

Revista da Graduação

Vol. 6

No. 1

2013

1

Seção: Faculdade de Biociências

Título: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE), INFECTADOS POR LEISHMANIA SPP. NO MUNICÍPIO DE SÃO BORJA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Autor: CATIELE GOBETTI LINDHOLZ

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Biociências

Catieli Gobetti Lindholz

Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos
(Diptera: Psychodidae), infectados por *Leishmania* spp. no município de São Borja, Rio
Grande do Sul, Brasil.

Porto Alegre
2012

Catieli Gobetti Lindholz

Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos
(Diptera: Psychodidae), infectados por *Leishmania* spp. no município de São Borja, Rio
Grande do Sul, Brasil.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado
como requisito para a obtenção do grau de
Bacharel da Faculdade de Biociências da
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

Porto Alegre
2012

Catieli Gobetti Lindholz

Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos
(Diptera: Psychodidae), infectados por *Leishmania* spp. no município de São Borja, Rio
Grande do Sul, Brasil.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado
como requisito para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas na Faculdade
de Biociências da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 9 de Novembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Ana Cristina Aramburu

Dr. Rafael Lucyk Maurer

Porto Alegre
2012

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Antonio, pela compreensão, amor e dedicação que sempre mostrou por mim. Um homem honesto, trabalhador e guerreiro, que eu tenho maior orgulho em chamar de pai, e que serei eternamente grata por ter me propiciado a conclusão desta etapa da minha vida!

À minha mãe Roselei, por ser essa pessoa firme e forte que me apóia e acredita na minha capacidade. Obrigada pelas vezes que tu disseste – não! quando eu quis voltar para casa... Agradeço-te por ser minha maior e melhor amiga, e por ter me mostrado que sou capaz de chegar onde desejo!

Ao meu irmão Alan, pelo companheirismo, carinho e amizade dedicados a mim durante toda a nossa vida. Obrigada por existir, e me ensinar que a maneira mais justa e linda de se multiplicar as coisas, é justamente compartilhando!

À minha avó Marlei, pelo carinho, atenção e apoio a mim dedicados desde sempre... Obrigada por ser minha segunda mãe, e estar sempre ao meu lado! Contigo aprendi que os nossos problemas nunca serão maiores do que a força que teremos para resolvê-los...

Ao meu avô Juraci (*in memoriam*), que em muitos momentos foi a base forte na nossa família. Obrigada por ter sido meu “avozão em dose dupla”, pelo aprendizado e pela confiança depositada em mim.

À minha avó Ana Maria, minha pequena! Agradeço-te pelo carinho e cuidado que tens comigo, por ser a “mãe de todos”, e também pelos saborosos cafés da tarde!

À minha tia e dinda Márcia, pelo carinho, atenção e afeto, e também pelos doces maravilhosos que me aguardam em Vacaria!

Aos meus amigos (de longe e de perto) pelo carinho e verdadeira amizade que nos une, pelas conversas e desabafos, e também pelas “desopiladas” nos finais de semana, em especial a Sarjah Chedid e José Melo. Sem vocês esta trajetória não teria o mesmo sabor!

Aos amigos adquiridos durante a graduação, pelas experiências e vivências compartilhadas diariamente.

A equipe do Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS, pelo convívio diário e aprendizado, em especial a prof. Ana Cristina Aramburu, pela oportunidade, atenção e colaboração na finalização desta etapa.

Aos mestres da PUCRS, pelo conhecimento e experiência a nós transmitidos, além dos agradáveis momentos vivenciados em aulas práticas e saídas de campo.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma maneira participaram deste processo, e contribuíram para que este momento estivesse acontecendo hoje... Obrigada a todos vocês!

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.”

Albert Einstein

RESUMO

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários unicelulares do gênero *Leishmania* spp. que podem ser observados nas formas promastigota e paramastigota (flageladas) no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e forma amastigota (com ausência de flagelo livre), obrigatoriamente parasitando as células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados.

Os hospedeiros invertebrados parecem estar restritos a flebotomíneos hematófagos pertencentes a família Psychodidae, e apresentam alto grau de complexidade em termos de ecologia e epidemiologia, enquanto que os hospedeiros vertebrados incluem grande diversidade de mamíferos, tanto silvestres quanto domésticos.

A infecção dos hospedeiros vertebrados (como edentados, marsupiais, carnívoros, ungulados e primatas, inclusive o homem) ocorre através da picada de flebotomíneos hematófagos, quando formas promastigotas infectantes são inoculadas no momento do repasto sanguíneo.

O presente projeto se propõe a identificar e caracterizar os flebotomíneos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. no município de São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil.

Serão utilizados métodos de captura como armadilhas luminosas de CDC, e armadilha de Shannon. Após identificação, os flebotomíneos serão dissecados e parte do aparelho digestivo será usada na identificação de protozoários do gênero *Leishmania* spp., através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Palavras-chave: Flebotomíneos. Infecção. *Leishmania* spp. Leishmanioses. São Borja.

ABSTRACT

The Leishmaniasis is a complex of diseases caused by unicellular protozoan of the genus *Leishmania* spp. which can be observed in promastigote forms and paramastigota (flagellated) in the digestive tract of invertebrate hosts, and amastigote (with no flagellum free) compulsorily parasitizing cells of the mononuclear phagocytic system vertebrate hosts.

The invertebrates hosts seem to be restricted to hematophagous sandflies belonging to the family Psychodidae, and have a high degree of complexity in terms of ecology and epidemiology, while vertebrate hosts include great diversity of mammals, both wild and domestic.

The infection of vertebrate hosts (as edentulous, marsupials, carnivores ungulates and primates, including man) occurs through the bite of hematophagous sandflies when infective promastigotes are inoculated at the time of blood meal.

This study aims to identify and characterize the sandflies naturally infected by *Leishmania* spp. in São Borja city, Rio Grande do Sul, Brazil.

Capture methods will be used as traps CDC light and Shannon. After identification, the sandflies will be dissected and part of the digestive system will be used in the identification of protozoa of the genus *Leishmania* spp. through the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR).

Key words: Sandflies. Infection. *Leishmania* spp. Leishmaniasis. São Borja.

SUMÁRIO

1 Introdução	10
1.1 Leishmaniose Visceral.....	11
1.1.1 Histórico da Leishmaniose Visceral.....	12
1.1.2 Agente etiológico da Leishmaniose Visceral.....	13
1.1.3 Transmissão da Leishmaniose Visceral.....	14
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	16
1.2.1 Histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	17
1.2.2 Agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	18
1.2.3 Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	18
1.3 Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae).....	20
1.3.1 Classificação da subfamília Phlebotominae.....	21
1.3.2 Phlebotominae: Reprodução.....	22
1.3.3 Phlebotominae: Morfologia.....	23
1.3.4 Phlebotominae: Alimentação.....	28
1.4 Local de estudo.....	28
1.5 Justificativa.....	30
2 Objetivos	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 Metodologia	33
3.1 Coletas e identificação de flebotomíneos.....	33
3.1.2 Diagnóstico molecular da infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.....	34
3.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase.....	35
3.1.4 Análises estatísticas.....	35
4 Resultados esperados	36
5 Referências Bibliográficas	37
Anexo 1: Ficha de identificação das coletas de flebotomíneos	43

1. INTRODUÇÃO:

As alterações ambientais, climáticas ou decorrentes de ações antrópicas, aliadas ao crescimento populacional e mudanças no padrão demográfico das cidades, nível sócio-econômico, hábitos religiosos, disponibilidade e qualidade dos serviços de saúde e educação, deficiência de hábitos higiênicos, bem como a presença de hospedeiros apropriados são fatores favoráveis ao surgimento de doenças potencialmente prejudiciais a saúde humana (1).

Estes pressupostos, isolados ou em associação, resultam na aproximação dos hospedeiros intermediários e definitivos, vetores e parasitos, e determinam alterações significativas nos níveis endêmico ou epidêmico de doenças infecciosas, sejam elas causadas por arboviroses ou protozoonoses (2).

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários unicelulares do gênero *Leishmania* spp., parasitos heteroxenos pertencentes a ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. São observados nas formas promastigota e paramastigota (flageladas) (Figura 2) no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e forma amastigota (com ausência de flagelo livre) (Figura 3), obrigatoriamente parasitando as células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (1).

Os hospedeiros invertebrados parecem estar restritos a flebotomíneos hematófagos pertencentes à família Psychodidae, e apresentam alto grau de complexidade em termos de ecologia e epidemiologia (3,4), enquanto que os hospedeiros vertebrados incluem grande diversidade de mamíferos, tanto silvestres quanto domésticos. Embora as infecções sejam mais numerosas em roedores e canídeos, outros hospedeiros também são relatados, tais como edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas, inclusive o homem. A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de flebotomíneos hematófagos, quando formas promastigotas infectantes são inoculadas no momento do repasto sanguíneo (1).

Atualmente, as Leishmanioses encontram-se amplamente distribuídas nas Américas, África, Índia, Ásia e Mediterrâneo (5), e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estas patologias são endêmicas em cerca 88 países, e estima-se que 500 mil novos casos de Leishmaniose Visceral e 1,5 milhões de Leishmaniose Tegumentar Americana ocorram por ano, sendo uma das doenças infecto-parasitárias de maior incidência mundial. No Brasil esta tem sido diagnosticada em todos os estados,

evidenciando a rápida expansão e adaptação do protozoário e seus vetores em ambientes antropicamente modificados (6), figurando o país entre os cinco mais afetados (7).

Nas Américas, a transmissão do ciclo de *Leishmania* spp. envolve cerca de 500 espécies de flebotomíneos, e segundo Young & Duncan (1994), o Brasil se destaca pela ampla ocorrência em números de espécies destes insetos, possuindo cerca de 230 espécies em seu território (8).

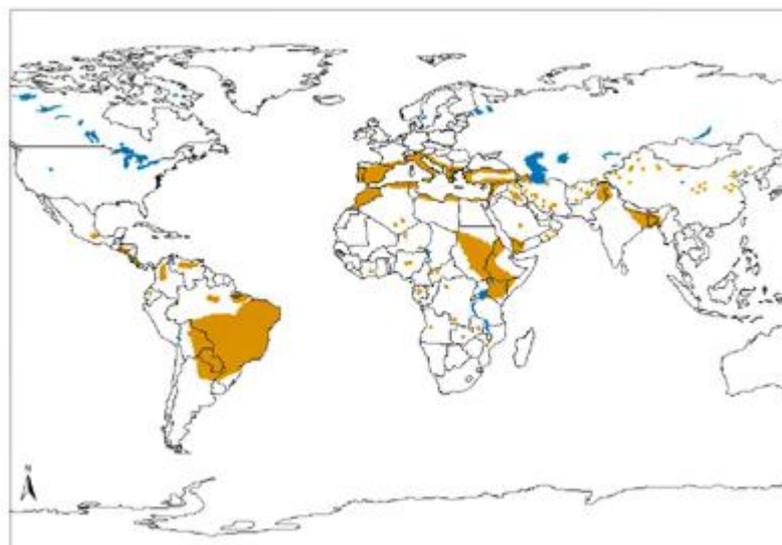
No Brasil, diversas pesquisas têm abordado a distribuição geográfica, sazonalidade, ecologia e epidemiologia dos flebotomíneos (6), uma vez que o conhecimento da biologia desses insetos colabora no entendimento das relações interespecíficas e com o habitat, e na transmissão das Leishmanioses em determinada área, porém em algumas regiões do sul do país, pouco se elucidou sobre a fauna destes vetores (9).

O Estado do Rio Grande do Sul, até o ano de 2008, era considerado área indene para Leishmaniose Visceral humana e canina. No final do mesmo ano, a Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (SES/RS) notificou ao Ministério da Saúde (MS) o primeiro caso com suspeita de Leishmaniose Visceral Canina no município de São Borja, e mais tarde, no início de 2009, ocorreu a confirmação do primeiro caso autóctone de Leishmaniose Visceral humana, na mesma localidade. A partir desse momento, municípios limítrofes passaram a registrar a presença de vetores e cães infectados, evidenciando a rápida expansão e adaptação geográfica dos flebotomíneos (10,11). Dessa forma se faz necessário o conhecimento e melhor entendimento da biologia e ecologia dos vetores, associados à competência vetorial e variação sazonal. Esses fatores são importantes no sentido de prevenir a doença nas áreas de endemismo (3).

1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL

Entre as formas clínicas das Leishmanioses, a Leishmaniose Visceral, popularmente conhecida como calazar, é vista como a de maior gravidade, pois quando não tratada adequadamente determina altos níveis de letalidade. Esta patologia encontra-se amplamente distribuída no mundo, em especial nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África e Américas (12) (Figura 1).

Figura 1: Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral



■ Regiões com casos de Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Mucocutânea
 ■ Regiões com casos de Leishmaniose Mucocutânea

Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html

Anualmente são registrados cerca de 500 mil novos casos da doença, dos quais 90% estão concentrados na Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão e Brasil, o último representando 90% dos casos das Américas (13).

1.1.1. HISTÓRICO

Cunningham, em 1885 na Índia, foi o primeiro a observar os parasitos que causavam o “calazar”. Posteriormente, em 1903, William Leishman e Charles Donovan, quase que simultaneamente, descreveram o agente etiológico da doença. Leishman observou pequenos corpúsculos ovalados, com 2-3 μm de diâmetro em cortes de baço de um soldado inglês que havia ido a óbito em consequência da “febre Dum-Dum”, contraída em Calcutá, Índia. Concomitantemente, Donovan relatou os parasitos em aspirados esplênicos de uma criança hindu, que havia sido acometida por uma febre irregular. Laveran & Mesnil, em 1903, consideraram que o parasito associado ao “calazar indiano” era um piroplasma, e nomearam-no *Piroplasma donovani*, nome este corrigido por Ross, no mesmo ano, classificando o agente etiológico do “calazar” como *Leishmania donovani*. Pouco tempo depois, em 1904, Leonard Rogers foi o primeiro a obter sucesso no cultivo do protozoário, e demonstrou que estes se apresentavam em formas flageladas. Nicolle & Comte, em 1908, na Tunísia, observaram pela primeira vez o parasito em cães, sugerindo seu provável papel como reservatórios da doença.

Entretanto, permaneceu desconhecido o mecanismo de infecção do “calazar” até 1931, quando os flebotomíneos foram incriminados como vetores, quando a transmissão da patologia ficou conhecida através de xenodiagnósticos em hamsters (1).

Na América do Sul, Migone, em 1913, relatou o primeiro caso da doença no Paraguai, em um paciente que havia contraído o parasito no Estado do Mato Grosso, Brasil (14).

Pode-se dizer que o despertar da comunidade científica para a questão da Leishmaniose Visceral no Brasil ocorreu a partir da década de 30, quando Henrique Penna confirmou a presença de *Leishmania* spp. em lâminas de viscerotomias de pacientes mortos com suspeita de febre amarela (15).

Nos anos seguintes, entre 1936 e 1939, muitos estudos foram realizados por Evandro Chagas e colaboradores, demonstrando a doença em humanos e em cães, com a incriminação do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como provável vetor, e o parasito classificado como *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) (1).

1.1.2. AGENTE ETIOLÓGICO

Os parasitos causadores da Leishmaniose Visceral estão atualmente agrupados no complexo *donovani*, onde três espécies são atualmente reconhecidas como agentes etiológicos da doença: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (1). As espécies *L. infantum* e *L. donovani* são agentes causadores da patologia em áreas do Oriente Médio e mar Mediterrâneo (16), enquanto que *L. chagasi* é responsabilizada pela doença nas Américas Central e do Sul (17).

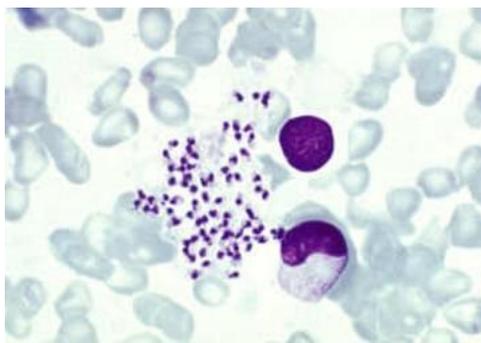
A principal característica que agrupa os tripanosomatídeos é uma estrutura de DNA mitocondrial única e bastante conservada, o cinetoplasto, que contém o kDNA. Esse kDNA está organizado em um a espécie de rede, circular, com um formato de anéis entrelaçados. O kDNA sendo alvo frequente nos estudos de investigação de infecções causadas por estes parasitos, uma vez que o uso de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem aumentado a sensibilidade e especificidade na identificação dos parasitos (19).

Figura 2: Forma promastigota de *Leishmania* spp.



Fonte: <http://www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>

Figura 3: Forma amastigota de *Leishmania* spp.



Fonte: <http://www.icb.usp.br/ivropar/img/capitulo5/8.html>

A *L. chagasi* apresenta características morfológicas muito semelhantes às demais espécies existentes. Sua forma amastigota encontra-se presente nas células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, dentre os quais podem ser citados marsupiais, procionídeos, edentados, ungulados e primatas (9), enquanto que a forma promastigota é encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados (1). Esta forma é alongada, com um longo flagelo livre, núcleo celular centralizado, e o cinetoplasto encontra-se na extremidade do flagelo.

1.1.3. TRANSMISSÃO

A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre quando formas promastigotas infectantes são inoculadas pelas fêmeas dos flebotomíneos, no momento do repasto sanguíneo e se deslocam para os órgãos linfóides, em especial o fígado, baço, medula

óssea e linfonodos, causando infecção das células do sistema fagocítico mononuclear, como monócitos, histiócitos, e macrófagos, onde sofrem transformação para formas amastigotas, que se reproduzem por fissão binária até romperem a célula hospedeira, expandindo-se pelas vias sanguínea e/ou linfática, dando início a reação inflamatória, atraindo assim outros macrófagos (1).

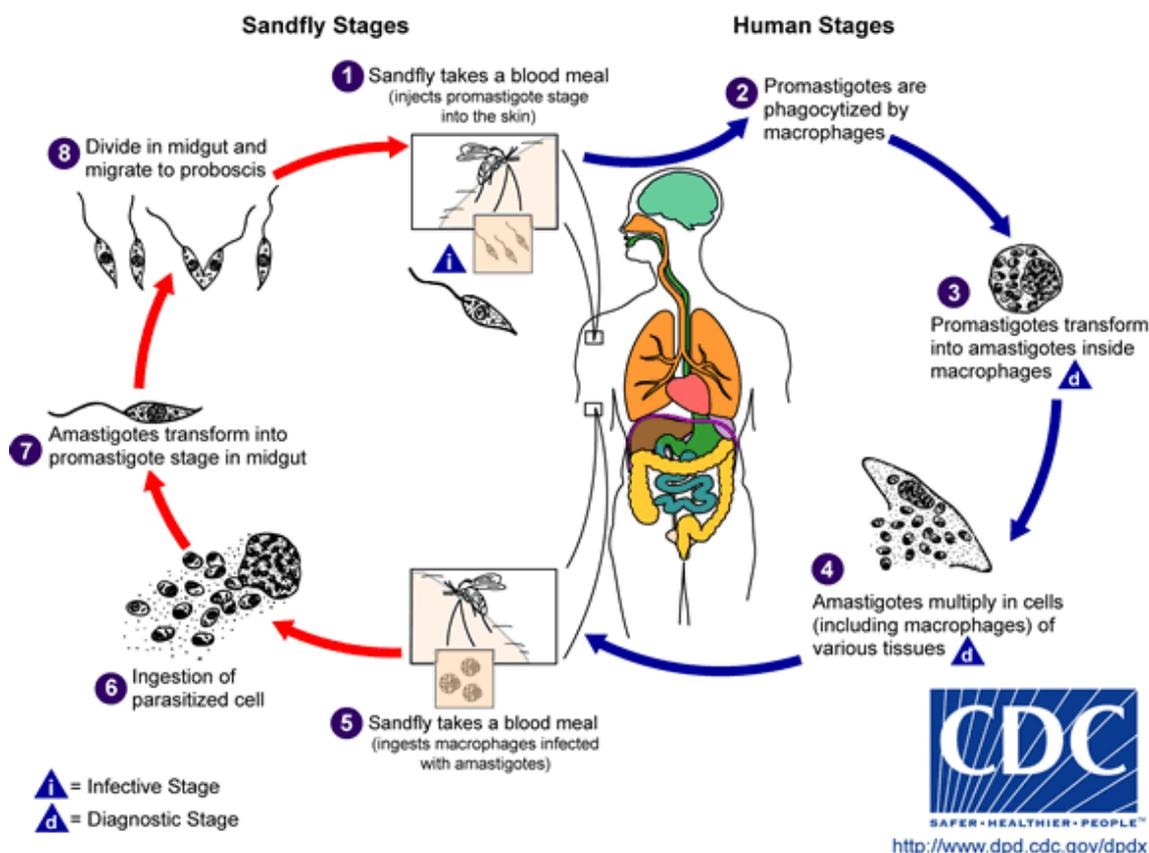
A infecção dos flebotomíneos ocorre quando, no momento do repasto sanguíneo, são ingeridas formas amastigotas do protozoário, que acompanham o sangue e/ou linfa intersticial do indivíduo ou animal infectado. As formas intracelulares são liberadas no trato digestivo do flebotomíneo, e se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, reproduzindo-se por divisão binária, que por sua vez migram para a probóscida do inseto, podendo dar continuidade ao ciclo biológico do parasito (20) (Figura 4).

Nas últimas duas décadas a Leishmaniose Visceral ressurgiu de maneira preocupante no mundo, e no Brasil isso não é diferente. Em um período compreendido entre 2006 e 2010 foram registrados aproximadamente 18.000 casos da doença, dos quais a região Nordeste representou cerca de 48% dos casos, seguida pelas regiões Norte (18%), Sudeste (18%), Centro-Oeste (8,5%) e Sul (0,1%) (21).

Apesar das tentativas governamentais de controle dos reservatórios e vetores, bem como diagnóstico e tratamento das doenças, observa-se que a Leishmaniose Visceral encontra-se em rápida expansão territorial, acometendo indivíduos de diversos grupos etários, uma vez que a letalidade da doença aumentou de 3,4% em 1994, para 5,7% em 2009, representando acréscimo de 67% (22).

O controle da Leishmaniose Visceral visa como principal objetivo a interrupção da cadeia de transmissão da doença em uma população. Assim sendo, o maior conhecimento científico, e melhor entendimento sobre o papel específico de cada componente da cadeia (agente etiológico, vetores e reservatórios) representa um dos maiores desafios para o melhoramento das estratégias de controle da doença (23).

Figura 4: Ciclo de transmissão das Leishmanioses



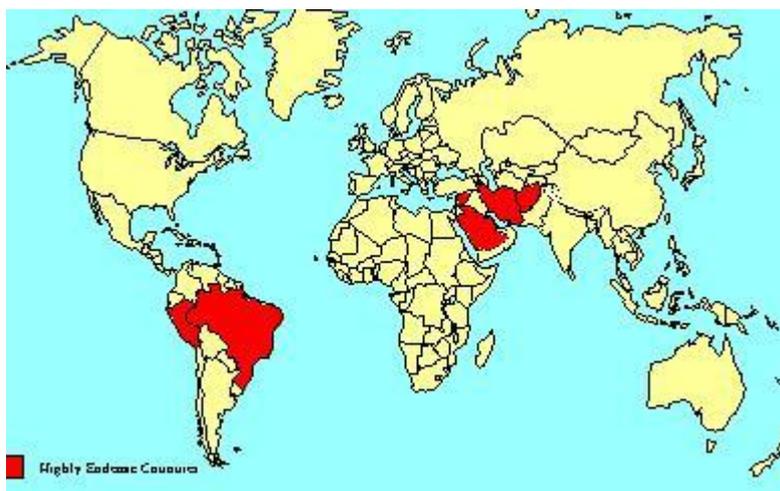
Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

1.2. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A Leishmaniose Tegumentar Americana é uma doença infecciosa, não contagiosa, caracterizada pela presença de indolores lesões ulcerosas (únicas ou múltiplas), lesões em nódulos ou ainda lesões cutaneomucosas, que atingem regiões nasofaríngeas simultaneamente, ou após uma infecção cutânea inicial, que pode ser fatal pelo acometimento secundário do sistema respiratório (1).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Leishmaniose Tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Ásia, África, Europa e Américas) (Figura 5). A patologia é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas do mundo, com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos anuais (18), dos quais 90% ocorrem no Afeganistão, Iran, Arábia Saudita, Síria, Peru e Brasil (24).

Figura 5: Distribuição mundial da Leishmaniose Tegumentar



Localidades com casos autóctones de Leishmaniose Cutânea

Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html

1.2.1. HISTÓRICO

É sabido que a Leishmaniose Tegumentar é uma antiga doença do homem. Descrições da Leishmaniose Cutânea podem ser encontradas no primeiro século d.C., na Ásia Central. As lesões encontradas nos acometidos eram descritas de acordo com a região em que ocorriam, tais como ferida de Balk (cidade no norte do Afeganistão), botão de Aleppo (Síria), botão de Bagdá (Iraque). Entre os viajantes, a doença era conhecida como botão-do-orientes. Nas Américas, há relatos da doença em cerâmicas peruanas e equatorianas desde a era pré-colombiana, onde faces humanas com mutilações do nariz e lábios foram retratadas (1).

As primeiras descrições clínicas da doença foram realizadas por Oviedo, em 1535, e Pizarro, em 1571, que descreveram a doença como “uma patologia que destruída o nariz e cavidades bucais” dos índios na encosta da Cordilheira dos Andes. Em 1764 Bueno fez observações, relatando que no Peru a Leishmaniose Cutânea era transmitida pelos flebotomíneos.

Como descrito anteriormente, a primeira observação dos parasitos do gênero *Leishmania* foi feita por Cunningham, em 1885, em casos de Leishmaniose Visceral na Índia. Em sequência, vários estudiosos passaram a encontrar e descrever o parasito, até que Ross (1903), criou o gênero *Leishmania*. No mesmo ano, Wright desvendou o agente etiológico do botão-do-orientes, classificando-o como *Leishmania tropica* (1).

No Brasil, Cerqueira já conhecia a Leishmaniose Tegumentar desde 1855, pelo encontro de lesões parecidas com o botão-do-oriental. Em 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil (São Paulo), numerosos casos foram notificados, em especial em Bauru, tornando-se conhecida como úlcera-de-Bauru. Em 1909, Lindenberg, Carini e Paranhos identificaram o parasito causador desta patologia, os quais foram nomeados por Gaspar Vianna em 1911, como *Leishmania braziliensis*. Por fim, Cerqueira (1920) e Beaurepaire-Aragão mostraram evidências da transmissão da Leishmaniose Tegumentar, colocando os flebotomíneos como vetores da doença. Concomitantemente, o papel desses insetos foi evidenciado no Velho Mundo (25).

1.2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

Atualmente são conhecidas diversas espécies de *Leishmania* spp. causadoras da Leishmaniose Tegumentar Americana, porém estima-se que este número seja absurdamente maior, havendo inúmeras amostras do parasito ainda não caracterizadas. A plasticidade do parasito pode estar estendida a níveis intra-específicos, tendo em vista a sua capacidade adaptativa a diversas condições ecológicas, reservatórios e vetores, e expressão clínica das doenças, sendo frequente a observação de determinadas espécies em mais de uma forma de Leishmaniose (7).

Nas Américas, atualmente são reconhecidas onze espécies de *Leishmania* spp. causadoras de doenças em humanos, e oito espécies com evidências de infecção apenas em animais. No Brasil, sete espécies já foram identificadas, sendo seis do complexo *Viannia* e uma do complexo *Leishmania*. As principais espécies são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Com achados mais recentes, também foram identificadas as espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) Shawi*, diagnosticadas em casos nas regiões Norte e Nordeste do país (18).

1.2.3. TRANSMISSÃO

O ciclo de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana ocorre semelhante ao ciclo de transmissão descrito para a Leishmaniose Visceral, porém estes apresentam variações de acordo com a região geográfica, e envolvem grande diversidade de agentes etiológicos, de flebotomíneos, e de reservatórios e hospedeiros (18).

De maneira geral, a infecção por ocorre quando, no momento do repasto sanguíneo, ao picar um hospedeiro susceptível, os parasitos são inoculados e transmitidos pelos flebotomíneos na forma promastigota. Estas são imediatamente fagocitadas por macrófagos, onde sofrem transformação para formas amastigotas. As amastigotas seguem a multiplicação por divisão binária no interior das células do sistema fagocítico mononuclear, que quando rompidas, liberam os parasitos na corrente sanguínea e/ou linfática, infectando outros macrófagos, dando continuidade ao ciclo em hospedeiros vertebrados (26). Quando sugadas pelo vetor durante outro repasto sanguíneo, as amastigotas sofrem transformação para formas promastigotas, que continuam sua multiplicação por divisão binária, até serem novamente inoculadas em outros hospedeiros susceptíveis, dando continuidade ao ciclo (1).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a Leishmaniose Tegumentar ocorre em 88 países, dois quais somente 30 possuem sistemas de notificação obrigatória, sugerindo que os percentuais de casos por região sejam superiores aos conhecidos.

Nas Américas a Leishmaniose Tegumentar ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Figura 6). O foco de maior importância epidemiológica é o sul-americano, que abrange todos os países, com exceção do Chile e Uruguai (27).

Figura 6: Distribuição da Leishmaniose Tegumentar Americana no Novo Mundo



Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html

No Brasil, a incidência desta patologia vem aumentando nos últimos 20 anos em todos os Estados. No período compreendido entre 1991 e 2010, foram registradas médias anuais de aproximadamente 30 mil casos, com coeficiente de detecção médio de 16 casos por 100.000 habitantes (21).

Não somente em nosso país, como em outros países da América do Sul, a Leishmaniose Tegumentar Americana constitui um sério problema de saúde pública, sendo uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção. Sua importância não está ligada somente a alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também pelo risco dessa doença assumir formas que resultam em lesões destrutivas, desfigurantes e até mesmo incapacitantes, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, em grande parte dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (27).

1.3. FLEBOTOMÍNEOS: (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)

As Leishmanioses têm mostrado significativo aumento de sua importância no contexto da saúde pública devido aos processos de urbanização, superpopulação e, principalmente, em decorrência das alterações e fragmentações no ambiente natural (9).

O processo de modificação ambiental, em consequência às ações antrópicas, alterou os habitats dos flebotomíneos. Algumas espécies que até então apresentavam comportamento estritamente silvestre, têm sido encontradas próximas a habitações humanas e em seus entornos, demonstrando que estas se encontram em largo processo de adaptação a ambientes antropizados (28).

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, sendo que os de importância médica e/ou veterinária estão agrupados na subfamília Phlebotominae (1). São insetos de pequeno porte (1-5 mm), que apresentam o corpo e pernas densamente pilosos, sendo esta uma característica geral do grupo (Figura 7). Outras características marcantes podem ser citadas: a posição da cabeça sob o tórax; antenas longas, podendo conter até 16 artículos; e posição das asas quando em repouso, as quais permanecem entreabertas e levantadas, ao invés de cruzadas sobre o dorso, como na grande maioria dos Dipteros (29).

Segundo Young & Ducan, o Brasil se destaca pela ocorrência da maior parte das espécies de flebotomos já registrados em sua área, sendo que até o ano de 1994 (ano de

publicação da obra), 229 das 500 espécies conhecidas eram encontradas em nosso território, reafirmando o valor da biodiversidade, também nesta família de dípteros (8).

Popularmente estes insetos são conhecidos como “asa branca”, “asa dura”, “berebere”, “birigui”, “cangalhinha”, “mosquito palha”, “maruino” e “tatuquira”.

Figura 7: Flebotomíneo (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)



Fonte: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>

1.3.1. CLASSIFICAÇÃO DA SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE

A subfamília Phlebotominae ainda não possui um consenso quanto à classificação de suas espécies. Até o presente momento, podemos classificar os gêneros mais importantes em dois grandes grupos, sujeitos a alterações:

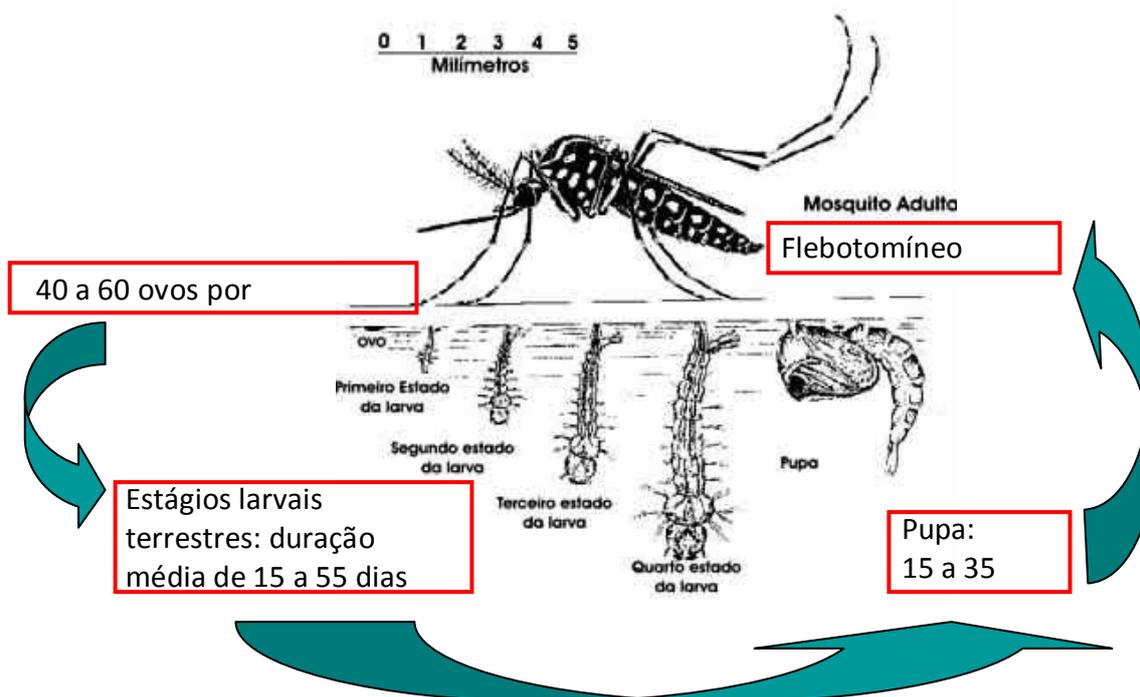
Gêneros do Velho Mundo: *Australophlebotomus*, *Chinius*, *Grassomyia*, *Idiophlebotomus*, *Parvidens*, *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaeomyia* e *Spelaeaphlebotomus*. Destes, há registros de transmissão de *Leishmania* spp. no Velho Mundo apenas pelo gênero *Phlebotomus*.

Gêneros do Novo Mundo: *Brumptomyia*, *Warileya* e *Lutzomyia*. Destes, apenas o gênero *Lutzomyia* apresenta inúmeras espécies vetoras de *Leishmania* spp. nas Américas. O gênero *Warileya* agrupa seis espécies, sendo a maioria zoofílicas, distribuídas em uma estreita faixa próxima a linha do Equador, que abrange os países da Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Panamá e Peru. Já o gênero *Brumptomyia* é composto por 22 espécies, inofensivas ao homem. Sua distribuição se dá desde o sul do México até o norte da Argentina (1).

1.3.2. PHLEBOTOMINAE: REPRODUÇÃO

Os flebotomos são dípteros holometábolos, cujo ciclo de vida compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adultos, sendo que as posturas podem ser feitas de maneira isolada ou em pequenos grupos, geralmente em solos ricos em matéria orgânica e alto teor de umidade (30) (Figura 8).

Figura 8: Esquema ilustrativo do Ciclo de Reprodução dos flebotomíneos:



Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/>

Os ovos apresentam formato elíptico e cores escuras, e possuem protuberâncias que formam imagens que podem ser usadas na taxonomia. Ao serem expelidos de maneira esparsa pelo substrato, são revestidos por uma substância viscosa, liberada pelas glândulas acessórias das fêmeas. A média de postura é de 40 a 60 ovos por fêmea a cada ciclo, e pode ocorrer de três a cinco dias após o repasto sanguíneo.

Para o desenvolvimento das larvas se faz necessária a presença de substrato úmido, porém, as de primeiro estágio, não apresentam grande resistência quando submersas. Em um estágio mais desenvolvido (4º estágio) a resistência se mostra maior, podendo resistir à umidade por até uma semana. Em contrapartida, ambientes muito secos podem levá-las a morte em poucas horas. De maneira geral apresentam afinidade por ambientes escuros, ou pouco iluminados. Os estágios larvais são terrestres, e sua duração é

variável entre as espécies, com média entre 15 a 55 dias. Podem apresentar diapausa, dependendo das condições ambientais, e até mesmo entrar em estado de quiescência, esta última determinada geneticamente, podendo ocorrer independente do ambiente em que se encontrem. A medida que se desenvolvem, as larvas tornam-se mais ativas, e alimentam-se mais intensamente. Quando encontram-se em 4º estágio, passam a eliminar conteúdo gástrico, imobilizam-se e passam para o estágio de pupa (29).

A pupa, por sua vez, é fixada em posição ereta pela extremidade posterior da exúvia larval. O período médio nesta fase é de 15 a 35 dias, dependendo da espécie. Chegado o momento da eclosão, a forma adulta liberta-se através de uma abertura longitudinal na pupa. Após a eclosão, o inseto adulto permanece pousado e com pouca mobilidade, sendo necessário algum tempo para o endurecimento da quitina. Neste período de tempo as fêmeas modificam o aparelho bucal para exercer hematofagia, e os machos sofrem rotação da genitália externa (31).

1.3.3. PHLEBOTOMINAE: MORFOLOGIA

Larvas: As larvas apresentam aspecto vermiforme, com corpo alongado, cilíndrico, afilado nas extremidades e dorso-ventralmente comprimido (Figura 9). Apresentam cápsula cefálica bem desenvolvida, com doze segmentos (três torácicos e nove abdominais), dos quais os dois últimos portam a abertura anal (região ventral) e, quando presente, o sifão respiratório (região dorsal). Durante os quatro estágios, as larvas apresentam o corpo coberto por espículas e longas cerdas caudais, apresentando um par de cerdas caudais no primeiro estágio larval, e dois pares nos demais estágios (29).

Figura 9: Larva de *Lutzomyia* spp.



Fonte: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/flies/Lutzomyia_shannoni03.htm

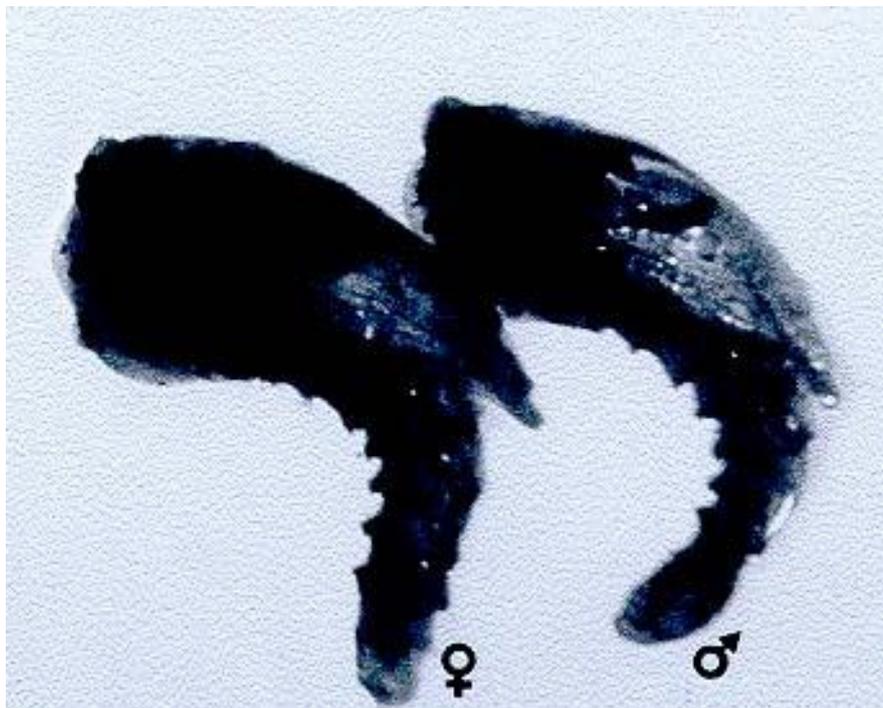
A cabeça é visivelmente individualizada, esclerotizada fortemente, e na maioria dos gêneros não é retrátil. Apresenta contorno cônico ou triangular, dotada de um par lateral de ocelos, porém esses não apresentam existência constante, podendo ser variável esse fator até mesmo entre indivíduos de uma mesma postura. Na superfície da cabeça larval observa-se também a presença de órgãos sensoriais superficiais, visíveis sob a forma de depressões circulares. A cabeça apresenta ainda, duas grandes aberturas, uma anterior, na qual estão presentes as partes bucais, e outra posterior, que se comunica com o tórax, formando o forâmen occipital. A antena é simples, e pode conter cerdas finas (31).

O tórax é formado por três segmentos: protórax, mesotórax e metatórax, sendo cada um destes divididos por anéis secundários, recobertos por cerdas. Com relação aos seguimentos torácicos, observa-se diferenciação no oitavo e últimos seguimentos, que se diferenciam entre as espécies aquáticas e terrestres. Nas espécies aquáticas, forma-se um sifão respiratório, e na extremidade deste abre-se um par de espiráculos posteriores. Nas espécies terrestres não ocorre a formação do sifão, e os espiráculos se abrem no dorso da larva. O 9º seguimento torácico encontra-se em posição ventral aos demais citados, e é formado por um conjunto de três placas, rodeando o orifício anal.

Pupas: este estágio, que precede a formação do indivíduo adulto, apresenta-se na maioria dos gêneros sob forma cilíndrica (Figura 10). De maneira geral, neste estágio se distinguem o cefalotórax e o abdômen. Na cabeça é possível observar as antenas, palpos maxilares e peças bucais. Também é possível visualizar as pernas e asas, estreitamente dispostas ao corpo.

Das regiões torácicas, a mais evidente é o metatórax, onde pode-se observar os espiráculos metatorácicos e os seguimentos abdominais, que se mostram achatados dorso-ventralmente. Nos seguimentos abdominais pode-se observar cerdas individualizadas, e presença de elementos pilosos dispostos em conjuntos, constituindo as franjas dorsal e ventral. Essas características podem ser usadas com finalidade taxonômica (31).

Figura 10: Pupas (fêmea e macho) de *Lutzomyia longipalpis*



Fonte: <http://www.scielo.br/img/fbpe/mioc/v95n4/html/386901.html>

Adultos: entre estes, de maneira geral, observa-se que a eclosão dos machos ocorre anterior à das fêmeas. Após a eclosão, os insetos alados permanecem em abrigos naturais, onde as condições microclimáticas lhes protegem da dessecação, até que a quitina corporal ganhe resistência. Estes abrigos naturais podem ser representados por grutas, tocas de animais, vegetação sobre o solo, buracos de árvores, entre outros. Em ambientes antropizados, estes abrigos vêm sendo descritos como abrigos de animais domésticos, quintais das residências, e também em locais intradomiciliares.

Os flebótomos adultos apresentam cerca de 2 a 4mm de tamanho, seu corpo é densamente piloso, e por vezes apresentam escamas entre as cerdas sobre as asas e esternitos abdominais. Possuem pernas compridas e detalhadas, e a extremidade posterior do abdome bem diferenciada, sendo que nos machos esta é bifurcada, e nas fêmeas é levemente arredondada ou pontuda (1) (Figura 11). Em geral, os psicodídeos apresentam a característica de não se afastarem muito dos abrigos naturais, e desenvolvem basicamente dois tipos de vôo: um com movimentos saltitantes sobre a superfície de pouso, e outro continuado, a fim de alcançarem distâncias mais longas (não mais de 500m). Esses dois movimentos são silenciosos, o que permite a aproximação aos hospedeiros, sem que estes os percebam (29).

Figura 11: Ilustração de macho e fêmea de flebotomíneos



Fonte: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2284&sid=9>

A cabeça dos adultos apresenta formato ligeiramente achatado dorso-ventralmente. Possuem olhos compostos arredondados e bem afastados, que não se diferenciam entre machos e fêmeas. As antenas são longas, formadas por dezesseis artículos, recobertas por numerosas cerdas e espinhos hialinos. As peças bucais são longas, do tipo sugador pungitivo, formadas por um labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e lábio. Esse conjunto denomina-se probóscida, a qual é bastante desenvolvida nas fêmeas, adaptada a punção e sucção de sangue dos hospedeiros. Os machos possuem mandíbulas rudimentares, não sendo capazes de penetrar na pele dos vertebrados, nem de exercer hematofagia. Os palpos maxilares apresentam cinco segmentos com variações de tamanho, e juntamente com as estruturas internas da cabeça, como o cibário, arco cibarial e armadura bucal, são úteis na identificação de espécies (29).

A maior parte da região torácica é ocupada pelo mesotórax, e o panorama dorsal é formado pelo mesonoto, e na sua superfície separa-se o pré-escudo, escudo, escutelo e pós-escutelo.

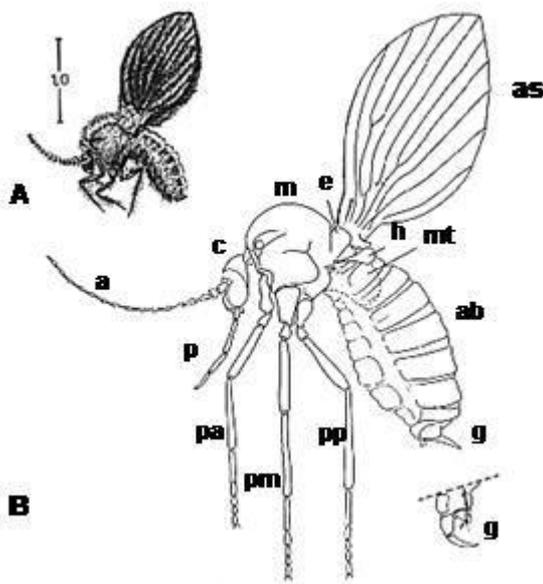
O abdômen é formado por 10 segmentos, sendo os três últimos modificados para formar a genitália externa, que nos machos é composta por três pares de apêndices: as gonapófises superiores, uma proximal e outra distal. As fêmeas apresentam estes

segmentos arredondados e encaixados uns nos outros, o que lhes confere o formato arredondado da genitália (32) (Figura 12).

Com relação à morfologia interna, destacam-se os órgãos de importância investigativa no estudo das interações parasito-hospedeiro. Após a faringe segue-se o esôfago, situado no tórax. Este é um tubo curto, onde se abrem os dutos de algumas glândulas faringianas. Após o esôfago encontra-se o estômago, dividido em região anterior e posterior, este último que sofre dilatação nas fêmeas, no momento do respasto sanguíneo, passando a ocupar a cavidade abdominal. Na extremidade distal localizam-se os tubos de Malpighi, o íleo e o reto, terminando no ânus (31).

Figura 12: Morfologia geral de psicodídeo adulto:

A) aspecto geral da fêmea (escala em milímetros); **B)** aspecto após montagem em lâmina: **a)** antena; **ab)** abdome; **as)** asa; **c)** cabeça; **e)** escutelo; **g)** genitália; **h)** haltere; **m)** mesotórax; **mt)** metatórax; **p)** palpo maxilar; **pa)** perna anterior; **pm)** perna média; **pp)** perna posterior.



Fonte: http://www.ufpe.br/biolmol/Phlebotominae_on-line/identificacao_bases.htm

1.3.4. PHLEBOTOMINAE: ALIMENTAÇÃO

Os Phlebotominae, de maneira geral, apresentam hábitos hematófagos, porém este é particular dos indivíduos femininos, pois o sangue é a fonte para maturação dos ovos. Ambos os sexos, todavia, nutrem-se de sucos vegetais que apresentem determinada riqueza de açúcares. Estas dietas têm sido observadas em laboratório, e também na natureza.

A atividade hematofágica depende de estímulos como temperatura, umidade e luminosidade do meio, bem como proximidade do hospedeiro. A maioria das espécies inicia esta atividade pouco tempo antes do crepúsculo vespertino, podendo desenvolvê-la durante toda a noite, com término antes do crepúsculo matutino (29). A preferência alimentar varia conforme as espécies, e o hábito alimentar destes insetos vem sendo estudado por diversos pesquisadores. Observa-se que mesmo havendo afinidade dos flebotomíneos por determinadas fontes alimentícias, estes se mostram insetos oportunistas, pois sugam o sangue de uma grande diversidade de mamíferos. Estes estudos são relevantes no sentido de esclarecer a epidemiologia das leishmanioses, podendo auxiliar nas atividades de profilaxia e vigilância destas doenças (33).

A quantidade de sangue que uma fêmea suga é equivalente ao seu próprio peso (valor aproximado de 0,5 mg), podendo ser obtido em um único repasto sanguíneo, ou mais, e serve como fonte de aminoácidos e proteínas para estimular a oviposição. O sangue ingerido é envolto pela membrana peritrófica, formada a cada novo repasto. A digestão do sangue é feita na região posterior do estômago, e varia de 2 a 10 dias, dependendo da espécie e das condições ambientais (29). Apesar dos registros esporádicos, casos de autogenia também são relatados entre os flebotomíneos (33).

Quanto a alimentação, observa-se que a sobrevivência destes insetos está diretamente relacionada ao número de repastos sanguíneos, e a duração de vida dos machos se mostra similar à das fêmeas não alimentadas.

1.4. LOCAL DE ESTUDO

O município de São Borja está localizado no oeste do estado do Rio Grande do Sul, distante 600 Km da capital Porto Alegre, situado entre as coordenadas 28°40'50" latitude Sul e 55°58'41" longitude Oeste (34) (Figura 13). O clima é do tipo subtropical úmido, com temperatura média anual em torno de 20°C, sendo que as médias mais altas

ocorrem no mês de janeiro ($26,9^{\circ}\text{C}$), enquanto que as mais baixas são registradas no mês de julho ($15,6^{\circ}\text{C}$) (35).

Localizado em uma área de tensão ecológica, o município de São Borja apresenta contatos entre diferentes tipos de vegetação. No local ocorrem exemplares da Floresta Estacional Decidual, Savana Estépica (Campanha), Estepe (Campos), e nas margens dos rios encontram-se as Matas de Galeria, sendo que a vegetação predominante é o campo.

O município de São Borja possui 61.671 habitantes, sendo sua área total $3.371.051\text{ Km}^2$, dos quais 71 Km^2 correspondem a área urbana, e $3.300.051\text{ Km}^2$ de áreas rurais. Este município é banhado pelos rios Uruguai, Icamaguã e Butuí.

Geograficamente, faz divisa com os municípios de Garruchos (RS) e Santo Tomé (Argentina) ao Norte; Itaqui e Maçambará (RS) ao sul; Santo Antonio das Missões e Itacurubi a Leste; e Santo Tomé (Argentina) e parte do rio Uruguai (35).

Figura 13: Mapa de localização do município de São Borja/ RS



Com relação à hidrografia da região, o município de São Borja é banhado pela Bacia hidrográfica dos Rios Piratini-Icamaquã-Butuí. Nota-se homogeneidade na distribuição da rede de drenagem do local, que é favorecida pela localização do município, que apresenta relevo pouco acidentado, com a presença de um lençol freático próximo à superfície.

Os rios que banham o município são: rio Uruguai, no limite com a Argentina; rio Icamaquã e rio Butuí. Estes três rios também contam com o aporte d'água recebido por diversos riachos locais, somados a áreas alagadiças como o Banhado Grande, Estiva, Caçacã, entre outros conhecidos na região (35).

O Estado do Rio Grande do Sul era considerado área indene para Leishmaniose Visceral humana e canina até o ano de 2008, quando o primeiro caso canino da doença foi notificado, no município de São Borja. Mais tarde, em 2009, 7 casos humanos foram registrados no município, seis destes considerados autóctones. Segundo o Ministério da Saúde (MS), esta patologia encontra-se classificada como agravo de notificação obrigatória, com programas de vigilância estabelecidos pelas Secretarias Municipais (SMS) e Estaduais de Saúde (SES) (36).

Estes programas de controle das Leishmanioses continham medidas centradas e dirigidas para o controle do reservatório canino, aplicação de inseticida, e diagnósticos e tratamento dos casos humanos. Entretanto, estas medidas realizadas isoladamente não apresentam efetividade na redução da incidência destas patologias, sugerindo à metodologia de vigilância a adoção de medidas baseadas na definição exata das áreas de transmissão e/ou risco e identificação dos vetores e reservatórios, necessitando estas medidas serem aplicadas de maneira integrada (37).

1.5. JUSTIFICATIVA

A manutenção de uma endemia em determinado local, em especial aquelas transmitidas por vetores, depende da presença de populações das espécies envolvidas no ciclo de transmissão (agentes etiológicos, reservatórios e vetores), bem como um ambiente favorável ao seu desenvolvimento. Tais condições podem ser naturalmente encontradas, ou propiciadas pelas alterações causadas pelo homem, gerando a adaptação das espécies às novas condições do meio (2).

Desta forma, o presente trabalho se justifica baseado na incidência, no crescente aumento dos casos de Leishmanioses, e nas sérias consequências das formas graves

destas doenças, aliadas a grande capacidade de adaptação dos vetores a ambientes antropicamente alterados, evidenciando fatores que impulsionam os estudos dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), sendo descritas mais de 900 espécies destes dípteros no mundo, e as estimativas são de que cerca de 80 destas sejam potenciais vetoras de *Leishmania* spp. (6).

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GERAL:

Identificar e caracterizar as espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), infectados por *Leishmania* spp. no município de São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1. Definir a distribuição geográfica dos flebotomíneos no município de São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2.2. Definir os ambientes de prevalência destes insetos entre locais de peridomicílio, intradomicílio e ambientes de biodiversidade conservada.

2.2.3. Descrever a ecologia e epidemiologia dos flebotomíneos.

2.2.4. Verificar a competência vetorial.

2.2.5. Realizar diagnóstico molecular da infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* spp.

2.2.6. Aplicar análises estatísticas para verificação da flutuação populacional e tendências da relação abundância de flebotomíneos X variáveis ambientais.

3. METODOLOGIA:

3.1. COLETAS E IDENTIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, as coletas de flebotomíneos serão realizadas durante doze meses consecutivos, em ambientes do domicílio, peridomicílio e em locais de biodiversidade conservada encontrados até 500 metros distantes do domicílio. Estão programados 3 dias consecutivos de coleta em cada mês a fim de analisar condições como médias de temperatura, índice de chuvas e umidade do ar, entre outros (anexo 1). Estes parâmetros são importantes no sentido de determinar a predominância/ preferência dos flebotomíneos por determinadas épocas do ano.

Para tais coletas serão empregadas técnicas como a armadilha de Shannon (Figura 14) e armadilhas de luz do tipo CDC (Figura 15).

As coletas com armadilha de Shannon serão feitas no peridomicílio, no horário das 18h as 22h. As coletas com armadilhas do tipo CDC serão feitas concomitantemente às Shannon. Para a disposição destas armadilhas, o município será dividido de maneira a abordar os biomas locais mais representativos, como fragmentos de floresta estacional decidual, campanha, campo e matas de galeria nas bordas dos rios. O intuito do trabalho também é comparar ambientes de domicílio e peridomicílio nos biomas citados.

Figura 14: Armadilha de Shannon



Fonte: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/centros-nucleos-e-laboratorios/laboratorio-de-entomologia-medica>

Figura 15: Armadilha luminosa tipo CDC



Fonte: Ishikawa *et al*, 2010 (38).

Em cada um dos ambientes serão instaladas 3 armadilhas luminosas, que ficarão ligadas durante doze horas ininterruptas (das 18h as 6h). Em ambientes de peridomicílio as armadilhas serão dispostas próximo às residências, em abrigos de animais e seus anexos, por exemplo. O número de horas amostrais totalizados pela armadilha de Shannon será de aproximadamente 108 horas, enquanto que o número amostral provindo das armadilhas de luz totalizará aproximadamente 430 horas.

Os indivíduos coletados serão abatidos em gelo seco. Após a morte, os flebotomíneos serão armazenados em tubos de hemólise contendo álcool 70%, fechados com tampões de algodão, para não danificar as amostras.

A identificação das espécies seguirá as classificações propostas por Young e Duncan (1994). Para tais atividades, o projeto conta com apoio do Laboratório de Entomologia da Seção de Reservatórios e Vetores da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde deste Estado (FEPPS RS).

3.1.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) POR *Leishmania* spp.

A presença de kDNA será investigada nos flebotomíneos através da técnica de PCR. As fêmeas serão dessecadas em solução salina, e examinadas em lâmina banhada por sulfato de amicacina, para observação do trato digestivo em microscópio óptico com

aumento de 400 X. As partes que apresentarem formas flageladas dos parasitos serão coletadas e armazenadas a -70 °C (39).

Para extração de kDNA será utilizado o kit QIAamp DNA Micro Handbook (Qiagen). Os métodos utilizados na técnica de PCR serão os preconizados por Arevalo et al. (1993) (40), e adaptados por Santos (2000) (41).

3.1.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A PCR será realizada em termociclador, utilizando os iniciadores MP1L (5'-TAC TCC CCG ACA TGC CTC TG-3') e MP3H (5'-GAA CGC GGT TTC TGT ATG C-3'), para a amplificação de fragmentos de 70 pares de base da região do kDNA. O termociclador será regulado para o seguinte ciclo: início com temperatura para desnaturação de 1 min a 94 °C; seguidos de 29 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min a 54 °C (anelamento), 15 s. a 72 °C, finalizando em 4 °C (41).

Os produtos amplificados serão analisados em gel de agarose 3%, por eletroforese a 85V. As amostras serão coradas com brometo de etídio a 10mg/ µL, visualizados em luz UV.

As etapas de identificação molecular dos protozoários serão realizadas no Laboratório de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, em colaboração com o Laboratório de Biologia Parasitária da mesma instituição.

3.1.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para organização dos dados obtidos quanto à biologia e ecologia dos flebotomíneos, alguns testes estatísticos serão realizados.

Para a análise de abundância relativa (%) das espécies, serão utilizados os dados obtidos nas coletas, no período de fevereiro de 2013 e janeiro de 2014. A diversidade de espécies encontradas no município de São Borja será calculada através do índice de Fisher-Willians ($a = S - 1/Ln.N$), onde a representa o índice de diversidade; S o número de espécies; e N o número total de indivíduos capturados.

A fim de verificar a flutuação populacional, serão utilizados os valores médios de temperatura ambiente, umidade relativa do ar, e precipitação pluviométrica, obtidos a cada coleta mensal. Estes dados serão confrontados com o observado para abundância mensal dos flebotomíneos.

O coeficiente de correlação de Spearman também será utilizado, a fim de determinar as tendências da relação abundância de insetos X variáveis ambientais. Todos os testes estatísticos serão aplicados com nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Com o desenvolvimento do presente projeto, a perspectiva maior é identificação exata das espécies de flebotomíneos existentes no local de estudo, bem como identificar a possível infecção natural destes insetos por protozoários do gênero *Leishmania* spp. Subsequente a isto, procuramos ter subsídios para definir a distribuição geográfica dos flebotomos nos diferentes ambientes amostrados, indicando (ou não) a preferência e adaptação destes insetos a determinados locais (domicílio e peridomicílio), bem como de suas fontes alimentícias.

As coletas serão realizadas durante doze meses consecutivos, mensalmente. Desta forma, a intenção é registrar informações como médias de temperatura e índice de chuvas, uma vez que as estações do ano não tem apresentado padrões determinados para este tipo de estudo. A determinação sazonal dos vetores é importante no sentido de indicar o período de maior atividade dos mosquitos, onde o risco à população se torna mais acentuado, uma vez que os flebotomíneos, além da patologia focada no presente trabalho, são vetores de outros agentes prejudiciais a saúde, como outros protozoários, alguns vírus e bactérias.

Com relação a epidemiologia e controle dos casos de Leishmanioses, a identificação taxonômica do agente etiológico no inseto é de grande importância clínica, e cada vez mais, o uso de técnicas rápidas e confiáveis como a PCR, tem sido empregada nestes tipo de estudo, afim de determinar os perfis epidemiológicos das doenças. Desta forma, o presente trabalho visa contribuir na pesquisa e caracterização dos flebotomíneos como agentes etiológicos de ampla importância médica e veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neves, DP, Melo, AL, Genaro, O, Linardi, PM. Parasitologia Humana. Editora Atheneu, 9ª edição, 1997.
2. Ximenes, MFF, Silva, VPM, Queiroz, PVS, Rego, MM, Corte, AM, Batista, LMM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil – reflexos do ambiente antrópico. *Neotropical Entomology* 2007; 36(1):128-137.
3. Scodro, RBL, Castro, KRR, Sversutti, ACD, Abreu, HCN, Membrive, NA, Kühl, JB, et al. Investigation of natural infection by *Leishmania* in sandflies of Paraná State, southern Brazil. *Brazilian archives of biology and technology* 2008; 51(3):483-491.
4. World Health Organization WHO, 2005;
<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>.
5. Neitzke, HC, Scodro, RBL, Castro, KRR, Sversutti, ACD, Silveira, TGV, Teodoro, U. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008; 41(1):17-22.
6. Saraiva, L, Lopes, JS, Oliveira, GBM, Batista, FA, Falcão, AL, Filho, JDA. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39(1):56-63.
7. Schriefer, ALF, Souza, RS, Guimarães, LH, Góes-Neto, A, Schriefer, A. Host and parasite roles in the clinical outcome of leishmaniasis. *Gazeta Médica da Bahia*, 2005; 75(1):46-56.
8. Rangel E, Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, 2003: pp.368.
9. Barata, RA, França-Silva, JC, Mayrink, W, Silva, JC, Prata, A, Lorosa, ES. et al. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005;38(5):421-425.
10. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da leishmaniose visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. Ministério da Saúde – Dep. Vig. Epidemiológica, 2010.
11. Deboni, SC, Barbosa, M, Ramos, RR. Vigilância epidemiológica de casos humanos. *Boletim Epidemiológico: leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul*. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, 2011;13(1).
12. Caldas, AJM, Silva, DRC, Pereira, CCR, Nunes, PMS, Silva, BP, Silva, AAM. et al. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de

leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-MA, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2001 34: 445-451.

13. Maia-Elkhoury, ANS, Alves, WA, Sousa-Gomes, ML, Sena, JM, Luna, EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2006;24(12):2941-2947.

14. Alencar, JE. Leishmaniose visceral no Brasil. Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 1977; 17/18:129-148.

15. Penha, HA. Leishmaniose visceral no Brasil. Brasil Médico, Rio de Janeiro, 1934; 18:940-950.

16. Fraser, CM. Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária. 9ª Ed. Editora Roca, São Paulo, 2008;543-544.

17. Almeida, MAO, Jesus, EEV, Souza, A, Atta, MLB., Alves, LC, Berne, ME. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Veterinary Parasitology.2005;127:227-232.

18. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Ed. Editora do Ministério da Saúde, 182 p. Brasília, DF, 2007.

19. Pita-Pereira, D, Alves, CR, Souza, MB, Brazil, RP, Bertho, AL, de Figueiredo Barbosa, A, et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermèdia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 99, p. 905-913, 2005

20. Silva, DG. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia - Universidade de Santa Catarina, 2008.

21. <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/> Acessado em 29/08/2012.

22. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. 1ª Ed. Editora do Ministério da Saúde, 82p. Brasília, DF, 2011.

23. Hermont, VJ. Leish-Tec. vacina recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. Manual Técnico.1ª Ed., 2008.

24. <http://www.who.int/topics/en/> Acessado em 29/08/2012.

25. Costa, JML. Leishmaniose Tegumentar Americana: origens e histórico no Brasil. Acta Amazônica, 1992;22(1):71-77.

26. Soares, D. C., Epidemiologia da leishmaniose tegumentar no município de Juruti, Pará. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará, 2008.
27. Gontijo, B, Carvalho, MLR. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003;36(1):71-80.
28. Barbosa, MGV, Fé, NF, Marcião, AHR, Silva, APT, Monteiro, WM, Guerra, JAO. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008;41(5):485-491.
29. Galati, EAB. Biologia, sistemática e noções práticas para o conhecimento de flebotomíneos. Curso de controle integrado de vetores – USP. São Paulo. 2000.
30. Azevedo, PCB, Lopes, GN, Fonteles, RS, Vasconcelos, GC, Moraes, JLP, Rebelo, JMM. The effect of fragmentation on Phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of Ombrophilous Forest in São Luís, State of Maranhão, Brazil. *Neotropical Entomology*. 2011;40(2):271-277.
31. Forattini, OP. *Entomologia Médica*. Editora Edgard Blücher Ltda, 4ª Edição, 1973.
32. Shimabukuro, PHF, Tolezano, JE, Galati, EAB. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*.2011;(27):399-441.
33. Muniz, LHG, Rossi, RM, Neitzke, HC, Monteiro, WM, Teodoro, U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública* 2006; 40(6):1087-93.
34. Google Earth Acessado em 13/09/2012.
35. <http://www.saoborja.rs.gov.br/portal/> Acessado em 13/09/2012.
36. <http://www.saude.rs.gov.br/> Acessado em 16/09/2012.
37. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1º Ed. Editora do Ministério da Saúde, 120p. Brasília, DF, 2006.
38. Souza, AAA, Silveira, FT, Lainson, R, Barata, IR, Silva MGS, Lima, JAN, Pinheiro, MSB, Silva, FMM, Vasconcelos, LS, Campos, MB, Ishikawa, EAY. Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Revista. Pan-Amazônica de Saúde*, 2010; 1(1):45-51.
39. Saraiva, L, Filho, JDA., Silva, SO, de Andrade, ASR., Melo, MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and

visceral leishmaniasis sympatric área in Southeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2010;1033-1039-105(8).

40. Arevalo, J, Inga, R, Lopes, M. Polymerase chain reaction: Detection of *Leishmania braziliensis*. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications. American Society Microbiology 1993; 456-46.

41. Santos, OS. Studies on sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Parque Estadual do Turvo, RGS, Brazil, and their role in *Leishmania* transmission. Dissertação de Doutorado em Biologia – Universidade de Tübingen, Alemanha; 2000.

ANEXO 1: Ficha de identificação das coletas de flebotomíneos

COLETA Nº: _____

Coleta de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil

Data da coleta: ____/____/____.

Local da coleta: _____

Endereço: _____

Ponto referência: _____

Proprietário: _____

Coletor 1: _____

Coletor 2: _____

Coletor 3: _____

Ponto da coleta: Latitude: _____

Longitude: _____

Tipo de coleta:

 Armadilha CDC – Altura do solo: _____

Hora da coleta: ____:____ as ____:____

 Armadilha de Shannon

Hora da coleta: ____:____ as ____:____

Nº espécimes coletados: _____

Condição Meteorológica: _____

Temperatura do ar: _____

Índice pluviométrico: _____

Observações: _____
