registradas 110 espécies (TELES et al., 2013a); em Roraima 82 (GAMA NETO et al., 2012); no Amapá 67 (GALATI, 2014) e no Tocantins 62 espécies foram registradas (MACHADO et al., 2012). Como exemplo de outras regiões, tem-se a região Sudeste onde Minas Gerais se destaca com 94 espécies registradas (GALATI, 2014), seguido de São Paulo com 69 espécies catalogadas (SHIMABUKURO; GALATI, 2011), Rio de Janeiro com 64 espécies e Espírito Santo com 60 (GALATI, 2014).

A abundância dos subgêneros *Trichophoromyia*, *Psychodopygus*, *Pressatia* e *Nyssomyia* encontrada nesse estudo (Figura 21; Tabela 5) estão de acordo com estudos realizados no Acre (ARIAS; FREITAS, 1982; AZEVEDO et al., 2008; SILVA-NUNES et al., 2008). Cabe ressaltar que a abundância de espécimes nos três primeiros subgêneros citados é devido a uma espécie muito abundante em cada um desses subgêneros (*Lu. auraensis*, *Lu. davisi* e *Lu. choti*, respectivamente). Galati (2003) e Castellón (2009) concordam que *Trichophoromyia*, *Psychodopygus* e *Nyssomyia* apresentam maior diversidade na Amazônia, com mais espécies registradas para a região do que para qualquer outra área na Região Neotropical.

Com o considerável aumento nas pesquisas sobre flebotomíneos, dobrou-se o número de espécies descritas nos últimos dez anos (GALATI, 2003; SHIMABUKURO; GALATI, 2011). Nesse estudo uma nova espécie encontrada no Ramal São Francisco foi descrita, nomeada de *Lutzomyia naiffi* sp. nov. Freitas & Oliveira, 2013. A nova espécie (Figura 22; Apêndice A) pertence ao grupo *Verrucarum* Theodor (1965) cujos principais caracteres morfológicos desse grupo são: presença de ascóides antenais simples, palpômero 5 maior que o palpômero 3, coxito com cerdas persistentes, estilo com 3 ou 4 espinhos e parâmero simples (YOUNG; DUNCAN, 1994). *Lu. naiffi* mostra afinidade com *Lu. columbiana* (Ristorcelli & Van ty, 1941; Anexo H), entretanto difere principalmente nos seguintes aspectos: tufo de cerdas do coxito (face interna mediana), posicionamento e calibre dos espinhos do estilo (tamanhos e posição são diferentes) e dutos ejaculadores são mais longos no novo táxon (TELES et al., 2013b).

De acordo com Bejarano et al. (2003), o grupo *Verrucarum* Theodor (1965) foi dividido com base em seus caracteres morfológicos em quatro séries *Verrucarum*, *Serrana*, *Townsendi* e *Pia*; consiste em 40 espécies, sendo três delas encontradas no Brasil: *Lu. serrana* (AP, RR, AM, PA, AC, RO, MA, BA, MG, RJ, MT), *Lu. odax* (Fairchild & Hertig, 1961)

(RO) e *Lu. nevesi* (PA, AC, RO, MT), sendo as mesmas, com exceção de *Lu. odax*, registradas também no Peru e Bolívia. Nesse estudo, *Lu. serrana* e *Lu. nevesi* foram encontradas em todos os ambientes, mostrando a adaptação dessas duas espécies a diferentes ecótopos e variações climáticas. Fêmeas de *Lu. serrana* infectadas por flagelados foram relatadas na Guatemala e Colômbia (YOUNG; DUNCAN, 1994), enquanto que *Lu. nevesi* infectadas por flagelados foram encontradas em Rondônia, Acre e Pará (ARIAS et al., 1985; BARRETT et al., 2004). No entanto, pouco se sabe sobre o papel desses flebotomíneos no ciclo de transmissão da leishmaniose. No grupo *Verrucarum* existe uma espécie de importância médica a *Lu. verrucarum* com distribuição geográfica no Peru, Bolívia, Colômbia, Equador e Chile e considerado vetor natural da *Le. peruviana* causadora da leishmaniose cutânea andina (DAVIES et al., 1993) e da bactéria *Bartonella bacilliformis* (Barton, 1909) responsável pela Bartonelose ou Verruga Peruana (MAQUÍÑA; GUERRA; VENTOSILLA, 2009).

No presente estudo, a curva de acumulação de espécie (Figura 23) mostrou que a quantidade de coleta foi o suficiente para estimar a riqueza de espécies encontradas em Assis Brasil (66 espécies em 6.850 flebotomíneos coletados). A riqueza de espécie observada nesse estudo pode ser reflexo da proximidade com áreas de alto endemismo, da intensidade da amostragem, do tamanho da área amostrada e da coleta realizada em ambientes diferentes. Vários estudos ecológicos já demonstraram que a variação das espécies de flebotomíneos em uma área de transmissão de *Leishmania* pode variar de acordo com as condições ambientais locais, a sua adaptação ao nicho, fontes de alimentos, solo e ação antrópica (RÊGO et al., 2014; TEODORO et al., 2003; TRUJILLO et al., 2013).

Apesar da diferença no esforço amostral e no período das coletas nos ambientes de ramais (26 visitas/ 448 armadilhas) e de mata ciliar (23 visitas/ 332 armadilhas), algumas observações podem ser destacadas. Os dados obtidos evidenciaram uma diferença na composição de espécies entre os dois tipos de ambientes (Figura 25), e um índice de diversidade maior no ambiente de ramal (Figura 24). Além disso, em relação à riqueza foi observado um maior número de espécies no ambiente de ramal, onde foi possível registrar a ocorrência de 62 espécies (90,5% do total), enquanto que no ambiente de mata ciliar foram amostradas 44 espécies (64,2% do total) (Figura 23). Esses dados discordam de alguns levantamentos faunísticos que sugerem que a alteração da vegetação primária tem impacto extremamente negativo sobre a riqueza de espécies de flebotomíneos (CARVALHO et al., 2010b; TOLEZANO et al., 2001). Os resultados observados possivelmente se devem a diferenças de microhabitats que compõem os três ramais (São Francisco, Irecê e Museu). Ampliando esse cenário, esses ambientes apresentam características rurais com a presença de

plantações de árvores frutíferas e hortas que propiciam um ambiente de refúgio e fonte alimentar para os flebotomíneos e matéria orgânica necessária para o desenvolvimento de formas imaturas (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; REGO et al., 2014). Além da ocorrência de animais silvestres observa-se também a presença constante de animais, como cães, galinhas, porcos, gado e equinos considerados potenciais atrativos alimentares para as fêmeas (TEODORO et al., 2001; TEODORO et al., 2003).

O ramal que apresentou maior riqueza e número de espécimes de flebotomíneos foi o ramal do Museu (89% da riqueza amostrada). Cabe ressaltar que o maior esforço de coleta nesse ramal ocorreu pela facilidade de acesso (totalizando 200 armadilhas instaladas), em relação aos outros (Irecê 120; São Francisco 128 armadilhas) e pode ter influenciado nesse resultado. Apesar de compartilhar as mesmas características de paisagem dos outros ramais (Irecê e São Francisco, 35% das espécies em cada ramal) seu ambiente formado por fragmentos florestais alterados está próximo ao rio Acre. Esse fato pode contribuir para a manutenção da temperatura e umidade relativamente estáveis, proporcionando condições mais propícias à reprodução desses insetos e estabelecimento de diferentes espécies de vertebrados que podem servir de fonte alimentar para os mesmos.

Embora tenha sido observado no ambiente de mata ciliar menor número de espécies (44 espécies) e se tenha realizado um menor esforço amostral (total de 332 armadilhas), quando comparada com o ambiente de ramal (62 espécies; total de 448 armadilhas), foi possível encontrar uma acentuada quantidade de flebotomíneos (4.277; 62,4%). As características florestais da área de preservação desse ambiente, umidade e coletas realizadas no período chuvoso podem ter contribuído para esse resultado. Estudos enfocando a sazonalidade de flebotomíneos têm confirmado a maior abundância de indivíduos no período chuvoso (MACEDO et al., 2008; RÊGO et al., 2014; TEODORO et al., 2001). Azevedo et al. (2011) explicam que a não adaptação e eliminação de espécies raras e pouco abundantes em nível local pode levar a um desequilíbrio na comunidade, fazendo com que outras espécies passem a ocupar o nicho vazio, resultando numa explosão demográfica. Nesse sentido, observamos a abundância de *Lu. auraensis*, *Lu. davisi*, *Lu. choti*, *Lu. yucumensis* e *Lu. geniculata* que somaram 91% do total de indivíduos capturados no ambiente de mata ciliar (Tabela 5). Esse perfil de poucas espécies dominantes e muitas espécies com poucos indivíduos tem sido demonstrado em estudos de fauna de flebotomíneos na região Norte (AZEVEDO et al., 2008; BARBOSA et al., 2008; RAMOS et al., 2014; SOUZA et al., 2010; TELES et al., 2013a).

A ordem das três espécies mais abundantes no ambiente de ramal foi a mesma (*Lu. auraensis*, *Lu. davis*i e *Lu. choti*), no entanto com menor proporção e com *Lu. choti* dividindo a mesma porcentagem que *Lu. sherlocki* (Tabela 5).

A coleta e abundância da espécie *Lu. auraensis* em todos os pontos de amostragem, demonstra sua ampla distribuição, adaptação a diferentes ecótopos e fatores climáticos no município de Assis Brasil. Essa espécie é encontrada na região Norte do Brasil (AGUIAR; MEDEIROS, 2003), com registros inferiores a 2% nos estudos de fauna do Amazonas e Rondônia (CASTELLÓN et al., 1994; GIL et al., 2003; TELES et al., 2013a), atingindo porcentagens de 19% a 53% do total de flebotomíneos coletados no Acre (ARAÚJO-PEREIRA et al., 2014; ARIAS; FREITAS, 1982; AZEVEDO et al., 2008). Recentemente *Lu. auraensis* foi registrada no Mato Grosso (MISSAWA; MACIEL, 2007). A dominância de *Lu. auraensis* em regiões rurais do Peru (ARISTÍDES, 1999; VALDIVIA et al., 2012) também foi assinalada numa proporção de acima de 50% do total de flebotomíneos capturados, com associação de sua presença em floresta e hábitos silvestres. Os dados corroboram os resultados desse trabalho.

A espécie *Lu. davis*i foi a segunda espécie mais abundante nos dois tipos de ambientes, apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, exceto na região Sul (GALATI, 2014). Essa espécie também foi uma das mais abundantes do subgênero *Psychodopygus* no levantamento de fauna do Acre (ARIAS; FREITAS, 1982; AZEVEDO et al., 2008), no estado de Rondônia (GIL et al., 2009; TELES et al., 2013a), no Amazonas (GOMES et al., 2013; RAMOS et al., 2014) e no Pará (SOUZA et al., 2010), além de registros nos limites do Brasil com o Peru e Bolívia (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; BUSTAMANTE et al., 2012; VALDIVIA et al., 2012). Apesar do seu hábito silvestre, confirmado nesse estudo pela maior frequência na mata ciliar, *Lu. davis*i já foi encontrada em localidades peridomiciliares com ocorrência de LTA (GOMES et al., 2013; TELES et al., 2013a; VIRGENS et al., 2008), também foi encontrada naturalmente infectada por *Le. (V.) braziliensis* em Rondônia (GRIMALDI et al., 1991) e no Pará (SOUZA et al., 2010) e por *Le. (V.) naiffi* em Rondônia (GIL et al., 2003).

Em relação à espécie *Lu. choti*, cuja ocorrência não se restringiu ao ambiente de mata ciliar, tem sido demonstrada uma maior preocupação epidemiológica com essa espécie visto sua predominância em relação a outros flebotomíneos nas áreas onde são registrados casos de leishmaniose tegumentar no Espírito Santo (VIRGENS et al., 2008), na Bahia (CARVALHO et al., 2010b) e em Pernambuco (BRANDÃO-FILHO et al., 1998). *Lu. choti* tem maior número de registro nas regiões Norte e Nordeste, não tem registro apenas na região Sul do

Brasil (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; MACIEL, 2007; MISSAWA; GALATI, 2014). No Espírito Santo essa espécie já foi encontrada em ambiente de floresta e áreas rurais abertas alteradas (VIRGENS et al., 2008) e exerce considerável hematofagia sobre roedores, aves, cães e equinos (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008).

Ainda com relação às espécies mais abundantes no ambiente de mata ciliar, pertencentes ao subgênero *Psychodopygus*, se destacaram duas espécies: *Lu. yucumensis* com distribuição no estado brasileiro de Rondônia e nos países vizinhos no Peru e na Bolívia, com relato nesse último país de fêmeas naturalmente infectadas por *Le. (V.) braziliensis* (LE PONT et al., 1986; YOUNG; DUNCAN, 1994); e *Lu. geniculata* com distribuição na região Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste do Brasil e no Peru (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; GALATI, 2014). O elevado número de indivíduos dessa espécie em mata ciliar no presente estudo demonstra seu hábito silvestre, corroborando com o estudo no município de Caroebe em Roraima (NETO; BAIMA; PASSOS, 2011). No entanto, *Lu. geniculata* ainda não possui registros de importância epidemiológica.

Um fato interessante nesse estudo é a predominância das espécies *Lu. whitmani*, *Lu. antunesi* e *Lu. ubiquitalis* no ambiente de ramal diferentemente do observado no ambiente de mata ciliar onde essas espécies foram coletadas em menor quantidade (Tabela 5 e 6). Estas espécies estão envolvidas na veiculação dos agentes etiológicos de LTA em várias áreas endêmicas do Brasil (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; AZEVEDO et al., 2008; COSTA et al., 2007; LAINSON et al., 1994; RAMOS et al., 2014; RANGEL; LAINSON, 2009; SILVA-NUNES et al., 2008).

Desde a década de 60, tem sido discutida a extensa distribuição geográfica de *Lu. whitmani* nas cinco regiões do Brasil e outros países do continente americano inclusive no Peru (COSTA et al., 2007). Diversos estudos têm comprovado a adaptabilidade dessa espécie a ambientes modificados (ARAÚJO-PEREIRA et al., 2014; LEONARDO; REBELO, 2004; RANGEL; LAINSON, 2009; REBÊLO et al., 1999; TEODORO et al., 2003) bem como o seu papel como elo essencial na cadeia de transmissão de *Le. (V.) braziliensis* (LUZ et al., 2000; QUEIROZ et al., 1994), *Le. (V.) guyanensis* (FREITAS; NAIFF; BARRETT, 2002) e *Le. (V.) shawi* principalmente no Norte do Brasil (LAINSON et al., 1994). Alguns trabalhos relacionam a elevada incidência desse flebotomíneo à variedade de fontes de repasto sanguíneo para as fêmeas, e também a sua fácil adaptação às condições climáticas variáveis, podendo ser coletada ao longo do ano (REBÊLO et al., 1999; TEODORO et al., 2003). A correlação da densidade desta espécie e presença em ambiente antropizados como observadas por Araújo-Pereira et al. (2014), Azevedo et al. (2008) e Silva-Nunes et al. (2008) no Acre

indicam *Lu. whitmani*, bem como *Lu. antunesi*, como uma das espécies vetoras suspeitas da região. No presente trabalho 95,4% (123 espécimes /129 total) de *Lu. whitmani* foi encontrada no ambiente de ramal.

Lu. antunesi foi a segunda mais frequente no ambiente de Ramal (77,2% - 105 espécimes/ 136 total), sendo coletada somente no ramal do Museu (Tabela 6). Esse flebotomíneo foi capturado no Brasil na região Norte, Nordeste e Centro Oeste, sendo encontrado em ambientes silvestres e peridomésticos (FIGUEIRA et al., 2013; MISSAWA; MACIEL, 2007; RAMOS et al., 2014; REBÊLO et al., 1999; SILVEIRA et al., 2002) e no Peru e Bolívia (GALATI, 2014). Esta espécie foi associada a focos de leishmaniose visceral no Pará (RYAN et al., 1984) e a transmissão de *Le. (V.) lindenbergi*, no mesmo estado brasileiro, pelo seu caráter antropofílico e distribuição coincidente em área militar com várias ocorrências de soldados infectados com esse parasito (SILVEIRA et al., 2002). Recentemente, Trujillo et al. (2013) destacaram a importância epidemiológica de *Lu. antunesi* na transmissão de *Leishmania* spp. em área endêmica na Colômbia por sua elevada taxa de infecção (1,6%), abundância durante todo o ano de coleta e adaptação em ambiente intra e peridomiciliar. Enquanto Figueira et al. (2013), relataram a abundância dessa espécie em locais intra e peridomicílio em área endêmica de Lábrea - AM, e sugerem a participação dessa espécie como vetora de LTA nessa região.

Com relação a *Lu. ubiquitalis* 95,4% (84/88) dos espécimes foram coletados no ambiente de ramal, com maior frequência no ramal do Museu. Este achado converge aos relatos de Ramos et al. (2014) no Amazonas, nos quais *Lu. ubiquitalis* foi a segunda espécie mais abundante em ambiente peridomiciliar, perdendo apenas para *Lu. antunesi*. De acordo com os autores, essas duas espécies estão cada vez mais adaptadas a uma variedade de habitats incluindo peridomicílio e regiões de mata. Apesar de sua baixa antropofilia em ambientes naturais, *Lu. ubiquitalis* é amplamente distribuída em toda a Amazônia e também no Peru e Bolívia (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; RANGEL; LAINSON, 2009) e a primeira representante do subgênero *Trichophoromyia* incriminada como vetor potencial de *Le. (V.) lainsoni* no Pará (LAINSON et al., 1992; SILVEIRA et al., 1991).

Lu. shawi é considerada uma espécie endêmica da região Norte brasileira e foi coletada neste estudo principalmente no ramal do Museu (Tabela 5). Foi encontrada naturalmente infectada por parasitos *Leishmania braziliensis-like* através de observação microscópica na década de 1980 (YOUNG; DUNCAN, 1994). Recentemente essa espécie tem sido incriminada na veiculação de *Leishmania* na Bolívia apoiada em evidências de seu caráter antropofílico, sua ocorrência e abundância em áreas endêmicas de LTA e ambiente

peridomiciliar, além de comprovada infecção por *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) guyanensis* através da aplicação de ferramentas de biologia molecular (BUSTAMANTE et al., 2012; GARCIA et al., 2007). Na Bolívia, Bustamante et al. (2012) mostram a distribuição da fauna em área endêmica de mata alterada com casos de *Le. (V.) braziliensis* e compartilham espécies encontradas neste estudo, com registro de 58,1% de *Lu. shawi*, 22,2% *Lu. (Trichophoromyia) sp.*, 8,3% de *Lu. llanosmartinsi* e 4,3% *Lu. antunesi*. Esses dados merecem atenção quando consideramos a vigilância epidemiológica de fronteira das leishmanioses, não podendo desconsiderar o papel de *Lu. shawi* na transmissão de leishmaniose no município de Assis Brasil.

Apesar da baixa densidade amostrada nesse estudo, foram encontradas as espécies vetoras *Lu. paraensis*, *Lu. ayrozai* e *Lu. hirsutus hirsutus*, as quais já foram encontradas naturalmente infectadas por *Le. (V.) naiffi*, sendo as duas últimas com maior distribuição geográfica no Brasil (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; GIL et al., 2003; RANGEL; LAINSON, 2009). Enquanto *Lu. migonei* considerado vetor de *Le. (V.) braziliensis* (QUEIRÓZ et al., 1994) com distribuição nas cinco regiões do Brasil, tem sido destacado como uma espécie silvestre, abundante em áreas endêmicas do Nordeste e Sudeste, com capacidade de invadir habitações humanas, com preferência de repasto sanguíneo principalmente sobre animais domésticos como cães, galinhas e gado, sugerindo, possivelmente, seu papel como vetor secundário ou mantenedor de um ciclo enzoótico na região (AZEVEDO; RANGEL; QUEIROZ, 1990; QUEIROZ et al., 1994; RANGEL; LAINSON, 2009).

Apenas 13 exemplares de *Lu. flaviscutellata* e um exemplar de *Lu. umbratilis* foram coletados, no entanto, essas duas espécies são de grande interesse epidemiológico na região Amazônica (GOMES et al., 2013; RAMOS et al., 2014; SILVA et al., 2010b) e também já foram encontradas no Acre (ARIAS; FREITAS, 1982; AZEVEDO et al., 2008), além do Peru e Bolívia. *Lu. flaviscutellata* apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; RANGEL; LAINSON, 2009) e é considerado o principal vetor da *Leishmania (Le.) amazonensis* agente etiológico da forma difusa da leishmaniose cutânea (FREITAS; BARRETT; NAIFF, 1989; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LAINSON et al., 1994). Estudos sobre a ecologia desse vetor demonstraram que raramente é encontrado sobre troncos de árvores, sendo os roedores do gênero *Proechimys* os principais reservatórios de atração por essa espécie, justificando sua maior densidade em nível de solo (SHAW; LAINSON, 1968). Essa observação pode explicar a baixa densidade dessa espécie, visto que a armadilha do tipo CDC utilizada nesse estudo não é a mais eficiente para a coleta dessa

espécie, geralmente é utilizado armadilha Disney em nível de chão (SHAW; LAINSON, 1968).

Lu. umbratilis, é altamente antropofílica e principal vetor de *Leishmania* (V.) *guyanensis* (GRIMALDI et al., 1991; LAINSON, 2010), segunda espécie de *Leishmania* mais frequente na forma mucosa de LTA na região Amazônica (GUERRA et al., 2011). Os mamíferos arborícolas como a preguiça (*Choloepus didactylus*), além do tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais do gênero *Didelphis* e roedores são os principais hospedeiros incriminados dessa espécie de *Leishmania* (ARIAS; NAIFF, 1981; LAINSON et al., 1981). *Lu. umbratilis* tem registros na região Amazônica, Centro Oeste e Nordeste (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; GALATI, 2014). Apesar do seu hábito silvestre, recentemente tem sido demonstrada a capacidade de *Lu. umbratilis* em se adaptar à área de vegetação alterada, inclusive em ambiente peridomiciliar na região Amazônica. Essa observação deve ser vista como um sinal de alerta, pois as modificações ambientais causadas pelos humanos nas bordas das florestas alteradas (áreas rurais ou bairros na periferia da cidade) podem levar a proximidade de reservatórios e maior densidade desse vetor proporcionando um maior risco de transmissão de LTA em área peridomicilar, o que facilitaria o aparecimento de surtos da doença (BARBOSA et al., 2008; GOMES et al., 2013; RAMOS et al., 2014).

Outras cinco espécies que apresentaram frequência abaixo de 1% mas que merecem ser citadas são *Lu. sallesi* e *Lu. termitophila*, do grupo Migonei, encontradas naturalmente infectadas por *Le. infantum chagasi* em Minas Gerais (SARAIVA et al., 2009); e *Lu. yuilli yuilli*, cuja a presença foi relatada nesse estudo no ramal do Museu, e tem sido descrita com hábitos antropofílicos e peridomiciliares (DIAS-LIMA; GUEDES; SHERLOCK, 2003; SANTAMARÍA et al., 2006). *Lu. yuilli yuilli* foi registrada no Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste do Brasil como também no Peru e Bolívia (GALATI, 2014; YOUNG; DUNCAN, 1994). Essa espécie é incriminada como vetor suspeito de *Leishmania* sp. entre reservatórios (ARIAS et al., 1985), na Colômbia tem importância médica como vetor suspeito de *Le. (V.) panamensis* (SANTAMARÍA et al., 2006; VERGARA et al., 2008) e recentemente foi reportada a participação dessa espécie na transmissão de *Leishmania* sp. numa reserva indígena em Roraima (NETO; BAIMA; PASSOS, 2011). *Lu. carrerae carrerae* e *Lu. complexa* são considerados espécies epidemiologicamente importantes, uma vez que vem sendo incriminadas na transmissão de *Le. (V.) braziliensis* no Brasil, Peru e Bolívia (LE PONT; DESJEUX, 1986; RANGEL; LAINSON, 2009).

Esses resultados demonstram a grande diversidade de espécies com potencial participação no ciclo de transmissão de leishmaniose e reforça a importância de Assis Brasil como uma área de risco de LTA no estado do Acre.

Das espécies capturadas nesse estudo encontramos *Lu. davis* e *Lu. auraensis* contendo DNA de *Leishmania* do complexo *Le. braziliensis*, sendo inclusive as espécies mais numerosas entre as coletas nas áreas investigadas. A taxa de infecção observada para essas duas espécies foram aproximadas: *Lu. davis* com 1,85% e *Lu. auraensis* com 2,05% (Tabela 8). Várias técnicas baseadas em PCR para detecção de *Leishmania* sp. tem sido descritas com diferentes resultados para taxa de infecção, Miranda et al. (2002) observaram uma taxa de infecção de 0,4% em 4.027 fêmeas de *Lutzomyia* spp. coletadas na Bahia; enquanto que nos focos de leishmaniose na Argentina, Acardi et al. (2010) encontraram uma taxa de 0,47% de infecção em 211 *Lu. longipalpis* analisados. Valores maiores foram observados por Michalsky et al. (2011) em Minas Gerais cuja a taxa de infecção de *Lu. longipalpis* alcançou 3,9% (em 155 espécimes coletados), e nos estudos de Trujillo et al. (2013) com relatos de 4,8% para *Lu. panamensis* (de um total de 452 indivíduos) e 7,5% para *Lu. flaviscutellata* (de um total de 146 indivíduos) na Colômbia. Além de diferenças nas estratégias de amostragem, a variação observada nas taxas de infecção pode estar relacionada à ecoepidemiologia de cada área, ao método de armazenamento e extração de DNA, bem como, na sensibilidade e especificidade da técnica de PCR empregada (MICHALSKY et al., 2002; PAIVA et al., 2007). Até o presente momento, somente Valdivia et al. (2012) observaram a taxa de infecção positiva para *Lu. davis* e *Lu. auraensis* através diagnóstico de PCR em tempo real no Peru, com 0,9% e 0,6%, respectivamente. Outros estudos sobre a confirmação de infecção por *Leishmania* spp. em *Lu. davis* foram baseadas na observação sob microscópio óptico e identificação dos flagelados por anticorpo monoclonal (GIL et al., 2003; GRIMALDI et al., 1991; SOUZA et al., 2010).

A eficiência da técnica PCR-*mkDNA* para detecção do gênero de *Leishmania* realizada nesse estudo havia sido descrita por Oliveira et al. (2005) e Oliveira-Pereira et al. (2006). O número elevado de cópias da região conservada do minicírculo do kDNA, cerca de 10.000 cópias/ célula (ROGERS; WIRTH, 1987), é um fator que pode ter contribuído para a positividade dos *pools* de flebotomíneos nesse trabalho. Ao realizar a reação de PCR-RFLP para caracterização da espécie do parasito foi possível a identificação em 15 *pools*. O gene *hsp70* é um dos mais conservados entre as espécies de *Leishmania*, um dos alvos mais específicos e que tem apresentado sucesso como ferramenta molecular para diferenciação de espécies desse parasito (DA GRAÇA et al., 2012; GARCIA et al., 2004), no entanto, é

relatada a presença de polimorfismos gênico principalmente quanto à espécie *Le. (V.) braziliensis* (CUPOLILLO et al., 2003), fato que pode explicar a PCR-RFLP negativa em algumas amostras de flebotomíneos positivas para PCR-*mkDNA* analisadas. Da Graça et al. (2012) detectou a sensibilidade de 73% (72/99) de suas amostras analisadas. A técnica através da PCR-RFLP mostrou menor sensibilidade, no entanto, mostrou-se eficaz confirmando a identificação do produto amplificado pela técnica de sequenciamento.

O encontro de *Lu. davis* infectada por *Leishmania* reforça a importância epidemiológica dessa espécie na região amazônica, visto que é considerado possível vetor pelo registro de flagelados no tubo digestivo identificados por *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) naiffi*, protozoários causadores de leishmaniose tegumentar para o homem (GIL et al., 2003, 2009; GOMES et al., 2013; GRIMALDI et al., 1991; SOUZA et al., 2010; TELES et al., 2013a). A detecção de maior número de *pools* de *Lu. davis* contendo DNA de *Leishmania* no ponto 4 do ambiente de mata ciliar (Tabela 7; Figura 27), pode ter relação direta com a densidade populacional dessa espécie (68,2%; 679 espécimes do total de 996 *Lu. davis* no ambiente de mata ciliar) e presença de animais domésticos (cão, porcos e galinhas) prováveis reservatórios dos parasitos (Figura 19B). Cabe ressaltar que da totalidade de *Lu. davis* encontrados no ambiente de mata ciliar, outros 24,3% (242/996) foram coletados no ponto 1 e apesar de não apresentar *pools* positivos nesse local, essa é uma área próxima ao Seringal São Francisco com assentamentos rurais próximos e ocorrência anual de casos de LTA humanos (28/ 213 casos no período de 2010 a 2013; SINAN, 2013). A prevalência de *Lu. davis* nesses ambientes sugere sua adaptação à ambientes peridomésticos e possível transmissão de *Leishmania* na região, como sugere Teles et al. (2013a) em seu estudo em áreas endêmica de LTA em Monte Negro, RO. Esses achados também estão de acordo com as observações Gil et al. (2003) que discutem o hábito altamente antropofílico dessa espécie pelo elevado número de espécimes coletados em armadilhas Shannon. Portanto, a relação entre a densidade desta espécie, a sua possível adaptação a ambientes antropizados e de residências, com o encontro de infecção natural por *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) guyanensis* nesse estudo, reforça a hipótese do seu envolvimento em ciclos enzoóticos e zoonóticos na região Amazônica (GIL et al., 2003; GRIMALDI et al., 1991; SOUZA et al., 2010). Em área de floresta Amazônica do Peru esta espécie tem sido registrada como uma das mais abundantes e recentemente foi relatada sua infecção por *Le. (V.) braziliensis* através de PCR em tempo real indicando ser um possível vetor na região de Madre de Dios (VALDIVIA et al., 2012).

Esse é o primeiro registro de infecção de *Lu. auraensis* por *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (V.) braziliensis* para o Brasil. A maioria (9/16) dos *pools* de *Lu. auraensis* foi coletada no

ponto 1 da mata ciliar, próximo ao Seringal São Francisco. Outros quatro *pools* positivos foram localizados nos pontos 1 e 2 do ramal do Museu, área rural próxima ao Seringal Santa Quitéria e Seringal São Pedro (com registro de 15/213 casos de LTA no período de 2010 a 2013; SINAN, 2013). Araújo-Pereira et al. (2014) relataram a abundância dessa espécie em ambiente periurbano (parques municipais) e peridomiciliar em Rio Branco. No entanto, nenhum estudo incriminando esse flebotômíneo como vetor foi realizado no Brasil, sendo o seu papel epidemiológico pouco investigado até o momento.

Estudos prévios em regiões rurais endêmicas de Madre de Dios no Peru tem associado *Lu. auraensis* com a transmissão de *Le. (V.) lainsoni* e *Le. (V.) braziliensis* devido a detecção de infecção natural através de PCR em tempo real (VALDIVIA et al., 2012). Um estudo anterior realizado por Aristídes (1999) em Alto Tambopata – Peru registrou a prevalência dessa espécie em três áreas endêmicas de LTA, somando 79,8% do total de espécimes capturados. Esse trabalho investigou o comportamento desse flebotômíneo, evidenciando que, apesar do seu hábito silvestre, tem comportamento antropofílico, sendo 94% do total capturado em armadilha de Shannon usando como isca homem e mulas. Além disso, Aristídes (1999) nas proximidades do ambiente de coleta observou diversos animais domésticos (cães, asno e mulas) com lesões crônicas suspeitas de LTA e com diagnóstico positivo para amastigotas. Quispe et al. (2008) revelou que *Lu. auraensis* foi a mais abundante (36,36%) das seis espécies capturadas em ambiente intradomiciliar localizado em área endêmica em Cusco no Peru. Essas observações relatadas sugerem que a distribuição de *Lu. auraensis* em ambiente florestal poderia facilitar o aumento dessa espécie em locais com habitações humanas próximas; fator preocupante quando se observa os resultados de abundância e infecção dessa espécie apresentados em Assis Brasil. Diante das poucas, porém relevantes evidências epidemiológicas sobre o papel de *Lu. auraensis* na transmissão de LTA, é necessário elucidar melhor seu potencial risco de transmissão de *Leishmanias* do complexo *Le. braziliensis*.

O achado de *Leishmania* detectada por PCR em flebotômíneos nesse trabalho não assegura que as espécies são vetoras de leishmaniose, no entanto, sugere que esses insetos provavelmente alimentaram-se de reservatórios infectados e existe a circulação local de *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) guyanensis*, cepas por sua vez endêmicas e responsáveis pelos casos de leishmaniose mucosa na região Amazônica (GUERRA et al., 2006; GUERRA et al., 2011). Enquanto, *Le. (V.) braziliensis* possui uma diversidade maior de potenciais vetores incriminados na sua transmissão na literatura, o principal vetor de *Le. (V.) guyanensis* descrito é *Lu. umbratilis* cuja a densidade foi baixa nesse estudo. A identificação através da PCR

hsp70 de *Le. (V.) guyanensis* em 14 *pools* (14/15) em diferentes pontos de coleta e elevada densidade de *Lu. auraensis* não exclui a possibilidade desse flebotomíneo participar do ciclo de transmissão dessa espécie na área de fronteira. Nesse sentido, são necessários outros estudos para avaliação de sua competência vetorial, como a dissecação do tubo digestivo do flebotomíneo para detecção do parasito; estudo do comportamento antropofílico e do repasto sanguíneo em outros hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2010; KILLICK-KENDRICK, 1990).

A abundância de flebotomíneos, espécies vetoras e presença de flebotomíneos parasitados por *Leishmania* sp. nos diferentes ambientes encontrados nesse trabalho, são fatores epidemiologicamente importantes, devendo ser levados em consideração na implantação de assentamentos populacionais em áreas rurais ou mesmo na periferia do município. Cesário, Cesário e Andrade-Morrave (2011) explica que além dos fatores epidemiológicos favoráveis à disseminação da LTA na região, Assis Brasil, localizado na fronteira de países endêmicos, necessita de monitoramento contínuo da leishmaniose devido intenso fluxo migratório na tríplice fronteira nos últimos anos. Esse fator pode favorecer a migração e assentamentos de famílias, reservatórios domésticos e vetores vindos do Peru e Bolívia podendo influenciar na caracterização epidemiológica de LTA do município.

Considerando que a origem da LTA é complexa e multifatorial, Ribeiro (2013) investigou os possíveis fatores socioambientais dos municípios do Acre associados com a elevada incidência da doença. A análise multivariada revelou a associação direta entre um aumento no coeficiente de detecção da LTA e características inadequadas de moradia dos municípios, tais como, captação de água de abastecimento em rios, lagos ou igarapés, destinação inadequada de resíduos sólidos, ausência de energia elétrica e falta de esgotamento sanitário em áreas rurais que normalmente são margeadas por mata. Essa falta de saneamento ambiental proporciona condições favoráveis aos criadouros de vetores, aproximação de reservatórios e favorece a ocorrência da LTA. Dessa maneira, Ribeiro (2013) sugere que a hiper-endemicidade da LTA em Assis Brasil esteja relacionada com a adaptação dos ciclos de transmissão para ambientes peridomiciliares e as condições inadequadas de moradia que contribuem para o aumento da exposição da população aos vetores da LTA. Para o autor, os hábitos da população como caça, pesca, atividades extrativistas e de agricultura, busca de água nos igarapés e deslocamento entre moradores do núcleo urbano para os sítios e localidades em áreas rurais, são fatores que favorecem a exposição dos indivíduos aos vetores da LTA. Essa condição de saneamento ambiental observada aliada aos resultados de

diversidade e abundância de vetores descritos nesse estudo comprovam os fatores de risco e manutenção da endemia na região.

Para compreender melhor os elementos integrantes do ciclo epidemiológico em Assis Brasil, além da fauna de flebotomíneos e infecção desses por *Leishmania* sp., também foi analisado o perfil epidemiológico de 37 pacientes portadores de lesões suspeitas de leishmaniose cutânea atendidos no período de julho de 2012 a março de 2014. Todos esses pacientes foram notificados pela Vigilância Epidemiológica local e representam 49,3% dos pacientes notificados nesse mesmo período.

Os resultados clínico-epidemiológicos mostraram a prevalência de casos clínicos cutâneos, onde foram encontradas quatro espécies de *Leishmania*: *Le. (V.) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis*, *Le. (V.) shawi* e *Le. (Le.) amazonensis* (Tabela 9); sendo as duas últimas espécies registradas pela primeira vez no Acre. Na microrregião de Rio Branco, além de *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) guyanensis* já foram assinaladas *Le. (V.) lainsoni* e *Le. (V.) naiffi* em humanos (TOJAL DA SILVA et al., 2006). As espécies descritas até o momento no Acre, exceto *Le. (V.) shawi*, também foram encontradas nos estados vizinhos: no estado de Rondônia foram assinaladas as espécies *Le. (V.) braziliensis*, *Le. (V.) lainsoni* e *Le. (V.) guyanensis* (SHAW et al., 2007) e no estado do Amazonas já foram registradas *Le. (Le.) amazonensis*, *Le. (V.) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (V.) naiffi* (GUERRA et al., 2011; LAINSON et al., 1994; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004), sendo *Le. (V.) guyanensis* a espécie mais frequente (COELHO et al., 2011; GUERRA et al., 2006).

Le. (V.) braziliensis foi a espécie mais frequente (65,6%) nas amostras clínicas encontrada nesse estudo, resultado semelhante foi observado na microrregião de Rio Branco, em áreas da Bolívia e no departamento (estado) peruano de Madre de Dios (GARCIA et al., 2007; TOJAL DA SILVA et al., 2006; VALDIVIA et al., 2012). Possivelmente o elevado número de casos de *Le. (V.) braziliensis* em Assis Brasil e a sua ampla distribuição geográfica no município (Figura 32) pode estar relacionada à presença de várias espécies de vetores adaptados tanto ao ambiente silvestre quanto ao ambiente peridomiciliar, encontrados nesse estudo, como: *Lu. migonei*, *Lu. davisi* e *Lu. whitmani*, sendo esses dois últimos destacados pela sua relativa abundância no estado do Acre (AZEVEDO et al., 2008; SILVA-NUNES et al., 2008). *Lu. davisi* foi a espécie mais amplamente distribuída nas áreas amostradas e foi encontrada infectada por *Le. (V.) braziliensis* nesse estudo e em outras localidades da região Norte (GRIMALDI et al., 1991; SOUZA et al., 2010), o que sugere a participação dessa espécie como possível vetor para humanos no município. Não desconsiderando a possível participação de espécies consideradas possíveis vetores em outras regiões e que foram

registrados nesse estudo, como: *Lu. auraensis*, *Lu. choti*, *Lu. yucumensis*, *Lu. carrerai carrerai* e *Lu. shawi*.

A identificação de *Le. (V.) braziliensis* como espécie predominante em humanos é um fator epidemiológico relevante, uma vez que essa espécie é capaz de persistir no homem com baixa parasitemia por longo período, mesmo após 1-5 anos da cura das lesões cutâneas, onde aproximadamente 2-5% dos casos de leishmaniose cutânea progridem para a forma mucosa da doença (JACKSON et al., 2009; TOJAL DA SILVA et al., 2006). Nos casos mais graves da doença pode evoluir para complicações respiratórias, dificuldades de alimentação ou infecções secundárias podendo levar a morte do indivíduo (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Em Assis Brasil, no período de 2003 a 2010, foram confirmados 53,5% de casos na forma cutânea, 17% de casos na forma mucosa e 29,5% não tinham informações sobre a forma clínica (OLIART-GUZMÁN et al., 2013). Além da associação da *Le. (V.) braziliensis* a forma mucosa da doença, essa espécie é considerada um desafio terapêutico (LLANOS-CUENTAS et al., 2008). Nesse estudo, foram encontrados três casos (8,1%) de recidivas infectados por essa espécie; e dos seis casos clínicos (16,2%) que fizeram dois ciclos de tratamento com estibogluconato de meglumina (Glucantime) para obter a cicatrização da lesão, cinco estavam infectados por *Le. (V.) braziliensis*.

Le. (V.) shawi foi segunda espécie mais frequente nos achados clínicos (28,1%) com ocorrência em seis das 12 localidades desse estudo, com predominância em bairros e zona rural margeando a área urbana (Figura 32). Essa espécie foi identificada recentemente em lesões cutâneas em Madre de Dios, Peru (KATO et al., 2010), esporadicamente em casos na região Amazônica, principalmente com registros no Pará, onde foi isolada de lesões cutâneas (JENNINGS et al., 2014; LAINSON et al., 1994) e recentemente foi registrada em Pernambuco (BRITO et al., 2009).

Le. (V.) shawi causa, geralmente, lesões cutâneas simples, também observadas nesse estudo, e a presença dessa espécie pode estar associada com a presença do flebotômíneo *Lu. whitmani* (RANGEL; LAINSON, 2009). Essa associação foi observada quando analisamos a frequência desse vetor (93%) no ramal do Museu (Tabela 5), localidade próxima ao Seringal Santa Quitéria onde foram detectados casos humanos de *Le. (V.) shawi* (Figura 32). No Pará esse vetor conserva hábito silvestre responsável pela transmissão de *Le. (V.) shawi* entre animais florestais, sendo pouco atraído pelo homem, ao contrário do que se observa nas áreas Nordeste e Sudeste onde *Lu. whitmani* se mostra bem adaptado ao habitat domiciliar e transmite a *Le. (V.) braziliensis* (COSTA et al., 2007; RANGEL; LAINSON, 2009;

TEODORO et al., 2003). O encontro de *Lu. whitmani* com maior frequência em ambiente antropizado e em área com registro de *Le. (V.) shawi* e *Le. (V.) braziliensis* pode indicar uma tendência de comportamento antropofílico, domiciliação e participação desse vetor na região, dados que corroboram aos resultados de Araújo-Pereira et al. (2014) no Acre.

A identificação de *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (Le.) amazonensis* em lesões de pacientes, tem importantes implicações de caráter epidemiológico e clínico, pois, também estão associadas com o desenvolvimento de metástases e altas taxas de insucesso ao Glucantime (GUERRA et al., 2011; JACKSON et al., 2009). A *Le. (V.) guyanensis* no Peru é uma das espécies mais difundidas nos casos de LTA (KATO et al., 2010; LUCAS et al., 1998) e no Brasil com maior prevalência no estado Amazonas (COELHO et al., 2011; GUERRA et al., 2006; GUERRA et al., 2011). Nesse estudo foi encontrado um exemplar do seu principal vetor, *Lu. umbratilis*, no ramal do Museu. A transmissão tipicamente silvestre desta infecção é relatada quando o indivíduo entra em áreas florestais virgens ou em seus arredores perturbando os vetores que atacam em grande número, causando inúmeras lesões chamadas *pian-bois*, diferenciando-se da leishmaniose causada por outras espécies como a *Le. (V.) braziliensis* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010; RANGEL; LAINSON, 2009). Em um dos casos clínicos reportados observou-se duas lesões no membro inferior confirmando os achados clínicos característicos da transmissão dessa espécie. Possivelmente a baixa densidade do principal vetor antropofílico associado a essa *Le. (V.) guyanensis* observada no município pode justificar a baixa frequência na amostragem clínica desse estudo.

A espécie *Le. (Le.) amazonensis* com uma ampla distribuição geográfica no Brasil, está associada a diferentes formas clínicas, incluindo a forma difusa. Para essa espécie de parasito foram registrados nesse estudo os vetores *Lu. flaviscutellata* e *Lu. reducta* no ramal Irecê que dá acesso ao Seringal Paraguaçu onde foi encontrado o único relato clínico de infecção mista de *Le. (Le.) amazonensis/ Le. (V.) guyanensis* (Tabela 5, Figura 32). A baixa incidência de *Le. (Le.) amazonensis* em humanos nas várias regiões do Brasil pode estar associado ao comportamento pouco antropofílico de seus vetores (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010). O registro de infecção mista por mais de uma espécie de *Leishmania* sp. em lesão cutânea também foi observada em 14% das amostras clínicas caracterizadas em Manaus por Coelho et al. (2011). Para esses autores abundância e diversidade de vetores infectados em uma área endêmica pode contribuir para o aumento da notificação de casos com infecção mista.

O encontro de pacientes infectados por *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) guyanensis* no Seringal São Francisco e a presença abundante de *Lu. davisi* e *Lu. auraensis* nessa área, inclusive desse último infectado com as mesmas espécies no ponto 1 do ambiente de mata ciliar (localidade próxima), indicam a coexistência de ciclos estabelecidos destas espécies na região. O alinhamento dos isolados *hsp70* de *Le. (V.) guyanensis* de flebotômíneos com a sequência obtida da mesma espécie, porém isolada de humano, mostrou semelhança entre seus fragmentos de DNA (Anexo G). Este fato se torna evidente quando se analisa a presença de *hotspots* gerados através do estimador de densidade de Kernel em áreas semelhantes tanto para presença de flebotômíneos infectados quanto de pacientes com LTA (Figura 27 e Figura 31). A presença de pacientes infectados por *Le. (V.) braziliensis* no Seringal Santa Quitéria (Figura 32) e a coexistência de *Lu. auraensis* infectados por essa espécie no ramal do Museu (localidade próxima) também foi observado nesse estudo, reforçando a importância epidemiológica dessa espécie no ciclo de transmissão da leishmaniose.

Nesse trabalho 40% dos pacientes tinha entre uma a seis lesões, esse achado clínico pode ser explicado pela ocorrência de picadas simultâneas dos vetores infectados (BRASIL, 2010). O diagnóstico relativamente precoce na maioria da população estudada (tempo médio de aproximadamente 56 dias) pode ser um fator responsável pelo aumento da sensibilidade do diagnóstico por PCR *mKDNA* (100%) e histopatológico (com 75,6% dos casos com positividade direta e 10,8% mostrou ser compatível com LTA). Estudos de quimioterapia antimonial na América Latina mostram diferentes taxas de cura (26-100%), além da sua potencial falha terapêutica e os diversos fatores que influenciam no resultado do tratamento, como: o tempo de evolução, número, tamanho e localização das lesões, bem como a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (LLANOS-CUENTAS et al., 2008). Nesse estudo foi observada cura clínica da lesão em 97% dos casos. O diagnóstico precoce da população estudada, a sensibilidade dos exames no diagnóstico para a confirmação da doença, o acesso e adequado tratamento da leishmaniose cutânea podem ter refletido o sucesso do tratamento. Esse cenário pode reduzir os riscos de desenvolvimento da lesão mucosa que pode ocorrer anos após a primo-infecção. Muitos dos casos de leishmaniose nessa região são subnotificados, Camargo (comunicação pessoal) atesta que muitas pessoas não procuram o Sistema de Saúde, tratando as lesões com fitoterápicos e medicina alternativa local.

A maioria dos pacientes com LTA nesse trabalho mora na zona rural há mais de três anos, sugerindo serem esses casos autóctones, e com atividades ligadas ao ambiente de floresta. Também foi observado maior percentual de indivíduos do sexo masculino e com idade produtiva (15-40 anos) com lesões da doença, dados que em conjunto sugerem a

ocorrência de transmissão extradomiciliar durante as atividades ocupacionais na população amostrada. Esse perfil epidemiológico também foi registrado tanto no Acre como em outras regiões da Amazônia brasileira, mostrando que a LTA é uma doença ocupacional nessas regiões, uma vez que a maioria dos pacientes são homens com idade produtiva, procedentes de áreas rurais com ocupações ligadas a permanência na floresta (GONTIJO; CARVALHO, 2003; OLIART-GUZMÁN et al., 2013; SILVA et al., 1999; SILVA; MUNIZ, 2009; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Por outro lado, Silva e Muniz (2009), observaram um perfil epidemiológico da leishmaniose diferente na microrregião de Rio Branco, com crescentes índices de notificação em mulheres e indivíduos moradores em zonas urbanas e com ocupações não-rurais nos últimos anos. Embora nesse estudo os casos positivos provenientes da zona rural seja maioria (Tabela 9), sugerindo a transmissão silvestre clássica, observa-se que muitos desses seringais (Seringal São Francisco, Seringal Santa Quitéria e Seringal Paraguaçu) estão na periferia do centro urbano do município (Figura 31; 32), fato preocupante, pois essa proximidade poderá favorecer a adaptação de vetores e reservatórios à ambientes intra e peridomicílio urbano. Embora os dados de casos humanos positivos para LTA utilizados para a construção do mapa de Kernel não obedecem a critérios estatísticos e, portanto não expressam a prevalência da doença no município, observa-se uma tendência de maior transmissão (*hotspot*) no centro urbano do município. Nesse contexto, é importante observar dois aspectos epidemiológicos, primeiro que a somatória de todos os casos provenientes da zona urbana revela uma frequência de 24% da amostragem; segundo, que grande parte das habitações na periferia da zona urbana do município de Assis Brasil é formada por casa tradicional de madeira construída próxima à orla da floresta (Figura 15; Anexo B) e essa situação poderá contribuir para a aproximação de vetores e transmissão da leishmaniose no intra e peridomicílio na região.

Araújo-Pereira et al. (2014) discutiram sobre o impacto negativo da construção descontrolada de residências próximas a floresta à saúde humana na população acreana, pois esse processo favorece a adaptação de insetos vetores como *Lu. whitmani* aumentando à área de risco de transmissão de LTA.

Os resultados desse estudo indicam que Assis Brasil combina diversos fatores que contribuem para a elevada incidência de LTA na região, principalmente no que diz respeito à presença de vetores com hábitos antropofílicos em áreas antropizadas que podem favorecer possíveis mudanças no padrão de transmissão da doença na região. Por esse motivo o município merece maior atenção na formulação de políticas sociais e adoção de medidas

coordenadas na área de Saúde Pública para minimizar a incidência. Margonari et al. (2012) apontam que para impedir a expansão geográfica das leishmanioses, além da vigilância entomológica e busca de infecção natural de vetores e reservatórios para monitoramento das áreas de risco; o conhecimento público sobre a doença é extremamente importante, uma vez que a população é uma grande aliada no processo de prevenção da doença. Basano e Camargo (2004) e Ribeiro (2013) demonstram também que a redução da transmissão está associada à melhoria das condições de vida da população.

Como ainda são escassos os recursos públicos para o monitoramento e tratamento da doença na região (OLIART-GUZMÁN et al., 2013) e não são conhecidas medidas preventivas eficazes para diminuir o risco de transmissão e número de casos de LTA na área endêmica. Dessa maneira a integração de rede de pesquisadores junto ao Estado pode contribuir para melhor entendimento da dinâmica de transmissão da LTA, como visto nesse estudo; além de orientar estudos futuros de biologia e contribuir para a implantação de estratégias de controle dos focos da doença na área endêmica. Como perspectiva desse estudo um relatório técnico será encaminhado as autoridades de saúde do município.

Os dados apresentados indicam que provavelmente a doença ainda possua características de ruralidade, associada à atividade laboral. A ocorrência de várias espécies de *Leishmania* nos isolados de pacientes e diversidade de vetores coletados fornecem evidências da heterogeneidade de transmissão, evidenciando a necessidade de uma investigação epidemiológica mais ampla e contínua envolvendo vetores, hábitos domiciliares, reservatórios, virulência dos parasitos e incidência das formas clínicas.

6 CONCLUSÕES

Esse trabalho registra um maior número de espécies no estado do Acre, e possivelmente a diversidade ainda seja maior devido ao grande número de novos registros encontrados e a possibilidade de novas espécies como descrita nesse trabalho.

O encontro de *Lu. davisi*, importante vetor de LTA, como a segunda espécie mais abundante e vários *pools* positivos para o complexo *Le. braziliensis*, sugere que essa espécie é uma das principais vetoras de leishmaniose no município. Enquanto os resultados de infecção natural da espécie *Lu. auraensis* por diferentes espécies de *Leishmania*, somado a abundância de espécimes capturados, ampliam os dados sobre vetores suspeitos na região Norte e sugere novos estudos para a comprovação vetorial dessa espécie no ciclo de LTA.

Os dados referentes à abundância e infecção natural dos flebotomíneos estão de acordo com os estudos entomológicos realizados em Madre de Dios e sugerem que a transmissão do ciclo no município de fronteira é similar ao ciclo de transmissão reportado no Peru.

O perfil epidemiológico dos indivíduos acometidos por LTA nesse estudo ficou assim caracterizado: forma clínica cutânea, predomínio do sexo masculino, residentes na zona rural e maior incidência das espécies de *Le. (V.) braziliensis* (71,4%). Esse dado indica que provavelmente a transmissão ocorra em ambiente rural/ florestal com caráter ocupacional. A ocorrência de *Le. (V.) shawi*, *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (Le.) amazonensis* nos isolados de pacientes fornece evidências da heterogeneidade de ciclos de transmissão, evidenciando o papel dos outros vetores de flebotomíneos descritos nesse estudo na transmissão de LTA.

Assis Brasil se mantém com altos índices de agravo da doença e apresenta características de endemia da LTA. A notificação de casos da doença em localidades rurais que margeiam o centro urbano e o registro de 24% da amostragem de casos humanos de LTA residentes na zona urbana revela uma preocupação e recomendação de investigações de vigilância epidemiológicas no ambiente periurbano do município.

REFERÊNCIAS²

- ACARDI, S. A.; LIOTTA, D. J.; SANTINI, M. S.; ROMAGOSA, C. M.; SALOMÓN, O. D. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 796-799, 2010.
- ACRE. **Bacia do Alto Acre na Regional de Desenvolvimento do Alto Acre**. 2008. Disponível em: <<http://www.mp.ac.gov.br/wp-content/files/Imagem04.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2012.
- AGUIAR, G. M.; AZEVEDO, A. C. R.; MEDEIROS, W. M.; ALVES, J. R. C.; RENDEIRO, V. Aspects of the ecology of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra Dos Reis, Coast of Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 56, n. 2, p. 143-149, 2014.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição e Hábitats. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. v. 1, p. 207-255.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; GARCIA, L.; FERNANDEZ, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI FILHO, G.; VARGAS, Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.
- 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 Trop.**, v. 118, n. 3, p. 204–208, 2011.
- ALMEIDA, M. C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 861-870, 2003.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES, C. R.; ALMEIDA, M. S.; SILVA, F. S.; PEREIRA, B. A. S.; PEREIRA, R. L. A.; CÔRTEZ, L. M. C. Componentes de superfície do parasito e o papel na interação parasito-hospedeiro. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. v. 1, p. 139-157.
- ANDRADE, B. B.; OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Role of Sand fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, n. 2-3, p. 122-127, 2007.

---

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARAUJO-PEREIRA, T.; FUZARI, A. A.; FILHO, J. D.; PITA-PEREIRA, D.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of leishmaniasis transmission in the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 360, p. 2-5, 2014.

ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. The know geographical distribution of sand flies in the state of Acre, Brazil (Diptera: Psychodidae). **Acta Amaz.**, v. 12, p. 401-408, 1982.

ARIAS, J. R.; MILES, M. A.; NAIFF, R. D.; POVOA, M. M.; FREITAS, R. A.; BIANCARDI, C. B.; CASTELLON, E. G. Flagellate Infections of Brazilian Sand Flies (Diptera: Psychodidae): Isolation *in vitro* and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 6, p. 1098-1108, 1985.

ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 3, p. 279-286, 1981.

ARÍSTIDES H. La leishmaniasis tegumentaria en el Alto Tambopata, Departamento de Puno, Perú. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 15, p. 15-24, 1999.

AZEVEDO, A. C. R.; COSTA, S. M.; PINTO, M. C. G.; SOUZA, J. L.; CRUZ, H. C.; VIDAL, J.; RANGEL, E. F. 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, v. 103, n. 8, p. 760-764, 2008.

AZEVEDO, A. C. R.; MONTEIRO, F. A.; CABELLO, P. H.; DE SOUZA, N. A.; ROSA-FREITAS, M. G.; RANGEL, E. F. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 305-322, 2000.

AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL, E. F.; QUEIROZ, R. G. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturalmente infectados com flagelados peripylarian em Baturité, um foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Ceará, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 479-479, 1990.

AZEVEDO, P. C. B.; LOPES, G. N.; FONTELES, R. S.; VASCONCELOS, G. C.; MORAES, J. L. P.; REBELO, J. M. M. The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, State of Maranhão, Brazil. **Neotrop. Entomol.**, v. 40, n. 2, p. 271-277, 2011.

BARBOSA, M. G. V.; FÉ, N. F.; MARCIÃO, A. H. R.; SILVA, A. P. T.; MONTEIRO, W. M.; GUERRA, J. A. O. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a focus of American cutaneous leishmaniasis on the urban periphery of Manaus, State of Amazonas. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p. 485-491, 2008.

BARRETT, T. V.; FREITAS, R. A.; TORRES, W. M. P. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) do alto Rio Madeira, Rondônia, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004. **Resumos...** Gramado, RS, Brasil, 2004. Disponível em: <http://www.seb.org.br/eventos/cbe/xxcbe/anais/resumosdeposteriores/RESUMOS/resumo_984.html>. Acesso em: 25 jun. 2014.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BEJARANO, E. E.; ROJAS, W.; URIBE, S.; VÉLEZ, I. D. New findings on the geographic distribution of the Verrucarum group (Diptera: Psychodidae) in Colombia. **Biomedica**, v. 23, n. 1, p. 87-102, 2003.

BENICIO, E. A.; GADELHA, E. P. N.; TALHARI, A.; SILVA JR, R. M.; FERREIRA, L. C.; SANTOS, M. C. C.; MIRA, M. T.; OLIVEIRA, C. M. C.; TALHARI, C.; TALHARI, S.; MACHADO, P. R.; SCHRIEFER, A. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 6, p. 1141-1144, 2011.

BONFIELD, J. K.; SMITH, K. F.; STADEN, R. A new DNA sequence assembly Program. **Nucl. Acids Res.**, v. 23, n. 24, p. 4992-4999. 1995.

BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, P. **Numerical Ecology with R**. New York, NY: Springer, 2011. v. 2, 306 p.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E. F.; MARTINS, C. A. SOMMER, I. B.; VALENÇA, H. F.; ALMEIDA, F. A.; GOMES, J. Leishmaniose tegumentar americana em centro de Treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.31, n. 6, p. 575-578, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Relatório Técnico. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 180 p.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G.; Biologia de flebotômíneos neotropicais. In: RANGEL, E.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotômíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. v. 1, p. 257-274.

BRITTO, C. F. P. C.; PITA-PEREIRA, D. Diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. em flebótomos provenientes de áreas de ocorrência de leishmanioses. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. v. 1, p. 217-231.

BRITO, M. E. F.; ANDRADE, M. S.; MENDONÇA, M. G.; SILVA, C. J.; ALMEIDA, E. L.; LIMA, B. S.; FÉLIX, S. M.; ABATH, F. G. C.; GRAÇA, G. C.; PORROZZI, R.; ISHIKAWA, E. A.; SHAW, J. J.; CUPOLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rain forest region of northeastern Brazil. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 14, n. 10, p. 1278-1286, 2009.

BUSTAMANTE, M.; DIAZ, M.; ESPINOZA, J.; PARRADO, R.; REITHINGER, R.; GARCÍA, A. L. Sand fly fauna in Chapare, Bolivia: an endemic focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **J. Med. Entomol.**, v. 49, n. 5, p. 1159-1162, 2012.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S.; DUTRAY, W. O.; SOTOZ, M.; ALONSOZ, C.; GOLLOBS, K. J.; CARVALHO, E. M.; DE JESUS, A. R. Effect of LACK and KMP11 on IFN- γ Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis Patients. **Scan. J. Immunol.**, v. 61, n. 4, p. 337-342, 2005.

CARVALHO, M. R.; VALENÇA, H. F.; DA SILVA, F. J.; PITA-PEREIRA, D.; DE ARAÚJO P. T.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; FILHO, S. P. B. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop.**, v. 116, n. 1, p. 108-110, 2010a.

CARVALHO, S. M. S.; SANTOS, P. R. B.; LANZA, H.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Diversity of phlebotomine sandflies in Ilheus, State of Bahia, Brazil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 19, n. 3, p. 239-244, 2010b.

CASTELLÓN, E. G. *Lutzomyia* Sand Flies in the Brazilian Amazon Basin (Diptera: Psychodidae). Manaus: INPA, 2009. 202 p.

CASTELLÓN, E. G.; ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A.; NAIFF, R. D. Os Flebotomíneos da região Amazônica, estrada Manaus – Humaitá, Estado do Amazonas, Brasil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Acta Amaz.**, v. 24, n. 1/2, p. 91-102, 1994.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern (DPDx)**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

CESÁRIO, M.; CESÁRIO, R. R.; ANDRADE-MORRAYE, M. Environmental change and health impacts in Amazonia. **IHDP Update.**, p. 26-34, 2011.

COELHO, L. I. C.; PAES, M.; GUERRA, J. A.; BARBOSA, M. G.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M. E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 108, n. 3, p. 671–677, 2011.

CORRÊA, J. R.; BRAZIL, R. P.; SOARES, M. J. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus – A mini review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 587-592, 2005.

CORTE, A. A.; NOZAWA, M. R.; FERREIRA, M. C.; PIGNATTI, M. G.; RANGEL, O.; LACERRA, S. S. Eco-epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Campinas, São Paulo, Brazil. **Cad. Saú. Pública**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 465-472, 1996.

COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, D.; SAMPAIO, G.; CARNEIRO, F.; LISBOA, E.; SILVA, L. M.; BARRAL, A. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic

approach of the tegumentar leishmaniasis in Brazil. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79, n. 3, p. 70-83, 2009.

COSTA, S. M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J. C.; LAINSON, R. RANGEL, E. F. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s. l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil--mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 149-153, 2007.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; DE BRITO, M. E. F.; FALQUETO, A.; NAIFF, M. F.; GRIMALDI-JR, G. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3126–3132, 2003.

DA GRAÇA, C. G.; VOLPINI, A. C.; ROMERO, G. A. S.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 5, p. 664-674, 2012.

DAVIES, C. R.; FERNANDEZ, M.; PAZ, L.; RONCAL, N.; LLANOS-CUENTAS, A. *Lutzomyia verrucarum* can transmit *Leishmania peruviana*, the aetiological agent of Andean cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 5, p. 603-606, 1993.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305–318, 2004.

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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 98, n. 6, p. 733-737, 2003.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; BARROS, G. C.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR, G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil: further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 499-500, 1991.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. **Med. Veter. Entomol.**, v. 18, n. 4, p. 71-80, 2004.

FIGUEIRA, E. A. G.; SILVA, G.; CHAGAS, E. C. S.; SHIMABUKURO, P. H. F. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Lábrea, state of Amazonas, Brazil, with a description of *Evandromyia (Aldamyia) apurinan* Shimabukuro, Figueira & Silva, sp. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 2, p. 280-287, 2013.

FLOETER-WINTER, L. M. New molecular targets for PCR identification of *Leishmania*. **BEPA. Bol. epidemiol. Paul.**, v. 7, n. 73, p. 21-27, 2010. Disponível em: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v7n73/v7n73a03.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2011.

FONTELES, R. S. **Estudo do ciclo de vida, fonte alimentar e capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* no Maranhão, Brasil**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2009.

FREITAS, R. A.; BARRETT, T. V.; NAIFF, R. D. *Lutzomyia reducta* Feliciangeli et al., 1988, A host of *Leishmania amazonensis*, Sympatric with two other members of the *Flaviscutellata* complex in southern Amazonas and Rondonia, Brazil (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 363-369, 1989.

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). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 53-59, 2002.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. v. 1, p. 23-52.

GALATI, E. A. B. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae):** classificação, Morfologia, Terminologia, identificação de Adultos. São Paulo: Universidade de São Paulo - Faculdade de Saúde Publica - Departamento de Epidemiologia, 2014. 127 p.

GARCIA, A. L.; TELLEZ, T.; PARRADO, R.; ROJAS, E.; BERMUDEZ, H.; DUJARDIN, J. C. Epidemiological monitoring of American tegumentar leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 12, n. 101, p. 1208-1213, 2007.

GARCIA, L.; KINDT, A.; BERMUDEZ, H.; LLANOS-CUENTAS, A.; DE DONCKER, S.; AREVALO, J.; TINTAYA, K. W. Q.; DUJARDIN, J. C. Culture-Independent Species Typing of Neotropical Leishmania for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 2294-2297, 2004.

GARCÍA, A. L.; PARRADO, R.; ROJAS, E.; DELGADO, R.; DUJARDIN, J.; REITHINGER R. Leishmaniasis in Bolivia: Comprehensive Review and Current Status. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 5, p. 704-711, 2009.

GIL, L. H.; BASANO, A. S.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G.; BARATA, I.; ISHIKA-WA, E. A.; CAMARGO, L. M. A.; SHAW, J. J. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 751-5, 2003.

GIL, L. H. S.; ARAÚJO, M. S.; VILLALOBOS, J. M.; CAMARGO, L. M. A.; OZAKI, L. S.; FONTES, C. J. F.; RIBOLLA, P. E. M.; KATSURAGAWA, T. H.; CRUZ, R. M.; SILVA, A. A.; SILVA, L. H. P. Species structure of sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna in the Brazilian western. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 955-959, 2009.

GOMES, L. H. M.; ALBUQUERQUE, M. I. C.; ROCHA, L. C.; PINHEIRO, F. G.; FRANCO, A. M. R. Diversity and distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a

military area in the state of Amazonas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 5, p. 651-656, 2013.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTELLI, N.; COLWELL, R. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. **Ecology Letters**, v. 4, p. 379-391, 2001.

GRIMALDI JR, G.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 1, p. 37-42, 1996.

GRIMALDI JR, G.; MOMEM, H.; NAIFF, R. D.; PRATT, D. M. M.; BANET, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 645-661, 1991.

GUERRA, J. A. O.; RIBEIRO, J. A. S.; COELHO L.; BARBOSA, M. G. V.; PAES, G. P. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2319-2327, 2006.

GUERRA, J. A.; PRESTES, S. R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L. I.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M. G. V.; FERREIRA, L. C. L. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 980, 2011.

GUTIÉRREZ, M. A. C.; VIVERO, R. J.; VÉLEZ, I. D.; PORTER, C. H.; URIBE, S. DNA Barcoding for the Identification of Sand Fly Species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. **Plos One**, v. 9, n. 1, e85496, 2014.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-Step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* Complexes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 7, p. 1989-1995, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Anuário Estatístico do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 out. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Projeto TerraView**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/terraview/index.php>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

IVES, A.; RNET, C.; PREVEL, F.; RUZZANTE, G.; FUERTES-MARRACO, S.; SCHUTZ, F.; ZANGGER, H.; REVAZ-BRETON, M.; LYE, L. F.; HICKERSON, S. M.; BEVERLEY, S. M.; ACHA-ORBEA, H.; LAUNOIS, P.; FASEL, N.; MASINA, S. *Leishmania* RNA vírus controls the severity of mucocutaneous. **Science**, v. 11, n. 331, p. 775-778, 2011.

JACKSON, M. L. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIENTO, D.; SAMPAIO, G.; CARNEIRO, F.; LISBOA, E.; SILVA, L. M.; BARRAL, A. Clinical modalities, diagnosis

and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79, p. 70-83, 2009.

JENNINGS, Y. L.; SOUZA, A. A. A.; ISHIKAWA, E. A.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; SILVEIRA, F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. Causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. **Parasite**, v. 21, n. 39, p. 1-11, 2014.

KATHOLI, C. R.; TOË, L.; MERRIWETHER, A.; UNNASCH, T. R. Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. **J. Inf. Disease**, v. 172, n. 5, p. 1414-1417, 1995.

KATO, H.; CÁCERES, A. G.; MIMORI, T.; ISHIMARU, Y.; SAYED, A. S.; FUJITA, M.; IWATA, H.; UEZATO, H.; VELEZ, L. N.; GOMEZ, E. A.; HASHIGUCHI, Y. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 3661-3665, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of *Phlebotomine* sand flies. **Clin. Derm.**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KREBS, C. J.; HICKMAN, G. C.; HICKMAN, S. M. **Ecology**: the experimental analysis of distribution and abundance. Universidade de Michigan: Harper Collins College Publishers; 1994. v. 1, p. 801. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Ecology:+The+Experimental+Analysis+of+Distribution+and+Abundance#0>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev. Pan-Amazônica de Saúde.**, v. 1, n. 2, p. 13-38, 2010.

LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; DE SOUZA, A. A. A.; PÓVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A.; SILVEIRA, F. T. *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Ann. Par. Hum. Comp.**, v. 64, n. 3, p. 200-207, 1989.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 421-424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 31, n. 321, p. 389-404, 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmanias* and leishmaniasis of the new world, with particular reference to Brazil. **Paho Bulletin**, v. 7, n. 4, p. 1-19, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis – the Neotropical *Leishmania* species. In: COX FEG, KRIER JP, Wakelin D, editors. **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**. London: Arnold, 1998. v. 5, p. 241-266.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; DE SOUZA, A. A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. The dermal Leishmaniasis of Brazil, with special reference to the Eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T.; FALQUETO, A. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 437-439, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; READY, P. D.; MILES, M. A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 4, p. 530-536, 1981.

LE PONT, F.; DESJEUX, P. Leishmaniasis in Bolivia. II. The involvement of *Psychodopygus yucumensis* and *Psychodopygus llanosmartinsi* in the selvatic transmission cycle of *Leishmania braziliensis braziliensis* in a lowland subandean region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3, p. 311-318, 1986.

LEONARDO, F. S.; REBÊLO, J. M. M. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 37, n. 3, p. 282-284, 2004.

LLANOS-CUENTAS, A.; TULLIANO, G.; ARAUJO-CASTILLO, R.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; SANTAMARIA-CASTRELLON, G.; RAMIREZ, L.; LAZO, M.; DE DONCKER, S.; BOELAERT, M.; ROBAYS, J.; DUJARDIN, J. C.; AREVALO, J.; CHAPPUIS, F. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 223-31, 2008.

LUCAS, C. M.; FRANKE, E. D.; CACHAY, M. I.; TEJADA, A.; CRUZ, M. E.; KREUTZER, R. D.; BARKER, D. C.; MCCANN, S. H.; WATTS, D. M. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 2, p. 312-317, 1998.

LUZ, E.; MEMBRIVE, N.; CASTRO, E. A.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J. A.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. **Ann. Trop. Med. Par.**, v. 94, n. 6, p. 623-631, 2000.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, N. B.; SOUSA, L. C.; LINHARES, F. E.; AMÓRA, S. S. A.; OLIVEIRA, L. M. B. Sandfly seasonality in a visceral leishmaniasis endemic area, Sobral municipality, Ceará, Brazil. **Ciênc. Anim.**, v. 18, n. 2, p. 67-74, 2008.

MACHADO, T. O.; BRAGANÇA, M. A. L.; CARVALHO, M. L.; ANDRADE-FILHO, J. D. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in different environments in the district of Taquaruçú, state of Tocantins, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 7, p. 955-959, 2012.

MARGONARI, C.; MENEZES, J. A.; ROCHA, M. N.; MAIA, K. N.; OLIVEIRA, M. E.; FONSECA, A. L.; DE SOUSA, F. F.; FERREIRA, E. C. F.; MADUREIRA, A. P.; MELO,

M. N.; SOARES, R. P. Public knowledge about and detection of canine visceral leishmaniasis in urban Divinópolis, Brazil. **J. Trop. Med.**, p. 1-8, 2012.

MAGUIÑA, C.; GUERRA, H.; VENTOSILLA, P. Bartonellosis. **Clin. Derm.**, v. 27, n. 3, p. 271-80, 2009.

MARTINS, A. V.; SILVA, J. E. Notas sobre os flebotomíneos do estado do Acre, com a descrição de duas espécies novas (Diptera: Psychodidae). **Rev. Bra. Bio.**, v. 24, p. 127-138, 1964.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Sau. Publica.**, v. 10, n. 2, p. 359-375. 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; FACUNDES, A.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. A questão do controle das Leishmanioses no Brasil. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. v. 1, p. 431-463.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual Phlebotomine sandflies (dipteral: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; GUEDES, K. S.; SILVA, F. O. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DIAS, C. L. F.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 58-62, 2011.

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M. G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Frequência de infecção de *Lutzomyia* flebotomíneos com *Leishmania braziliensis* em uma área endêmica do Brasil, avaliada pela Pinpoint Captura e Reação em Cadeia da Polimerase. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 185-188, 2002.

MIRANDA, T. M.; MALAQUIAS, L. C. C.; ESCALDA, P. M. F.; RAMALHO, K. C.; COURA-VITAL, W.; DA SILVA, A. R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Descriptive study of American tegumentar leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Pan-Amaz. Saude.**, v. 2, n. 1, p. 27-35, 2011.

MISSAWA, N. A.; MACIEL, G. B. M. L. List of species in the genus *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) from the State of Mato Grosso. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 40, n. 1, p. 11-14, 2007.

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MONZOTE, L.; MONTANO, I.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C.; VANDER A. G. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. **Parasitology**, v. 137, n. 8, p. 1159-1168, 2010.

MUKHOPADHYAY, J.; GHOSH, K.; BRAIG, H. R. Identification of cutaneous leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* e *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. **Acta Trop.**, v. 2, n. 76, p. 277-283, 2000.

NAIFF, R. D.; FREITAS, R. A., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R., BARRETT, T. V., MOMEN, H.; GRIMALDI-JR, G. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 6, p. 317-332, 1991.

NETO, J. L. G.; BAIMA, J. M.; PASSOS, M. A. B. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *yuilli yuilli* Young & Porter, 1972 (Diptera: Psychodidae) in Roraima State, Brazil. **Rev. Pan-Amaz. Saude.**, v. 2, n. 1, p. 85-87, 2011.

OLIART-GUZMÁN, H.; MARTINS, A. C.; MANTOVANI, S. A. S.; BRAÑA, A. M.; DELFINO, B. M.; PEREIRA, T. M.; SANTOS, A. P.; FILGUEIRA-JÚNIOR, J. A.; CASTELO-BRANCO, F. L. C.; CAMPOS, R. G.; OLIVEIRA, C. S. M.; MUNIZ, P. T.; SILVA-NUNES, M. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana na fronteira amazônica: estudo retrospectivo em Assis Brasil, Acre. **Rev. Patol. Trop.**, v. 42, n. 2, p. 187-200, 2013.

OLIVEIRA, D. M.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 204-210, 2011.

OLIVEIRA, J. G. S.; NOVAIS, F. O.; DE OLIVEIRA, C. I.; DA CRUZ-JUNIOR, A. C.; CAMPOS, L. F.; ROCHA, A. V.; BOAVENTURA, V.; NORONHA, A.; COSTA, J. M. L.; BARRAL, A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 94, n. 1, p. 55-59, 2005.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Feeding preference of sandflies in the Amazon, Maranhão State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 9, p. 2183-2186, 2008.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp. in sandflies (Psychodidae, Lutzomyia) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 39, n. 6, p. 540-543, 2006.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M. T. Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease gp63. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 5, p. 1377-1389, 2012.

PACHECO, R. S.; CARVALHO-COSTA, F. A. Diversidade genética em parasitos do gênero *Leishmania*: uma abordagem molecular. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. v. 1, p. 29-39.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; MALAFRONTTE, R. S. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 87-94, 2007.

PERU. Ministerio de Salud del Peru. Análisis y tendencia de leishmaniosis em el Peru: situación hasta agosto de 2012. **Bol. Epidemiol.** Disponível em: <<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2012/37>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A. Interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. In:_____. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. 2012. Cap. 12, p. 1-45. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

QUEIROZ, R. G.; VASCONCELOS, I. A.; VASCONCELOS, A. W.; PESSOA, F. A.; SOUZA, R. N.; DAVID, J. R. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 6, p. 693-698, 1994.

QUISPE, D.; RADO, D.; QUISPE, W.; PACHECO, R. Sandfly Fauna (Diptera: Psychodidae) Of Intra And Peri - domicilliary environments in aguas calientes, la convencion, Cusco, Perú. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHLEBOTOMINE SANDFLIES (ISOPS6), 11., 2008, Lima, Peru. **Resumos...** Lima, Peru. Miraflores, 2008. p. 41.

RAMOS, W. R.; MEDEIROS, J. F.; JULIÃO, G. R.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M.; MARIÁLVIA, E. F.; DESMOULIÈRE, S. J. M.; LUZ, S. L. B.; PESSOA, F. A. C. Anthropic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. **Acta Trop.**, v. 139, p. 44-52, 2014.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

REBÊLO, J. M. M.; ARAÚJO, J. A. C.; CARVALHO, M. L.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, S. T. Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 3, p. 247-253, 1999.

RÊGO, F. D.; SHIMABUKURO, P. H. F.; QUARESMA, P. F.; COELHO, I. R.; TONELLI, G. B.; SILVA, K. M. S.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S.; GONTIJO, C. M. F. Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 220, p. 1-12, 2014.

REMY-KRISTENSEN, A.; PERROTEY, S.; PESSON, B.; GARCIA-STOECKEL, M.; FERTE, H.; MORILLAS-MARQUEZ, F.; LEGER, N. *Phlebotomus sergenti* (parrot 1917): morphological and isoenzymatic comparisons of two natural populations from Tenerife (Canary Islands, Spain) and Crete (Greece). **Parasitol. Res.**, v. 82, n. 1, p. 48-51, 1996.

REYES, J. F.; HERBAS, M. A. **La Amazonía Boliviana y los objetivos de desarrollo del milênio**. Cobija: Herencia, ARA; 2012. Disponível em: <<http://www.avina.net/esp/wp-content/uploads/2012/09/odm-final-Bolivia-copia.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

RIBEIRO, M. D. **Diagnóstico Ambiental em Saúde: Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Acre**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca. Franca, São Paulo, 2013.

ROGERS, M. B.; HILLEY, J. D.; DICKENS, N. J.; WILKES, J.; BATES, P. A.; DEPLEDGE, D. P.; HARRIS, D.; HER, Y.; HERZYK, P.; IMAMURA, H.; OTTO, T. D.; SANDERS, M.; SEEGER, K.; DUJARDIN, J. C.; BERRIMAN, M.; SMITH, D. F.; HERTZFOWLER, C.; MOTTRAM, J. C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 2011.

ROGERS, W. O.; WIRTH, D. F.; Kinetoplast DNA minicircles: Regions of extensive sequence divergence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 565-569, 1987.

RYAN, L.; SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 4, p. 547-548, 1984.

SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SANTAMARÍA, E.; PONCE, N.; ZIPA, Y.; FERRO, C. Presencia em el peridomicilio de vectores infectados com *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-S94, 2006.

SARAIVA, L.; CARVALHO, G. M.; GONTIJO, C. M.; QUARESMA, P. F.; LIMA, A. C.; FALCÃO, A. L.; ANDRADE F. J. D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 46, n. 5, p. 1159-1163, 2009.

SCARPASSA, V. M.; ALENCAR, R. B. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 258, p. 2-11, 2013.

SHAW, J. J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. A review. **Braz. J. Genet.**, v. 20, n. 1, 1997.

SHAW, J. J.; ROSA, A. T.; SOUZA, A.; CRUZ, A. C. Transmissão de outros agentes. In: RANGEL, E.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. v. 1, p. 337-351.

SHAW, J. J.; DE FARIA, D. L.; BASANO, S. A.; CORBETT, C. E.; RODRIGUES, C. J.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M. A. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondônia state, western Amazonia, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 101, n. 8, p. 681-688, 2007.

SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A.; LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; SILVEIRA, F. T. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, de Souza,

Póvoa, Ishikawa & Silveira, in Pará State, Brazil. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 66, n. 6, p. 243-246, 1992.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: II Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the lower amazon region – The feeding habitats of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 396-405, 1968.

SHENDER, L. A.; SANTOS, M. L.; MONTGOMERY, J. M.; CONRAD, P. A.; GHERSI, B. M.; RAZURI, H.; LESCANO, A. G.; MAZET, J. A. K. Native Rodent Species Are Unlikely Sources of Infection for *Leishmania (Viannia) braziliensis* along the Transoceanic Highway in Madre de Dios, Peru. **Plos One.**, v. 9, n. 7, p. 1-12, 2014.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotrop.**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2011.

SILVA, A. M.; CAMARGO, N. J.; SANTOS D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A. C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E. C.; KONOLSAISEN, J. F.; BISELTO JR, A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E. A. B. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotrop. Entomol.**, v. 37, n. 2, p. 209-225, 2008.

SILVA, F. S.; CARVALHO, L. P. C.; FRANCISCO, C. P.; MORAES, J. L. P.; REBÊLO, J. M. M. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em uma área de cerrado do estado do Maranhão, Brasil. **Neotrop. Entomol.**, v. 39, n. 6, p. 1032-1038, 2010a.

SILVA, N. S.; MUNIZ, V. D. Epidemiology of American tegumentar leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. **Cad. Saúde Pública.**, v. 25, n. 6, p. 1325-1336, 2009.

SILVA, N. S.; VIANA, A. B.; CORDEIRO, J. A.; CAVASINI, C. E. American cutaneous leishmaniasis in the State of Acre, Brazil. **Rev. Saúde Pública.**, v. 33, n. 6, p. 554-559, 1999.

SILVA, P. E. S.; FREITAS, R. A.; SILVA, D. F.; ALENCAR, R. B. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma reserva de campina no Estado do Amazonas, e sua importância epidemiológica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n.1, p. 78-81, 2010b.

SILVA-NUNES, M.; CAVASINI, C. E.; SILVA, N. S.; GALATI, E. A. B. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 11, n. 2, p. 241-51, 2008.

SILVEIRA, F. T. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) in the Amazon region, Brazil: clinical and epidemiological aspects. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79, n. 3, p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A.; DE SOUZA, A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2002.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R. SHAW, J. J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* in Pará state, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 127-130, 1991.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). **Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?saude=http%3A%2F%2Fdtr2004.saude.gov.br%2Fsinanweb%2Findex.php&botaoook=OK&obj=http%3A%2F%2Fdtr2004.saude.gov.br%2Fsinanweb%2Findex.php>>. Acesso em: 28 set. 2014.

SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; BARATA, I. R.; SILVA, M. G. S.; LIMA, J. A. N.; PINHEIRO, M. S. B.; SILVA, F. M. M.; VASCONCELOS, L. S.; CAMPOS, M. B.; ISHIKAWA, E. A. Y.. Phlebotominae fauna in Serra dos Carajás, Pará State, Brazil, and its possible implications for the transmission of American tegumentar leishmaniasis. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1, n. 1, p. 45-51, 2010.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TELES, C. B. G.; BASANO, A. S.; ZAGONEL-OLIVEIRA, M.; CAMPOS, J. J, OLIVEIRA, A. F. J.; FREITAS, R. A.; MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; BARRAL, A.; CAMARGO, L. M. A. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 1, p. 60-66, 2013a.

TELES, C. B. G.; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; OGAWA, G. M.; CAVALCANTE, E. A.; MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A.; CAMARGO, L. M. A. Description of a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) and new records of sand flies from the State of Acre, northern Brazil. **Zoo**, v. 3609, n. 1, p. 85-90, 2013b.

TEMPONE, A. J.; PITALUGA, N. A.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Aspectos moleculares da interação Flebotomíneo-*Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. v. 1, p. 159-180.

TEODORO, U.; ALBERTON, D.; KÜHL, J. B.; SANTOS, E. S.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Ecologia de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* em área urbana do município de Maringá, Paraná. **Rev. Saúde Pública.**, v. 37, n. 5, p. 651-656, 2003.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; KUHL, J. B. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo - Estado do Paraná – Brasil. **Rev. Patol. Trop.**, v. 30, n. 2, 209-223, 2001.

THOMPSON, H. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOJAL DA SILVA, A. C.; CUPOLILLO, E.; VOLPINI, A. C.; ALMEIDA, R.; ROMERO, G. A. S. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, n. 9, p. 1388-1398, 2006.

TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI, H. H.; ELIAS, C. R.; LAROSA, R. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo, Brazil. III. Anthropic action influence in the vectorial succession of ACL. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2001.

TRUJILLO, A. V.; REINA, A. G.; ORJUELA, A. G.; SUÁREZ, E. P.; PALOMARES, J. E.; ALVAREZ, L. S. B. Seasonal variation and natural infection of *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an endemic species in the Orinoquia region of Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 4, p. 463-469, 2013.

VALDIVIA, H. O.; DE LOS SANTOS, M. B.; FERNANDEZ, R.; BALDEVIANO, G. C.; ZORRILLA, V. O.; VERA, H.; LUCAS, C. M.; EDGEL, K. A.; LESCANO, A.G.; MUNDAL, K. D.; GRAF, P. C. Natural Leishmania infection of *Lutzomyia* (*Trichophoromyia*) *auraensis* in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 511-517, 2012.

VERGARA, D.; CARRILLO, L. M.; BEJARANO, E. E.; VÉLEZ, I. D. Primer informe de *Lutzomyia yuilli* Young & Porter, 1972 y *Lutzomyia triramula* (Fairchild & Hertig, 1952) (Diptera: Psychodidae) em el departamento de Caldas, Colômbia. **Biota Neotrop.**, v. 8, n. 3, p. 251-253, 2008.

VIRGENS, T. M.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; SILVA, K. S.; LEAL, F. C.; FALQUETO, A. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. **Cad. Saú. Públ.**, v. 24, n. 12, p. 2969-2978, 2008.

WALKER, J.; ACESTOR, N.; GONGORA, R.; QUADRONI, M.; SEGURA, I.; FASEL, N.; SARAVIA, N. G. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, n. 2, p. 254-264, 2006.

WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT. WRBU. **Vector identification resources**. Disponível em: <http://www.wrbu.org/SpeciesPages_sf/A-hab/LUclb_A.html>. Acesso em: 01 fev. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Health topics: **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 12 out. 2014.

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, Associated Publishers, Gainesville, 1994. v. 54, 881 p.

APÊNDICES – Artigos de Periódicos/ Resumos

APÊNDICE A - TELES, C. B. G.; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; OGAWA, G. M.; CAVALCANTE, E. A.; MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A.; CAMARGO, L. M. A.. Description of a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) and new records of sand flies from the State of Acre, northern Brazil. *Zootaxa* (Online), v. 3609, p. 85-90, 2013.

Zootaxa 3609 (1): 085–090
www.mapress.com/zootaxa/
Copyright © 2013 Magnolia Press

Article

ISSN 1175-5326 (print edition)
ZOOTAXA
ISSN 1175-5334 (online edition)

<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3609.1.6>
<http://zoobank.org/vm:lsid:zoobank.org:pub:0E90CA54-4790-4539-A980-625FBE4314AA>

Description of a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) and new records of sand flies from the State of Acre, northern Brazil

CAROLINA BIONI GARCIA TELES^{1,2}, RUI ALVES FREITAS³, ARLEY FARIA JOSÉ DE OLIVEIRA⁴, GUILHERME MAERSCHNER OGAWA⁵, EDICARLOS ANDRÉ CAVALCANTE DE ARAÚJO¹, JANSEN FERNANDES MEDEIROS⁶, FELIPE ARLEY COSTA PESSOA⁶ & LUÍS MARCELO ARANHA CAMARGO^{1,2}

¹Departamento de Medicina, Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO. E-mail: carbioni2004@yahoo.com.br

²Instituto de Ciências Biomédicas 5, Universidade de São Paulo (USP), Monte Negro, RO, Brasil. E-mail: spider@ichusp.org

³Coordenação Sociedade, Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

⁴Universidade Federal do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. E-mail: soubiao@hotmail.com

⁵Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ RONDÔNIA), Rondônia, RO, Brasil. E-mail: jmedeiro@gmail.com

⁶Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM, Brasil.

E-mail: facpessoa@amazonia.fiocruz.br

Abstract

Groundbreaking studies of phlebotomine sand fly populations in Assis Brasil, State of Acre, Brazil, resulted in the collection of 13 new records of phlebotomine sand flies and one previously undescribed species, *Lutzomyia naïffii* sp. nov. is described here. The new species is similar to *Lutzomyia columbiana* (Ristorcelli & Van Ty) in measurements and other morphological characters.

Key words: *Lutzomyia naïffii* sp. nov., taxonomy, Neotropical region

Introduction

Some phlebotomine species serve as vectors for species of *Leishmania* Ross to animals and humans. In the municipality of Assis Brasil, State of Acre, Brazil, a significant number of cases of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), (1,098 cases/100,000 inhabitants) were reported between 2001 and 2010 (SINAN 2011). This warranted the study of phlebotomine sand fly diversity in the region, particularly to identify possible vectors of the ATL agents. The study also provided a basis for the preparation and implementation of protocols aimed at treating and controlling leishmaniasis.

Studies of phlebotomine sand flies in the State of Acre are still scanty, and little biological information is available (Martins & Silva 1964; Arias & Freitas 1982; Silva-Nunes *et al.* 2008). 52 sand fly species have previously been reported in the state (Aguar & Medeiros 2003; Azevedo *et al.* 2008); therefore, sand flies were sampled in the municipality of Assis Brasil in order to acquire a more comprehensive basic knowledge of the fauna. The survey resulted in the discovery of a species new to science, which is described here. 13 species are also newly recorded for the State of Acre, Brazil.

Material and methods

Specimens were collected from different areas in the municipality of Assis Brasil located approximately 330 km south west of Rio Branco (capital of the State of Acre), in the mesoregion of the Acre valley, on the left bank of the

Acre river. This area of Brazil borders Bolivia and Peru. The local climate is typically tropical with an average rainfall of 1,940 mm and temperature of 26.5°C. The economy is based on subsistence agriculture (coffee, corn and rice) and extractive production (Brazil nut and latex) as well as small-scale cattle farming (beef and milk production) and small timber exploitation.

Phlebotomine sand flies were captured between November 2009 and October 2010 with CDC light traps placed approximately 100 meters from domestic habitats. Collections were carried out monthly on six consecutive nights from 18:00 to 06:00 with four traps placed under trees at 150 cm above the ground.

Species identification, nomenclature and morphological terminology are in accordance with Young & Duncan (1994). In the description of the new species, the values (μm) of the holotype are given, followed in parentheses by those of a single paratype. Measurements were obtained by using an Olympus CBA microscope and a calibrated micrometer scale. Specimens were mounted in Canada balsam and morphological characters were illustrated with the aid of a camera lucida.

Results

Lutzomyia naiffi Freitas & Oliveira sp. nov. (Figs. 1–6)

Description. Male. Total body length (thorax to the end of the style), 1620 (1580). Overall Color: Light brown, slightly contrasting with pleurae and coxae. Head: length (from vertex to clypeus apex), 330 (320), width and interocular distance unmeasurable due to bilateral flattening during mounting process; eyes normal, with incomplete interocular suture; cibarium normal, without denticles, virtually complete chitinous hyaline arc; elongated and blurred narrow pigmented spot; antenna with flagellomere I = 190 (180) long, II + III = 200 (200); IV = 100 (110); V–IX = 90 (90); X and XI = 80 (80); XII and XIII = 60 (60); XIV = 50 (50), flagellomere I slightly shorter than II + III. Simple, elongated ascoids inserted nearly at the same level, with apices sometimes reaching the apical third of flagellomeres, not visible in apical two flagellomeres. Antennal formula: AIII–AXIV.2, AXV–AXVI.0. Pharynx without denticles or striations posteriorly, measuring (130) long. Labrum 190 (170) long. Palpus with total length of 490 (470), segments individually measuring: P1 = 30 (30); P2 = 100 (90); P3 = 100 (90); P4 = 90 (90); P5 = 170 (160), palpal formula: 1.4. (2.3). 5.; P5 slightly smaller than P2 + P3. Newstead's campaniform sensilla inserted medially on third palpus segment. Thorax: length: 400 (390) from the anterior edge of the mesonotum to the scutellum apex. Anepisternum with 6 (8) upper, 2 (2) lower bristles. Wing length, from insertion point to apex, 1320 (1300), maximum width 360 (390); alar indices: alpha = 220 (230), beta = 190 (180), gamma = 230 (240), and delta = 10 (10), gamma slightly greater than alpha. Legs of holotype and paratype absent. Abdomen: length from first tergite to style apex 1210 (1190); style length 80 (80), style width 30 (30), with two to four spines distributed as follows: three strong spines at apical 1/3, 1 apical, 1 subapical and 1 external placed immediately below subapical spine, 1 smaller, more narrow spine inserted medially halfway at middle 1/3 of style; subterminal bristle present. Coxite (Fig 4) length 190 (190), width 100 (100), with a tuft of approximately 20 long, foliaceous, flexible bristles, grouped in circular area on medial surface of coxite. Paramere length 140 (150), width 40 (40), wider basally, narrowing apically, apex dilated, turned dorsally, covered with long, slim bristles. Conical, elongate aedeagus with slim apex extending to approximately mid length of lateral lobe. Lateral lobe length 190 (160), normal aspect, unarmed, equal in length or slightly shorter than coxite. Genital filaments length 480 (440), slightly greater than five (5) times the length of genital pump, superficially striated, with round apex; genital pump length 90 (80).

Female. Unknown.

Type data and depository. Holotype (male), Brazil, State of Acre, Assis Brasil municipality, São Francisco road, 10°56'29"S 69°34'01"W, CDC light trap, 06/IX/2009, coll. L.M.A. Camargo and C.B.G. Teles. Paratype (male), same data as holotype. Type specimens are deposited in the entomological collections of the National Institute of Research of Amazonia (INPA).

Etymology. *Lutzomyia naiffi* is named in honor of our research colleague and friend, Mr. Roberto Daibes Naiff, for his substantial contributions to the field of medical entomology and parasitology in Brazil.

Comments. Based on morphological characters, *Lutzomyia naiffi* undoubtedly belongs to the *verrucarum* group, defined by Theodor (1965) and Young & Duncan (1994). This species group is characterized by the

following combination of character states: antennal ascoids simple; palpomere 5 longer than palpomere 3; coxite with persistent setae, style with four spines, subterminal seta present; paramere simple, without arms or extensions. The *verrucarum* group sensu Theodor (1965) was originally divided into two series, the *serrana* series, which includes species with two or three strong spines on the style, and the *verrucarum* series, which includes species with four spines on the style. In contrast, Kreutzer *et al.* (1990) placed all species of the *verrucarum* series with an isolated basal spine and three distal spines in the *townsendi* series and all other species with two distal median spines in the *verrucarum* series.

FIGURES 1–6. *Lutzomyia nairfi* sp. nov. Holotype male. 1, Head frontal view, Bar: 200 μ m. 2, Flagellomere II, Bar: 50 μ m. 3, Wing, Bar: 500 μ m. 4, Terminalia (a, style; b, coxite; c, paramere; d, lateral lobe; e, pump, genital filaments and aedeagus), Bar: 100 μ m. 5, Style in ventral position. 6, Tip of genital filament.

Lutzomyia naijffi is similar to *L. columbiana* (Ristorcelli & Van Ty 1941) in the shape of the parameres, although it differs in the following main aspects: the coxite bristle tuft, which is basal in *L. columbiana* and medial in *L. naijffi*; the position and thickness of the spines of the style, with *L. columbiana* having four strong spines of similar thickness, two inserted more basally and one inserted medially on the style, though all are nearly at the same level, while in *L. naijffi*, the two more basal spines (one of them being smaller and much thinner than the other) are inserted a little beyond the middle of the structure; the genital ducts of *L. naijffi* are longer than those of *L. columbiana* and slightly more than five times the genital pump length, while in *L. columbiana* they are about three times the pump length. *Lutzomyia naijffi* is different from all other species of the *verrucarum* group due to the presence of an internal median spine on the style that is much thinner compared to those of other species in the group. Nonetheless, the two more basal spines are situated almost at the same level as in other species of the *verrucarum* series; therefore, we propose that the new species should be included in this series. Galati (1995) treated the *verrucarum* group as part of genus *Pintomyia* Costa Lima, subgenus *Pifanomyia* Ortiz & Scorza.

The center of endemism of the *verrucarum* group is in northwestern South America with species distributed mainly in the Andes (Bejarano *et al.* 2003). However, some species of the *verrucarum* group, such as *Lutzomyia odax* (Fairchild & Hertig), *Lutzomyia newesi* (Damasceno & Arouck) and *Lutzomyia serrana* (Damasceno & Arouck) are known to occur in Brazil.

TABLE 1. New records of sand flies in the genus *Lutzomyia* captured in Assis Brasil Municipality, Acre State, Brazil, with geographical distribution of the species.

Subgenera / Groups	Species	Distribution
Evandromyia	<i>Lutzomyia tarapacaensis</i> Le Pont, Torres-Espejo & Galati	Bolivia*, Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia)
Nyssomyia	<i>Lutzomyia reducta</i> Feliciangeli, Ramirez Perez & Ramirez	Venezuela*, Peru, Brasil (Amazonas, Rondônia)
Pyntomyia	<i>Lutzomyia christenseni</i> Young & Duncan	Panamá*, Colômbia, Trinidad e Tobago, Brasil (Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo)
Ptychodopygus	<i>Lutzomyia hispidosa</i> (Fairchild & Hertig)	Panamá*, Belize, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Costa Rica, Suriname, Colômbia, Guiana Francesa, Equador, Brasil (Amapá, Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima)
	<i>Lutzomyia yucumensis</i> (Le Pont, Caillard, Tibayrenc & Desjeux)	Bolivia*, Peru, Brasil (Rondônia, Mato Grosso)
Trichophoromyia	<i>Lutzomyia melloi</i> (Causey & Damasceno)	Brasil (Amazonas*, Pará, Rondônia)
aragoi group	<i>Lutzomyia abunaensis</i> (Martins, Falcão & Silva)	Equador, Peru, Bolívia, Brasil (Rondônia*, Amazonas)
	<i>Lutzomyia brasiliensis</i> (Costa Lima)	Guiana Francesa, Peru, Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia, Maranhão, Ceará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais*, Rio de Janeiro, São Paulo)
dreisbachi group	<i>Lutzomyia dreisbachi</i> (Causey & Damasceno)	Venezuela, Colômbia, Suriname, Peru, Guiana Francesa, Brasil (Amazonas*, Amapá, Rondônia, Roraima, Pará)
migonei group	<i>Lutzomyia anderseni</i> Le Pont et Desjeux	Bolívia*, Brasil (Amazonas, Acre)
	<i>Lutzomyia termitophila</i> Martins, Falcão & Silva	Brasil (Rondônia, Tocantins, Piauí, Minas Gerais*, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Mato Grosso)
	<i>Lutzomyia williamsi</i> (Damasceno, Causey & Arouck)	Venezuela, Brasil (Amazonas, Pará*, Rondônia)
saulensis group	<i>Lutzomyia wilsoni</i> (Damasceno & Causey)	Brasil (Amazonas*, Rondônia)

*Type locality

New records of sand fly species

Among the captured species, three were identified as genus *Brumptomyia* França & Parrot, and 56 as genus *Lutzomyia* França of which two male specimens were identified as a previously unknown species. Among the species of *Lutzomyia* collected in this study, 13 are reported for the first time in the State of Acre (Table 1).

Discussion

The first record of *Lutzomyia abunaensis* and *L. yucumensis* in Brazil was from the State of Rondonia, and they are now recorded from the State of Acre. Both species have also been recorded from Peru and/or Bolivia (Young & Duncan 1994; Biancardi *et al.* 1982). *Lutzomyia dreisbachi* has been recorded many times in the Amazon basin, except in Bolivia. However, as Assis Brasil borders Bolivia, it is probable that *L. dreisbachi* will also be found in the latter. *Lutzomyia andersoni* was recorded for the first time in Brazil in the State of Mato Grosso (Missawa & Maciel 2007) and the State of Amazonas (Barbosa *et al.* 2008). We suspect that it is probably a widely distributed species in the Amazon Basin. *Lutzomyia bispinosa*, *L. williamsi*, *L. wilsoni* and *L. brasiliensis* are also wide spread in the Brazilian Amazon (Galati 2003; Young & Duncan 1994). *Lutzomyia christenseni*, *L. termitophila* and *L. melloi* are distributed throughout the Brazilian Amazon (Galati 2003; Young & Duncan 1994), but their distribution will probably be extended to Peru and Bolivia if additional sampling occurs there in the future. *Lutzomyia tarapacaensis*, described from Bolivia, was registered in the States of Pará, Amazonas (Freitas & Barrett 2002) and Rondônia (Teles *et al.* in press). It is likely widely distributed throughout the Amazon basin. *Lutzomyia* (*N.*) *reducta* has been recorded from the States of Amazonas and Rondônia (Galati 2003) and was determined to be naturally infected with *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw (Freitas *et al.* 1989). The diversity of phlebotomine sand flies in the State of Acre remains among the lowest in the North Region of Brazil when compared with other states in this region (Aguar & Medeiros 2003). This is undoubtedly due to a paucity of local surveys of the sand fly fauna, and the number of species of sand flies will probably increase significantly if additional surveys in the state are completed.

Acknowledgments

We wish to thank FAPESP for financial support (PROCESS Nr. 2008/11319-0). We are grateful to Dr. Lincoln Schwarzbach from ICMBio/Assis Brasil for technical support, and to the technical designer, Mr. Artêmio Coelho da Silva. We also wish to thank the laboratory technician, Mr. Francisco Lima Santos.

References

- Aguar, G.M. & Medeiros, W.M. (2003) *Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil*. In EF Rangel, R. Lainson (eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 207–255.
- Arias, J.R. & Freitas, R.A. (1982) The know geographical distribution of sand flies in the state of Acre, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Acta Amazonica*, 12, 401–408.
- Azevedo, A.C.R., Costa, S.M., Pinto, M.C.G., Souza, J.L., Cruz, H.C., Vidal, J. & Rangel, E.F. (2008) Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American cutaneous leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 760–767. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000800003>
- Barbosa, M.G.V., Fe, N.F., Marcião, A.H.R., Silva, A.P.T., Monteiro, W.M. & Guerra, J.A.O. (2008) Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área Peri urbana de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41, 485–491. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500010>
- Bejarano, E.E., Rojas, W., Uribe, S. & Velez, I.D. (2003) Sistemática de espécies de *Lutzomyia* del grupo verrucarum Theodor, 1965 (Diptera: Psychodidae). *Biomedica*, 23, 87–102.
- Biancardi, C.B., Arias, J.R., Freitas, R.A. & Castellon, E.G. (1982) The know geographical distribution of sand flies in the state of Rondonia, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Acta Amazonica*, 12, 167–179.
- Freitas, R.A., Barrett, T.V. & Naiff, R.D. (1989) *Lutzomyia reducta* Feliciangeli *et al.* 1988, a host of *Leishmania amazonensis*, sympatric with two other members of the *Flaviscutella* complex in Southern Amazonas and Rondonia, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, 363–369. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761989000300011>

- Freitas, R.A. & Barrett, T.V. (2002) Descriptions of *Lutzomyia* (*Evandromyia*) *georgii* n. sp. and a synopsis of the series *infraspinoza* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 239–245. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000200017>
- Galati, E.A.B. (1995) Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Boletín de la Dirección de Malaria y Saneamiento Ambiental*, 35, 133–142.
- Galati, E.A.B. (2003) *Morfologia e Taxonomia. Classificação de Phlebotominae*. In: EF Rangel, R. Lainson. (eds). *Phlebotominae do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23–51.
- Kreutzer, R., Palau, M., Morales, A., Fero, C., Felicianelli, D. & Young, D. (1990) Genetic relationships among phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the verrucarum species group. *Journal of Medical Entomology*, 27, 1–8.
- Martins, A.V. & Silva, J.E. (1964) Notas sobre os flebotomíneos do estado do Acre, com a descrição de duas espécies novas (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 24, 127–138.
- Missawa, N.A. & Maciel, G.B.M.L. (2007) List of species in the genus *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) from the state of Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 11–14.
- Ristorcelli, A. & Van Ty, D. (1941) Phlebotomines d'une région de Colombie au la verruga du Peru est devenue endémique depuis trois ans (seconde note). *Annales de parasitologie Humaine et Comparée*, 18, 251–269.
- Silva-Nunes, M., Cavasini, C.E., Silva, N.S. & Galati, E.A.B. (2008) Epidemiologia da leishmaniose tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 1, 241–251. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2008000200006>
- SINAN (2012) Sinan: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília. Available from: <http://www.saude.gov.br/Sinanweb> (Accessed May 24, 2012).
- Teles, C.B.G., Basano, S.A., Zagonel-Oliveira, M., Campos, J.J., Oliveira, A.F.J., Freitas, R.A., Medeiros, J.F., Pessoa, F.A.C., Barral, A. & Camargo, L.M.A. (2012) Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sand fly population in the municipality of Monte Negro, State of Rondonia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (in press).
- Theodor, O. (1965) On the classification of American phlebotomine. *Journal of Medical Entomology*, 2, 171–197.
- Young, D.G. & Duncan, M.A. (1994) 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*, 54, 1–881.

APÊNDICE B – TELES, C. B. G.; MEDEIROS, J. F.; SANTOS, A. P. A.; FREITAS, L. A. R.; KATSURAGAWA, T. H.; CANTANHÊDE, L. M.; FERREIRA, R. G. M.; CAMARGO, L. M. A. Molecular Characterization Of American Cutaneous Leishmaniasis in the Tri-Border Area of Assis Brasil, Acre, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**. 2014. No prelo.

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470.
 05403-000 São Paulo, SP, Brasil
 Fones: 55.11.3062-2174/ 3061-7005
 Fax: 55 11 3062-2174
 e-mail: revimtsp@edu.usp.br
<http://www.scielo.br/rimtsp>
<http://www.imt.usp.br/portal>

OF. RIMTSP 07/14

São Paulo, 10 de novembro de 2014

Prezado(a) Prof(a) Dr(a) Carolina Bioni Garcia Teles

Temos o prazer de comunicar que seu trabalho:

149/2014. TELES CBG, MEDEIROS JF, SANTOS APA dos, FREITAS LAR de, KATSURAGAWA TH, CANTANHÊDE LM, FERREIRA R de GM, CAMARGO LMA. Molecular characterization of American cutaneous leishmaniasis in the tri-border area of Assis Brasil, Acre, Brazil. (03/09/2014).

foi **aprovado para publicação** na REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO/USP.

Atenciosamente

Prof. Dr. Thales de Brito
 Editor, Revista do Instituto de
 Medicina Tropical de São Paulo/USP

APÊNDICE C – TELES, C. B. G.; DOS SANTOS, A. P. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; CUNHA, P. N. A.; CAVALCANTE, E. A.; FREITAS, R. A.; OGAWA, G. M.; MEDEIROS, J. F.; CACERES, O.; CAMARGO, L. M. A.. Characterization of Phlebotomine Infection with the *Leishmania braziliensis* Complex using Multiplex PCR in a Brazilian High Endemic Area Assis Brasil, State of Acre, Western Amazon, Brazil. In: Fifth World Congress on Leishmaniasis. (Resumo). 2013, Porto de Galinhas, Brasil. p. 345.

Worldleish 5
Fifth World Congress on Leishmaniasis
Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil,
May 13th to 17th, 2013

CERTIFICATE

We hereby certify that **CAROLINA BIONI GARCIA TELES; ANA PAULA DE AZEVEDO DOS SANTOS; ARLEY FARIA JOSÉ DE OLIVEIRA; PRÍSCILA NAIARA ARAÚJO CUNHA; EDICARLOS ANDRÉ CAVALCANTE DE ARAÚJO; RUI ALVES FREITAS; GUILHERME MAERSCHNER OGAWA; JANSEN FERNANDES MEDEIROS; FELIPE ARLEY COSTA PESSOA; ODÉCIO CÁCERES CÁCERES; LUÍS MARCELO ARANHA CAMARGO** participated in the **FIFTH WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS - WORLDLEISH 5** - by presenting the work entitled **CHARACTERIZATION OF PHLEBOTOMINE INFECTION WITH THE LEISHMANIA BRAZILIENSIS COMPLEX USING MULTIPLEX PCR IN A BRAZILIAN HIGH ENDEMIC AREA. ASSIS BRASIL, STATE OF ACRE, WESTERN AMAZON, BRAZIL.** in the **POSTER** sessions - convened from 13th to May 17th, 2013, at Porto de Galinhas, PE, Brazil.

Sivalva P. Brandão Filho

Carlos H. N. Costa

Claude Pirmez

Jeffrey J. Shaw

Promoters

- GENETICS, EVOLUTION AND TAXONOMY

[94]

P 345 - CHARACTERIZATION OF PHLEBOTOMINE INFECTION WITH THE LEISHMANIA BRAZILIENSIS COMPLEX USING MULTIPLEX PCR IN A BRAZILIAN HIGH ENDEMIC AREA. ASSIS BRASIL, STATE OF ACRE, WESTERN AMAZON, BRAZIL. TELES, C.B.G.¹; DOS SANTOS, A.P.A.²; CUNHA, P.N.A.²; DE ARAÚJO, E.A.C.¹; FREITAS, R.A.³; OGAWA, G.M.⁴; MEDEIROS, J.F.⁵; PESSOA, F.A.C.⁶; CÁCERES, O.C.¹; CAMARGO, L.M.A.⁴

1.DEPARTAMENTO DE MEDICINA, FACULDADE SÃO LUCAS, PORTO VELHO, RO, BRAZIL; 2.FACULDADE SÃO LUCAS, PORTO VELHO, RO, BRAZIL; 3.LABORATÓRIO DE LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS, INPA, MANAUS, AM, BRAZIL; 4.DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, MONTE NEGRO, RO, BRAZIL; 5.COORDENAÇÃO SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE, INPA, MANAUS, AM, BRAZIL; 6.GRUPPO DE PESQUISA EM ECOLOGIA DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS NA AMAZÔNIA, INSTITUTO LEONIDAS E MARIA DEAN, MANAUS, AM, BRAZIL.

Keyword:leishmania; sand flies; pcr-multiplex

Abstract:

Cutaneous Leishmaniasis (CL) is an infectious disease caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*. It is transmitted to humans by the bite of hematophagous insects of the subfamily *Phlebotominae* fed on hosts previously infected with the parasite. It's among one of the parasitic diseases of highest incidence in the world, with annual records reaching up to 2 million cases. In Brazil, CL occurs in all states, with an increasing incidence rate in the north region, mainly in the city of Assis Brasil (state of Acre) with an average incidence rate of 1,098 cases of CL per 100,000 inhabitants between the years 2001 to 2010 (10-times Brazilian incidence rate). This study aimed to detect the local etiological agent and the vector (s) involved in the epidemiological cycle of CL in this municipality. Sand flies were captured with the use of CDC-light traps, every 2 months, for a 10-day capture period, between 2009 and 2010. The females were identified and were grouped in 282 pools (2 to 20 specimens/vial). Afterwards, DNA extraction was performed and the PCR technique was applied in the investigation of the presence of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parasites in pools of phlebotomine sandflies. Of the 282 pools, 44 pools were positive: 25 pools with *Lutzomyia davisi* and 19 with *L. auransis*. To determine the possible complex involved, the samples of DNA extracted from pools of the 44 naturally infected sand flies were analyzed by Multiplex-PCR assay was targeted to the spliced leader RNA (mini-exon) gene repeats of these organisms and can detect all three complexes simultaneously generating differently sized products for each complex of New World *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, and *Leishmania donovani*). All the 44 tested pools were positive for the LB-3C, complex which corresponds to the *Leishmania braziliensis* complex. Further studies are being carried out in order to try to identify other etiological agents, vectors and natural reservoirs.

APÊNDICE D – TELES, C. B. G.; DOS SANTOS, A. P. A; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; OGAWA, G. M.; MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; CAMARGO, L. M. A..
 Infecção Natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* em Flebotomíneos de Assis Brasil, Acre, Tríplice Fronteira do Brasil, Peru e Bolívia. In: 50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. (**Resumo**). 2014, Rio Branco, Acre, Brasil. p. 253.

MEDTROP ACRE 2014
O DESAFIO DOS TRÓPICOS PARA A SAÚDE DO MUNDO 26 a 29

Realização

SBMT
SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

Secretaria de Estado de Turismo e Lazer   Secretaria de Estado de Saúde   Estado do Acre

Patrocínio

Janssen   FARMACIAUTOMATIZADA

CERTIFICADO

Certificamos que
CAROLINA BIONI GARCIA TELES
 participou do 50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado de 26 a 29 de agosto de 2014, no Centro de Convenções - Rio Branco, Acre, com carga horária total de 27 horas
 na qualidade de Autora do trabalho "Infecção Natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* E *L. (V.) guyanensis* em Flebotomíneos de Assis Brasil, Acre, Tríplice Fronteira do Brasil, Peru e Bolívia", apresentado como Pôster.

Rio Branco, 29 de agosto de 2014

Thor Dantas
 Presidente do Congresso

Mitermayer Galvão dos Reis
 Presidente da SBMT

Anais

50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

ÁREA TEMÁTICA: F) DOENÇAS POR PROTOZOÁRIOS

P-253

TÍTULO: INFECÇÃO NATURAL POR LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS E L. (V.) GUYANENSIS EM FLEBOTOMÍNEOS DE ASSIS BRASIL, ACRE, TRÍPLICE FRONTEIRA DO BRASIL, PERU E BOLÍVIA

AUTOR(ES): CAROLINA BIONI GARCIA TELES, ANA PAULA DE AZEVEDO DOS SANTOS, RUI ALVES FREITAS, ARLEY FARIA JOSÉ DE OLIVEIRA, GUILHERME MAERSCHNER OGAWA, JANSEN FERNANDES MEDEIROS, FELIPE ARLEY COSTA PESSOA, LUIS MARCELO ARANHA CAMARGO

INSTITUIÇÃO: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA

Introdução: O município de Assis Brasil, Acre, localizado a 319 km a leste de Rio Branco, encontra-se na tríplice fronteira Brasil/Peru/Bolívia. Esse município constitui uma área antiga de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no estado do Acre apresentando uma prevalência de 801 casos/100.000 habitantes no período de 2008 a 2012. O presente trabalho teve como objetivo identificar as espécies de vetores que ocorrem nessa região, estimar a taxa de infecção e identificar as espécies de leishmânias envolvidas no ciclo epidemiológico da LTA nesse município. **Material e métodos:** Os flebotomíneos foram capturados com o uso de armadilhas luminosas do tipo CDC entre agosto de 2009 a junho de 2010, em fragmentos de matas no ambiente rural e na mata ciliar da margem do Rio Acre. As fêmeas foram identificadas e agrupadas em 368 pools para a análise da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a extração do DNA foram utilizados três alvos moleculares para investigar a presença de *Leishmania*: PCR mkDNA (alvo - minicírculo de kDNA) para identificação do gênero *Leishmania*; Multiplex-PCR capaz de detectar os três complexos de *Leishmania* do Novo Mundo (*Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (L.) donovani*) e PCR-RFLP hsp70 (alvo gene hsp70) para identificar as espécies de *Leishmania* sp.. **Resultados:** Foram capturados 6.850 exemplares de 66 espécies de flebotomíneos, sendo três do gênero *Brumptomyia* e 63 do gênero *Lutzomyia* com 11 espécies incriminadas como vetores de LTA: *L. davis*, *L. antunesi*, *L. umbratilis*, *L. flaviscutellata*, *L. reducta*, *L. whitmani*, *L. ayrozai*, *L. hirsuta*, *L. paraensis*, *L. ubiquitalis* e *L. migonei*. As espécies mais abundantes foram *L. auraisensis*, *L. davis*, *L. choti* e *L. shawi* que representaram 71,8% do total. Do total de 368 pools de fêmeas de flebotomíneos analisados por PCR 32 foram positivos para a presença de DNA de *Leishmania* sp. (16 pools correspondem *L. davis* e 16 a *L. auraisensis*), sendo a taxa mínima de infecção de 1,85% (95% CI = 1,08% - 2,99%) para *L. davis* e de 2,05% (95% CI = 1,13% - 3,36%) para *L. auraisensis*. As espécies de *Leishmanias* detectadas foram: *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* e as outras amostras positivas foram identificadas somente ao nível de Complexo de *L. (V.) braziliensis*. **Conclusão:** Os dados de infecção e a presença de diversos vetores sugerem a circulação do parasito e risco de infecção na área estudada e incriminam pela primeira vez *L. auraisensis* como vetor no Brasil.

ANEXOS

ANEXO A – Polígonos de caracterização da Reserva Extrativista de Chico Mendes (RESEX) e áreas vizinhas como Terras Indígenas e propriedades particulares distribuídas no Alto e Baixo Acre.

Impactos de incêndios no ano de 2005 estão ilustrados ao leste do Acre (ACRE, 2008).

ANEXO B – Ocupações rurais em Assis Brasil, Acre.

Localidades próximas ao: A) Seringal São Francisco. B) Seringal Paraguaçu. C) Seringal Santa Quitéria. (Foto: Carolina Teles, 2010).

ANEXO C – Distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos encontradas nesse estudo.

(continua)

Região do Brasil	Espécies de Flebotomíneos
Norte	<i>B. avellari</i> , <i>B. pentacantha</i> , <i>Lu. abonnenci</i> , <i>Lu. abunaensis</i> ^(a) , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. andersoni</i> ^(a) , <i>Lu. antunesi</i> ^(b) , <i>Lu. aragaoi</i> , <i>Lu. auraensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i> ^(b) , <i>Lu. bacula</i> , <i>Lu. bispinosa</i> ^(a) , <i>Lu. brasiliensis</i> ^(a) , <i>Lu. calcarata</i> , <i>Lu. campbelli</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. choti</i> , <i>Lu. christenseni</i> ^(a) , <i>Lu. complexa</i> ^(a) , <i>Lu. davisii</i> ^(b) , <i>Lu. dendrophyla</i> , <i>Lu. dreisbachi</i> ^(a) , <i>Lu. evangelistai</i> ^(a) , <i>Lu. flabellata</i> ^(b) , <i>Lu. flaviscutellata</i> , <i>Lu. furcata</i> , <i>Lu. geniculata</i> , <i>Lu. georgii</i> ^(a) , <i>Lu. hirsutus hirsutus</i> ^(b) , <i>Lu. lainsoni</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. longipennis</i> , <i>Lu. lutziana</i> , <i>Lu. melloi</i> ^(a) , <i>Lu. micropyga</i> , <i>Lu. migonei</i> ^(b) , <i>Lu. monstrosa</i> , <i>Lu. naiffi</i> , <i>Lu. nevesi</i> , <i>Lu. paraensis</i> ^(b) , <i>Lu. peresi</i> , <i>Lu. preclara</i> , <i>Lu. punctigeniculata</i> , <i>Lu. reducta</i> ^(a,b) , <i>Lu. richardwardi</i> , <i>Lu. sallesi</i> , <i>Lu. saulensis</i> , <i>Lu. serrana</i> , <i>Lu. servulolimai</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. shawi</i> , <i>Lu. sherlocki</i> , <i>Lu. sordellii</i> , <i>Lu. tarapacaensis</i> ^(a) , <i>Lu. termitophila</i> ^(a) , <i>Lu. triacantha</i> , <i>Lu. ubiquitalis</i> ^(b) , <i>Lu. umbratilis</i> ^(b) , <i>Lu. villelai</i> , <i>Lu. walkeri</i> , <i>Lu. whitmani</i> ^(b) , <i>Lu. williamsi</i> ^(a) , <i>Lu. wilsoni</i> ^(a) , <i>Lu. yucumensis</i> ^(a) e <i>Lu. yuilli yuilli</i> .
Nordeste	<i>B. avellari</i> , <i>Lu. abonnenci</i> , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. antunesi</i> ^(b) , <i>Lu. aragaoi</i> , <i>Lu. ayrozai</i> ^(b) , <i>Lu. bacula</i> , <i>Lu. bispinosa</i> ^(a) , <i>Lu. brasiliensis</i> ^(a) , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. choti</i> , <i>Lu. christenseni</i> ^(a) , <i>Lu. complexa</i> ^(a) , <i>Lu. davisii</i> ^(b) , <i>Lu. dendrophyla</i> , <i>Lu. flaviscutellata</i> ^(b) , <i>Lu. furcata</i> , <i>Lu. geniculata</i> , <i>Lu. hirsutus hirsutus</i> ^(b) , <i>Lu. longipennis</i> , <i>Lu. lutziana</i> , <i>Lu. micropyga</i> , <i>Lu. migonei</i> ^(b) , <i>Lu. monstrosa</i> , <i>Lu. nevesi</i> , <i>Lu. paraensis</i> ^(b) , <i>Lu. peresi</i> , <i>Lu. punctigeniculata</i> , <i>Lu. richardwardi</i> , <i>Lu. sallesi</i> , <i>Lu. saulensis</i> , <i>Lu. serrana</i> , <i>Lu. servulolimai</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. sordellii</i> , <i>Lu. termitophila</i> ^(a) , <i>Lu. triacantha</i> , <i>Lu. ubiquitalis</i> ^(b) , <i>Lu. umbratilis</i> ^(b) , <i>Lu. villelai</i> , <i>Lu. walkeri</i> , <i>Lu. whitmani</i> ^(b) , <i>Lu. wilsoni</i> ^(a) , e <i>Lu. yuilli yuilli</i> .
Centro-Oeste	<i>B. avellari</i> , <i>B. pentacantha</i> , <i>Lu. abonnenci</i> , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. andersoni</i> ^(a) , <i>Lu. antunesi</i> ^(b) , <i>Lu. aragaoi</i> , <i>Lu. auraensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i> ^(b) , <i>Lu. bacula</i> , <i>Lu. bispinosa</i> ^(a) , <i>Lu. brasiliensis</i> ^(a) , <i>Lu. campbelli</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. christenseni</i> ^(a) , <i>Lu. complexa</i> ^(a) , <i>Lu. davisii</i> ^(b) , <i>Lu. dendrophyla</i> , <i>Lu. dreisbachi</i> ^(a) , <i>Lu. evangelistai</i> ^(a) , <i>Lu. flabellata</i> , <i>Lu. flaviscutellata</i> ^(b) , <i>Lu. furcata</i> , <i>Lu. geniculata</i> , <i>Lu. hirsutus hirsutus</i> ^(b) , <i>Lu. lainsoni</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. longipennis</i> , <i>Lu. lutziana</i> , <i>Lu. micropyga</i> , <i>Lu. migonei</i> ^(b) , <i>Lu. monstrosa</i> , <i>Lu. nevesi</i> , <i>Lu. paraensis</i> ^(b) , <i>Lu. peresi</i> , <i>Lu. punctigeniculata</i> , <i>Lu. richardwardi</i> , <i>Lu. sallesi</i> , <i>Lu. saulensis</i> , <i>Lu. serrana</i> , <i>Lu. servulolimai</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. shawi</i> , <i>Lu. sherlocki</i> , <i>Lu. sordellii</i> , <i>Lu. termitophila</i> ^(a) , <i>Lu. triacantha</i> , <i>Lu. ubiquitalis</i> ^(b) , <i>Lu. umbratilis</i> ^(b) , <i>Lu. villelai</i> , <i>Lu. walkeri</i> , <i>Lu. wilsoni</i> ^(a) , <i>Lu. whitmani</i> ^(b) e <i>Lu. yuilli yuilli</i> .

ANEXO C – Distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos encontradas nesse estudo.

(conclusão)

Sudeste	<i>B. avellari</i> , <i>Lu. abonnenci</i> , <i>Lu. aragaoi</i> , <i>Lu. ayrozai</i> ^(b) , <i>Lu. brasiliensis</i> ^(a) , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. choti</i> , <i>Lu. christenseni</i> ^(a) , <i>Lu. davisii</i> ^(b) , <i>Lu. flaviscutellata</i> ^(b) , <i>Lu. geniculata</i> , <i>Lu. hirsutus hirsutus</i> ^(b) , <i>Lu. longipennis</i> , <i>Lu. lutziana</i> , <i>Lu. migonei</i> ^(b) , <i>Lu. peresi</i> , <i>Lu. punctigeniculata</i> , <i>Lu. sallesi</i> , <i>Lu. serrana</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. sordellii</i> , <i>Lu. termitophila</i> ^(a) , <i>Lu. walkeri</i> , <i>Lu. whitmani</i> ^(b) e <i>Lu. yuilli yuilli</i> .
Sul	<i>B. avellari</i> , <i>Lu. abonnenci</i> , <i>Lu. aragaoi</i> , <i>Lu. ayrozai</i> ^(b) , <i>Lu. bacula</i> , <i>Lu. migonei</i> ^(b) , <i>Lu. sallesi</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. sordellii</i> e <i>Lu. whitmani</i> ^(b) .
Países Vizinhos	
Perú	<i>B. avellari</i> , <i>B. pentacantha</i> , <i>Lu. abonnenci</i> , <i>Lu. abunaensis</i> ^(a) , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. antunesi</i> ^(b) , <i>Lu. aragaoi</i> , <i>Lu. auraensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i> ^(b) , <i>Lu. brasiliensis</i> ^(a) , <i>Lu. calcarata</i> , <i>Lu. campbelli</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. choti</i> , <i>Lu. davisii</i> ^(b) , <i>Lu. dendrophyla</i> , <i>Lu. dreisbachi</i> ^(a) , <i>Lu. evangelistai</i> ^(a) , <i>Lu. flaviscutellata</i> ^(b) , <i>Lu. furcata</i> , <i>Lu. geniculata</i> , <i>Lu. hirsutus hirsutus</i> ^(b) , <i>Lu. lainsoni</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. longipennis</i> , <i>Lu. lutziana</i> , <i>Lu. micropyga</i> , <i>Lu. migonei</i> ^(b) , <i>Lu. nevesi</i> , <i>Lu. paraensis</i> ^(b) , <i>Lu. preclara</i> , <i>Lu. punctigeniculata</i> , <i>Lu. reducta</i> ^(a,b) , <i>Lu. richardwardi</i> , <i>Lu. sallesi</i> , <i>Lu. saulensis</i> , <i>Lu. serrana</i> , <i>Lu. servulolimai</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. shawi</i> , <i>Lu. sherlocki</i> , <i>Lu. sordellii</i> , <i>Lu. triacantha</i> , <i>Lu. ubiquitalis</i> ^(b) , <i>Lu. umbratilis</i> ^(b) , <i>Lu. walkeri</i> , <i>Lu. whitmani</i> ^(b) , <i>Lu. williamsi</i> ^(a) , <i>Lu. yucumensis</i> ^(a) e <i>Lu. yuilli yuilli</i> .
Bolívia	<i>B. avellari</i> , <i>B. pentacantha</i> , <i>Lu. abonnenci</i> , <i>Lu. abunaensis</i> ^(a) , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. andersoni</i> ^(a) , <i>Lu. antunesi</i> ^(b) , <i>Lu. aragaoi</i> , <i>Lu. auraensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i> ^(b) , <i>Lu. bacula</i> , <i>Lu. calcarata</i> , <i>Lu. campbelli</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. complexa</i> ^(a) , <i>Lu. choti</i> , <i>Lu. davisii</i> ^(b) , <i>Lu. dendrophyla</i> , <i>Lu. dreisbachi</i> ^(a) , <i>Lu. evangelistai</i> ^(a) , <i>Lu. flabellata</i> ^(b) , <i>Lu. flaviscutellata</i> ^(b) , <i>Lu. furcata</i> , <i>Lu. hirsutus hirsutus</i> ^(b) , <i>Lu. lainsoni</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. lutziana</i> , <i>Lu. micropyga</i> , <i>Lu. migonei</i> ^(b) , <i>Lu. nevesi</i> , <i>Lu. paraensis</i> ^(b) , <i>Lu. peresi</i> , <i>Lu. preclara</i> , <i>Lu. punctigeniculata</i> , <i>Lu. richardwardi</i> , <i>Lu. sallesi</i> , <i>Lu. saulensis</i> , <i>Lu. serrana</i> , <i>Lu. servulolimai</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. shawi</i> , <i>Lu. sherlocki</i> , <i>Lu. sordellii</i> , <i>Lu. tarapacaensis</i> ^(a) , <i>Lu. termitophila</i> ^(a) , <i>Lu. ubiquitalis</i> ^(b) , <i>Lu. umbratilis</i> ^(b) , <i>Lu. walkeri</i> , <i>Lu. whitmani</i> ^(b) , <i>Lu. yucumensis</i> ^(a) e <i>Lu. yuilli yuilli</i> .

Nota: *B:* *Brumptomyia*; *L:* *Lutzomyia*; *(a)* Novo Registro para o Estado do Acre; *(b)* Vetores de LTA (BRASIL, 2010; RANGEL; LAINSON, 2009). Fonte: Galati (2014); Missawa e Maciel (2007); Young e Duncan (1994).

ANEXO D – Quadro de espécies de flebotomíneos e autores responsáveis pela sua descrição.

• Subgênero <i>Brumptomyia</i> França e Parrot, 1921 <i>Brumptomyia avellari</i> (Costa Lima, 1932) <i>B. pentacantha</i> (Barreto, 1947) <i>B. sp</i> • Subgênero <i>Evandromyia</i> Mangabeira, 1941 <i>Lutzomyia monstruosa</i> (Floch & Abonnenc, 1944) <i>Lu. georgii</i> Freitas & Barrett, 2002 <i>Lu. tarapacaensis</i> (Le Pont, Torrez-Espejo & Galati 1996) • Subgênero <i>Lutzomyia</i> França, 1924 <i>Lu. evangelistai</i> Martins & Fraiha, 1971 <i>Lu. flabellata</i> Martins & Silva, 1964 <i>Lu. sherlocki</i> Martins, Silva & Falcão, 1971 • Subgênero <i>Micropygomyia</i> Barretto, 1962 <i>Lu. micropyga</i> (Mangabeira, 1942) • Subgênero <i>Nyssomyia</i> Barretto, 1962 <i>Lu. antunesi</i> (Coutinho, 1939) <i>Lu. flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942) <i>Lu. reducta</i> Feliciangeli, Ramirez Pérez & Ramirez, 1988 <i>Lu. richardwardi</i> Ready & Fraiha, 1981 <i>Lu. shawi</i> Fraiha, Ward & Ready, 1973 <i>Lu. umbratilis</i> Ward & Fraiha, 1977 <i>Lu. whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939) <i>Lu. yuilli yuilli</i> Young & Porter, 1972 <i>Lu. christenseni</i> Young & Duncan, 1994 • Subgênero <i>Pintomyia</i> Costa Lima, 1932 <i>Lu. calcarata</i> Martins & Silva, 1964 • Subgênero <i>Pressatia</i> Mangabeira, 1942 <i>Lu. choti</i> (Floch & Abonnenc, 1941) <i>Lu. triacantha</i> (Mangabeira, 1942) • Subgênero <i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962 <i>Lu. abbonenci</i> (Floch & Chassignet, 1947) <i>Lu. campbelli</i> (Damasceno, Causey & Arouck, 1945) <i>Lu. dendrophyla</i> (Mangabeira, 1942) <i>Lu. lutziana</i> (Costa Lima, 1932) <i>Lu. punctigeniculata</i> (Floch & Abonnenc, 1944) <i>Lu. shannoni</i> (Dyar, 1929) • Subgênero <i>Sciopemyia</i> Barreto, 1962 <i>Lu. preclara</i> (Young & Arias, 1984) <i>Lu. servulolimai</i> (Damasceno & Causey, 1945) <i>Lu. sordellii</i> (Shannon & Del Ponte, 1927)	• Subgênero <i>Psychodopygus</i> Mangabeira, 1941 <i>Lu. amazonensis</i> (Root, 1934) <i>Lu. ayrozai</i> (Barreto & Coutinho, 1940) <i>Lu. carrerai carrerai</i> (Barreto, 1966) <i>Lu. davisii</i> (Root, 1934) <i>Lu. geniculata</i> (Mangabeira, 1941) <i>Lu. hirsutus hirsutus</i> (Mangabeira, 1942) <i>Lu. llanosmartinsi</i> (Fraiha & Ward, 1980) <i>Lu. lainsoni</i> (Fraiha & Ward, 1964) <i>Lu. paraensis</i> (Costa Lima, 1941) <i>Lu. yucumensis</i> (Le Pont, Caillard, Tibayrenc & Desjeux, 1986) <i>Lu. complexa</i> (Mangabeira, 1941) • Subgênero <i>Trichophoromyia</i> Barretto, 1962 <i>Lu. auraensis</i> (Mangabeira, 1942) <i>Lu. melloi</i> (Causey & Damasceno, 1945) <i>Lu. ubiquitalis</i> (Mangabeira, 1942) • Subgênero <i>Viannamyia</i> Mangabeira, 1941 <i>Lu. furcata</i> (Mangabeira, 1941) • Grupo Aragaoi (Theodor, 1965) <i>Lu. abunaensis</i> Martins, Falcão & Silva, 1965 <i>Lu. aragaoi</i> (Costa Lima, 1932) <i>Lu. brasiliensis</i> (Costa Lima, 1932) • Grupo Dreisbachi Lewis et al. 1977 <i>Lu. dreisbachi</i> (Causey & Damasceno, 1945) • Grupo Migonei Theodor, 1965 <i>Lu. andersoni</i> (Le Pont & Desjeux, 1988) <i>Lu. bacula</i> (Martins, Falcão & Silva, 1965) <i>Lu. migonei</i> (França, 1920) <i>Lu. sallesi</i> (Galvão & Coutinho, 1939) <i>Lu. termitophila</i> Martins, Falcão & Silva, 1964 <i>Lu. walkeri</i> (Newstead, 1914) <i>Lu. williamsi</i> (Damasceno, Causey & Arouck, 1945) • Grupo Oswaldoi (Theodor 1965) <i>Lu. longipennis</i> (Barretto, 1946) <i>Lu. peresi</i> (Mangabeira, 1942) <i>Lu. villelai</i> (Mangabeira, 1942) • Grupo Saulensis (Lewis et al., 1977) <i>Lu. saulensis</i> (Floch & Abonnenc, 1944) <i>Lu. wilsoni</i> (Damasceno & Causey, 1945) • Grupo Verrucarum Theodor, 1965 <i>Lu. nevesi</i> (Damasceno & Arouck, 1956) <i>Lu. serrana</i> (Damasceno & Arouck, 1949) <i>Lu. naiffi</i> Freitas & Oliveira, 2013

ANEXO E – Alinhamento múltiplo das sequências do gene *hsp70* (234pb) obtidas de flebotomíneos infectados por *Leishmania* com a sequência de referência do *GenBank*.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
GU368213.1 : GAGGCGAAGAACGGTCTGGAGAACTACCGTACTCGA-TGAAGAACACGATCGCCGACACGACGTCGCGCAAGTGGAGGAGAGCGACAGGACCGCGCTGAACTC : 107
342_Fleb_H : -----ACACGATCGCCGACACGACGACGTCGCGCCCTTTGGAGGAGAGCGACAGGACCGCGCTGAACTC : 64
352_Fleb_H : -----ACACGATCGCCGACACGACGACGTCGCGCTGCTGGAGGAGAGCGACAGGACCGCGCTGAACTC : 65
359_Fleb_H : -----AGGAGAGCGACAGGACCGCGCTGAACTC : 28
363_Fleb_H : -AGGCGAAGAACGGTCTGGAGAACTACCCCTTTTTCGA-TGAAGAACACGATCGCCGACACGACGTCGCGGGAAGTGGAGGAGAGCGACAGGACCGCGCTGAACTC : 106
369_Fleb_H : GGAGGCGAGAACGGTCTGGAGAACTAAAAAATGAAGAACACGATCGCCGACACGACGTCGCGCNTGCTGGAGGAGAGCGACAGGACCGCGCTGAACTC : 108
                                acacgatcgccgacacgaacgtgtcc      tggAGGAGAGCGACAGGACCGCGCTGAACTC

      *      120      *      140      *      160
GU368213.1 : GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCGAAGGA : 161
342_Fleb_H : GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCGAAGGA : 118
352_Fleb_H : GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCG----- : 111
359_Fleb_H : GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCGAAGGA : 82
363_Fleb_H : GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCGAAGGA : 160
369_Fleb_H : GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCGAAGGA : 162
                                GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGtcgaagga

```

GU368213.1 representa a sequência de *Le. (V.) guyanensis* obtida no *GenBank*. Amostras 342, 352, 359 Fleb_H representam *pools* de *Lu. davisi*; 363, 369 Fleb_H representam *pools* de *Lu. auraensis*. (-) *gaps*. Realce Preto: região de mesmo nucleotídeo em todas as amostras; Cinza escuro: região com quatro sequências com mesmo nucleotídeo; Cinza claro: região com diferentes nucleotídeos nas amostras analisadas.

ANEXO F – Alinhamento das sequências do gene *hsp70* (234pb) obtidas de biópsias humanas infectadas por *Leishmania* obtidos no estudo.

Le. (V.) braziliensis

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
GU368187.1 : CCAAGAACGGCCTGGAGAACTACCGCTACTCGATGAAGAACAACGGTCTCCGACACGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGTCCGCGCTGAACCTCGGCGA : 108
24Hu_hsp70 : --AAGAACGGCCTGGAGAACTCCCTTTTATGATGAAGAACAACGGTCTCCGACACGAACGTGTCCCGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGTCCGCGCTGAACCTCGGCGA : 106
28Hu_hsp70 : CCAAGAACGGCCTGGAGAACTACCGCTACTCGATGAAGAACAACGGTCTCCGACACGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGTCCGCGCTGAACCTCGGCGA : 108
cgAAGAACGGCCTGGAGAACTaCcCtTacTcGATGAAGAACAACGGTCTCCGACACGAACGTGTCCggCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGTCCGCGCTGAACCTCGGCGA

      *      120      *      140      *
GU368187.1 : TCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCAAGGAA : 158
24Hu_hsp70 : TCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCAAGGAA : 156
28Hu_hsp70 : TCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCAAGGAA : 158
TCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGGCGTCAAGGAA

```

Le. (V.) shawi

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
GU071177.1 : AAGAACA CGATC CCGACACGAACGTGTCCGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGGCCGCGCTGAACCTCGGCGATCGACCGGGCGCTGGAGTGGCTGAACACCAACCAG : 108
06Hu_hsp70 : AAGAACA CGATC CCGACACGAACGTGTCCGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGGCCGCGCTGAACCTCGGCGATCGACCGGGCGCTGGAGTGGCTGAACACCAACCAG : 108
19Hu_hsp70 : ----- CGATC CCGACACGAACGTGTCCGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGGCCGCGCTGAACCTCGGCGATCGACCGGGCGCTGGAGTGGCTGAACACCAACCAG : 101
aagaacaCGATCtCCGACACGAACGTGTCCGCAAGCTGGAGGAGAGCGACaAGGGCCGCGCTGAACCTCGGCGATCGACaCGGGCGCTGGAGTGGCTGAACaCAACCAG

      *      120
GU071177.1 : GAGGCGTCGAAGGAAG : 124
06Hu_hsp70 : GAGGCGTCGAAGGAAG : 124
19Hu_hsp70 : GAGGCGTCGAAGGA-- : 115
GAGGCGTCGAAGGAag

```

Le. (V.) guyanensis

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
GU368213.1 : GCAGCGCGAGCGCGTGGAGGCGAAGAACGGTCTGGAGAACTACGCGTACTCGATGAAGAACAACGATCGCCGACACGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAG : 108
32_HSP70F : GCAGCGCGAGCGCGTGGAGGCGAAGAACGGTCTGGAGAACTACGCGTACTCGATGAAGAACAACGATCGCCGACACGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAG : 108
GCAGCGCGAGCGCGTGGAGGCGAAGAACGGTCTGGAGAACTACGCGTACTCGATGAAGAACAACGATCGCCGACACGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAG

      *      120      *      140      *      160      *
GU368213.1 : GACCGGCTGTAACTCGGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCAAGGA : 177
32_HSP70F : GACCGGCTGTAACTCGGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCAAGGA : 177
GACCG GCTGAACTCGGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAG CGTCAAGGA

```

GU368187.1 representa a sequência de *Le. (V.) braziliensis* depositada no *GenBank*. GU071177.1 representa a sequência de *Le. (V.) shawi*. GU368213.1 representa a sequência de *Le. (V.) guyanensis*. Amostras 24Hu, 28Hu, 06Hu, 19Hu e 32 representam sequências obtidas da amplificação *hsp70* de biópsias humanas. (-) *gaps*. Realce Preto: região de mesmo nucleotídeo em todas as amostras; Cinza: região com duas sequências com mesmo nucleotídeo.

ANEXO G – Alinhamento das sequencias do gene *hsp70* (234pb) obtidas do paciente 32Hu infectados por *Le. (V.) guyanensis* e dos flebotomíneos infectados pela mesma espécie obtidos no estudo.

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
GU368213.1	:	GAGGCGAAGAACGGTCTGGAGAATAACGCGTACTCGA	-TGAAGAACACGATCGCCGACACGAACGTGTCC	GGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGACCGG	GGCTGAAC	TC	:	107				
32Hu_hsp70	:	GAGGCGAAGAACGGTCTGGAGAATAACGCGTACTCGA	-TGAAGAACACGATCGCCGACACGAACGTGTCC	GGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGACCGG	GGCTGAAC	TC	:	107				
363Fleb	:	-AGGCGAAGAACGGTCTGGAGAATAACCTTTTTCGA	-TGAAGAACACGATCGCCGACACGAACGTGTCC	GGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGACCGG	GGCTGAAC	TC	:	106				
359Fleb	:	-----	-----	-----	-----	AGGAGAGCGACAGGACCGG	GGCTGAAC	TC	:	28		
369Fleb	:	GGAGGCGAGAACGGTCTGGAGAATAAAAAAAAAAAT	-TGAAGAACACGATCGCCGACACGAACGTGTCC	GGCAAGCTGGAGGAGAGCGACAGGACCGG	GGCTGAAC	TC	:	108				
352Fleb	:	-----	-----	-----	-----	GGCCTGCTGGAGGAGAGCGACAGGACCGG	GGCTGAAC	TC	:	65		
342Fleb	:	-----	-----	-----	-----	CCCTTTTGGAGGAGAGCGACAGGACCGG	GGCTGAAC	TC	:	64		
						acacgatcgccgacacgaacgtgtcc				tggaaggagagcgacaggaacgctgaactc		
		*	120	*	140	*	160					
GU368213.1	:	GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCGAAGGA	:	161								
32Hu_hsp70	:	GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCGAAGGA	:	161								
363Fleb	:	GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCGAAGGA	:	160								
359Fleb	:	GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCGAAGGA	:	82								
369Fleb	:	GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCGAAGGA	:	162								
352Fleb	:	GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCG-----	:	111								
342Fleb	:	GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCGAAGGA	:	118								
		GGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACCAGGAGCGTCgaagga										

GU368213.1 representa a sequência de *Le. (V.) guyanensis* obtida no *GenBank*. Amostras 32Hu representa a sequência obtida da amplificação *hsp70* de biópsia humana. Amostras 342, 352, 359 Fleb_H representam *pools* de *Lu. davisi*; 363, 369 Fleb_H representam *pools* de *Lu. auraensis*. (-) *gaps*. Realce Preto: região de mesmo nucleotídeo em todas as amostras; Cinza escuro: região com seis sequências com mesmo nucleotídeo; Cinza claro: região com quatro a cinco sequências com mesmo nucleotídeo nas amostras analisadas.

ANEXO H – *Lutzomyia columbiana* (Ristorcelli & Van ty, 1941)

Fonte: WRBU (2014).