

# 8

## Phlebotominae, Triatominae e Trypanosomatinae associadas: diagnóstico e monitoramento de diversidade biológica na Amazônia e interações com as populações humanas

### RESUMO

Este projeto tem como objetivo contribuir para a caracterização da diversidade e distribuição de reduviídeos e psicodídeos hematófagos na Amazônia, bem como estudar as interações entre esses insetos, parasitas tripanosomatídeos e as populações humanas. Os estudos de campo na Amazônia foram integrados com ensaios de taxonomia molecular nos laboratórios, e as técnicas utilizadas foram de análise numérica, zimo-taxonomia e seqüenciamento de ácido nucleico ribossomal. Os resultados, parcialmente obtidos, foram relevantes para a pesquisa básica de zoogeografia e aplicáveis ao desenvolvimento de programas de vigilância entomológica e epidemiológica de doenças de Chagas e leishmaniose na Região.

### ANTECEDENTES

Os reduviídeos hematófagos são os percevejos da subfamília Triatominae, também conhecidos como barbeiros. São de importância médica como transmissores de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. *T. cruzi*, que é um parasito comum em mamíferos silvestres na Amazônia, mas a Amazônia Brasileira não é considerada endêmica para a doença humana, principalmente pela falta de ciclos domiciliares de transmissão, mantidos por populações sinantrópicas do vetor. Entretanto, existem registros de casos autóctones de doença de Chagas na Região, contraídos diretamente de ciclos silvestres do parasito, e há evidências de altas taxas de soropositividade para *T. cruzi* entre piaçabeiros do Rio Negro. Ao mesmo tempo, as condições de moradia nas comunidades rurais de algumas áreas como o sul do Pará seriam propícias para o estabelecimento de ciclos domiciliares de transmissão. Neste contexto, é relevante o grau de afinidade genética entre populações amazônicas de triatomíneos do gênero *Rhodnius* e populações domiciliares do vetor *R. prolixus* da Venezuela e América Central.

Os psicodídeos hematófagos são os mosquitos da subfamília Phlebotominae, também conhecidos como flebótomos ou tatuquiras. São de importância médica como transmissores das espécies de *Leishmania*, os agentes etiológicos das leishmanioses. A Região Amazônica é notável pela alta diversi-

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

dade de espécies de Phlebotominae e de espécies e variedades de *Leishmania*. A epidemiologia de leishmanioses na Amazônia varia conforme o local e as espécies de flebotomíneos e parasitas envolvidos, mas na maioria dos casos os reservatórios do parasita são animais silvestres. Algumas espécies de flebotomos do gênero *Lutzomyia* têm a capacidade de colonizar o ambiente peri-domiciliar em áreas desmatadas, mantendo focos de transmissão de *Leishmania* no novo ambiente antrópico.

Os tripanosmatíneos são protozoários parasitários, incluindo *Trypanosoma rangeli* e *T. cruzi* associados a triatomíneos e mamíferos, *Leishmania* spp. associadas a flebotomíneos e mamíferos, diversas outras espécies de *Trypanosoma* associadas a flebotomíneos e vertebrados silvestres, e espécies de outros gêneros que infectam apenas os invertebrados.

## METODOLOGIA

Os estudos de campo na Amazônia foram integrados com ensaios de taxonomia molecular nos laboratórios e as técnicas utilizadas foram de análise numérica, zimo-taxonomia e seqüenciamento de ácido nucleico ribossomal. Os resultados, parcialmente obtidos, foram relevantes para a pesquisa básica de zoogeografia e aplicáveis ao desenvolvimento de programas de vigilância entomológica e epidemiológica de doenças de Chagas e leishmaniose na Região.

Uma das principais metas do projeto foi analisar amostras de flebotomíneos da Amazônia Brasileira em escala que permita uma contribuição significativa ao estudo da diversidade e distribuição das faunas locais. O material coletado e identificado já totaliza mais de 60.000 espécimes, além das amostras ainda em fase de identificação, o que permitirá análise comparativa das amostras, para nos próximos meses consolidar uma base para caracterizar as faunas em escalas micro e macrogeográficas. Além disso, foi possível acrescentar à proposta inicial, a análise faunística de outras subfamílias de Psychodidae (Psychodinae, Bruchomyiinae, Trichomyiinae) em colaboração com o Dr Laurence Quate, do Natural History Museum of Los Angeles County. A análise destas outras subfamílias provavelmente levará um pouco mais de tempo, em decorrência do grande número de espécies novas que precisam ser descritas, mas um trabalho sobre as novas Bruchomyiinae já está em fase de publicação. Outros resultados que vão além do inicialmente previsto dizem respeito à colonização de flebotomíneos no laboratório, que foi possível em virtude da agregação do Dr Raul Queiroz e dois alunos de Mestrado à equipe original.

Duas outras metas, a consolidação de um criobanco de parasitas e a implantação de análises moleculares no Laboratório do INPA, sofreram um atraso considerável na sua implementação, mesmo levando-se em conta que o projeto só começou a receber recursos financeiros um ano mais tarde que os outros projetos do Edital. Isso se deve em parte à ausência de recursos na rubrica de equipamentos, nas primeiras parcelas liberadas, e principalmente ao fato que a

Fundação Djalma Batista obteve uma cota para importação direta somente em maio de 1999. Tanto o equipamento para o criobanco como o equipamento para a eletroforese horizontal já se encontram em nosso laboratório, e esperamos ver muitos resultados deste investimento, ao longo dos próximos anos. Durante a vigência do projeto foram realizados estudos de caracterização molecular de parasitas e vetores em colaboração entre o Laboratório do INPA e outros órgãos, conforme resumido a seguir.

## RESULTADOS E IMPACTOS

### 1. Caracterização molecular e clínico-epidemiológica de 111 amostras de *Leishmania* da Região Amazônica.

As amostras foram caracterizadas em nível de espécie por eletroforese horizontal em gel de agarose, de seis sistemas enzimáticos (MDH, malato desidrogenase; IDH, isocitrato desidrogenase; ME, enzima málica; G6PDH, glicose-6-fosfato desidrogenase; 6PGDH, 6 fosfogliconato desidrogenase e NH, nucleotidase e nucleotidase desidrogenase). Oitenta e seis amostras foram identificadas como *Leishmania guyanensis*, a maioria de pacientes procedentes de Manaus e municípios vizinhos a leste do Rio Negro. Merecem registro individual as amostras de *L. guyanensis* isoladas de pacientes procedentes de outras áreas, embora não se pode ter certeza que todos os casos sejam autóctones:

Barcelos/AM (1), Barreirinha/AM (1), Rio Jutai/AM (1), Benjamin Constant/AM (1), Janaucá/AM (1), Parintins/AM (1), Eirunepé/AM (1), Prainha/PA (1), Santarém/PA (1), Boa Vista/RR (1).

*Leishmania braziliensis* foi identificada em amostras de pacientes procedentes de Presidente Figueiredo/AM (3), Rio Purus/AM (2), Manaus/AM (3), Rio Uruçu/AM (1), Pitinga/AM (1), Castanho/AM (1), Lábrea/AM (1), São Gabriel da Cachoeira/AM (1), Novo Airão/AM (1), Alenquer/PA (1), Santarém/PA (1).

Amostras isoladas de um cão doméstico em Manaus e de uma mucura silvestre *Didelphis marsupialis* do Rio Paduaui/AM também foram caracterizadas como *L. braziliensis* pela eletroforese de enzimas.

Seis amostras de pacientes representam novos registros de infecção humana por *Leishmania naiffi*, sendo quatro de Manaus e municípios vizinhos a leste do Rio Negro, uma de Apuí/AM, e uma de Rolim de Moura/RO.

Uma amostra, de um paciente procedente de Alenquer/PA, foi identificada como *Leishmania amazonensis*.

Todas as amostras de *L. guyanensis* apresentam o mesmo padrão (zimodemo) na eletroforese de enzimas. Destas amostras, 47 foram avaliadas para variações de seqüências em nível de espaçadores transcritos internos na região intergênica de rRNA (polimorfismo de fragmentos de restrição ITS). As 47 amostras foram discriminadas em 10 subtipos. A cepa classificada como subtipo B foi a mais freqüente (68%), associada com lesão cutânea (29) ou mucosa (3),

sendo também a variante genética com maior distribuição geográfica. Não houve correlação aparente entre subtipos e a forma clínica ou evolução da doença, embora os casos de lesão da mucosa foram associados aos subtipos A, B e I de *L. guyanensis*. Dois isolados de *L. guyanensis* de um mesmo paciente apresentaram perfis distintos em duas oportunidades: cutânea (B) e mucosa (I); e perna (B) e braço (J) respectivamente.

O significado epidemiológico da extensa variação genética detectada não foi definido neste estudo, porém o poder discriminatório da técnica de análise de fragmentos ITS indica a possibilidade de experimentos direcionados a esclarecer a manutenção e dinâmica de transmissão de clones genéticos de *Leishmania* que circulam na natureza.

(Naiff MF 1998. *Leishmaniose Tegumentar na Amazônia – Distribuição Geográfica dos Agentes Etiológicos na Região*. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro).

## 2. Afinidade filogenética de triatomíneos amazônicos.

Amostras de triatomíneos do complexo *Rhodnius prolixus* / *R. robustus* procedentes de Tucuruí/PA, Balbina/AM, Samuel/RO e de *Rhodnius brethesi* de Barcelos/AM e *R. pictipes* de Manaus foram comparadas entre si e com outras amostras de *Rhodnius* e *Psammolestes* do Brasil, Colômbia, Peru, Equador, Venezuela e América Central, num trabalho envolvendo Dra. Dawn Wesson, participante do projeto PPD, e colaboradores. Foram analisadas as seqüências de fragmentos de DNA dos genes mitocondriais CytB e 1 sur RNA e a região nuclear variável do gene de 28S RNA. As análises discriminaram as amostras de *R. prolixus* (sensu lato) da Amazônia Brasileira e do Equador, de origem silvestre, em um grupo distinto das populações domiciliares de *R. prolixus* da Venezuela e América Central. *Rhodnius brethesi* apresentou uma afinidade maior com *R. pictipes*, formando um grupo distante do grupo de *R. prolixus*. Os resultados indicam que *R. prolixus* tem maior afinidade com *Psammolestes tertius* que com *R. brethesi* ou *R. pictipes*, o que indicaria a inclusão das espécies de *Psammolestes* no gênero *Rhodnius*.

Amostras adicionais de *Rhodnius* coletadas durante os trabalhos de campo, estão sendo analisados.

(Monteiro FA, Wesson DM e colaboradores. Phylogeny and Molecular Taxonomy of the Rhodniini Tribe (Hemiptera: Reduviidae) Derived from Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences. Manuscrito em processo de publicação).

## 3. Comparação de Populações de *Lutzomyia umbratilis* de Manacapuru e áreas periurbanas de Manaus.

O flebotomíneo *Lutzomyia umbratilis* é o principal vetor de *Leishmania guyanensis*, parasita responsável pela alta incidência de leishmaniose cutânea

humana a leste do Rio Negro. *Lu. umbratilis* ocorre também a oeste do Rio Negro, nos municípios de Iranduba e Manacapuru, porém nestes Municípios não há registro de caso comprovadamente autóctone de infecção humana por *Le. guyanensis*. Mais de mil fêmeas de *Lu. umbratilis* coletadas em bases de árvores em Manacapuru foram todas negativas para *Leishmania*.

O estabelecimento de colônias fechadas de *Lu. umbratilis* no laboratório permitiria comparar a suscetibilidade de diferentes populações, a infecção experimental por *Le. guyanensis*. Isso tem sido dificultado pelo fato de *Lu. umbratilis* mostrar-se muito mais refratária à criação que outras espécies como *Lu. longipalpis*, *Lu. evandroi*, *Lu. carmelinoi* e *Lu. cruzi* mantidos em nosso laboratório. No entanto, os ensaios de colonização têm fornecido dados sobre parâmetros biológicos, que, junto com estudos morfométricos, contribuem para caracterizar as diferentes populações.

Para avaliar o tempo de incubação dos ovos  $F_1$  e a duração de cada uma das quatro fases larvais e da pupa, três repetições de três potes com 30 ovos cada (total 270 ovos) foram acompanhados para cada população. Esta etapa já foi concluída para a população de Vivenda Verde (Manaus) e o material de Manacapuru já se encontra em fase de quarto estágio larval e pupa.

Para avaliar a longevidade dos adultos com e sem acesso a uma fonte de açúcar, a temperatura e umidade relativa do ar foram padronizadas em 27°C e 92% numa câmara de germinação. Lotes de oito machos e oito fêmeas foram mantidos em gaiolas contendo maçã como fonte de energia ou água como controle. Duas repetições em períodos distintos foram concluídas para a população de Vivenda Verde e as observações sobre a população de Manacapuru estão em andamento com início das primeiras emergências dos adultos.

Para avaliar a produtividade das fêmeas foram medidas a fecundidade e a fertilidade dos insetos coletados no campo. Noventa fêmeas de Vivenda Verde produziram uma média de 23,6 ovos postos (0-50) enquanto 90 fêmeas de Manacapuru produziram média de 26,1 (0-76) por fêmea. O total de ovos postos e ovos retidos foi de 2713 para Vivenda Verde e 3608 para Manacapuru. A diferença de fecundidade foi estatisticamente significativa ( $P < 0.001$ , Teste-t). A taxa de eclosão dos ovos postos também foi medida para as duas populações (dados em análise) e a avaliação do número de adultos efetivamente originados a partir de número conhecido de ovos postos está em fase de conclusão para as duas populações.

Para a comparação morfométrica das populações de *Lu. umbratilis* de Vivenda Verde e Manacapuru foram utilizadas 30 machos e 30 fêmeas coletadas em base de árvores em cada área. Após clarificação e montagem individual em lâminas de microscópio, as medições foram realizadas, considerando-se 92 caracteres lineares. As medidas para a população de Vivenda Verde já foram realizadas. Análise multivariada dos dados será feita através de análise de função discriminante utilizando o programa STATIGRAPHICS. Amostras de populações de *Lu. umbratilis* de outras áreas incluindo os Estado do Pará e Amapá foram obtidas e posteriormente serão incluídas nas análises.

#### 4. Taxonomia e sistemática de Phlebotominae

A maioria das espécies de flebotomíneos está classificada nos gêneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* (do Velho Mundo) e *Lutzomyia* e *Brumptomyia* (do Novo Mundo), obedecendo a premissa que o grau de parentesco entre as espécies americanas e as espécies africanas seja bastante remota. Essa premissa foi contestada pela descoberta e descrição de *Lutzomyia derelicta* Freitas & Barrett 1999, uma espécie amazônica que é feneticamente intermediária entre as demais espécies de *Lutzomyia* e as espécies africanas classificadas no subgênero *Sintonius* de *Sergentomyia*. A presença de um bulbo posterior na parede dorsal do cibário nas fêmeas tem sido considerado como caráter basilar para diferenciar as espécies americanas de flebotomíneos das espécies africanas. Esta estrutura é ausente em *L. derelicta* e no gênero africano *Sergentomyia*, e, junto com outros caracteres sugere que *L. derelicta* possa representar um vicariante pleisiomorfo das espécies africanas,ilhado pela formação do Oceano Atlântico no Cretáceo, e confinado a um pequeno refúgio seco pela evolução da floresta amazônica. A localidade tipo da nova espécie é a base da escarpa da Serra do Cachorro, uma meseta de sedimentos paleozóicos na margem direita do Rio Cachorro ou Imabu, um afluente do Rio Trombetas no norte do Estado do Pará. Este ambiente é permanentemente protegido da chuva pelo ressalto da escarpa, e é rico em salitre. O local provavelmente tenha sido de terra firme desde o Permiano. Além da geologia pouco usual para a Região, o local é de interesse como única localidade conhecida para a bromélia saxícola *Pitcairnia crinita* Pereira e Martinelli. A descoberta de *L. derelicta* ressalta o especial interesse científico e conservacionista do sítio, que se encontra dentro da área de influência do projeto para a construção de uma usina hidrelétrica em Cachoeira Porteira.

As matas nas encostas inferiores da Serra do Cachorro abrigam uma rica fauna de flebotomíneos, com 44 espécies representadas numa amostra de 4232 espécimes coletadas em armadilhas de luz. Entre seis espécies do subgênero *Evandromyia* coletadas neste local, duas são espécies novas, em fase final de descrição taxonômica. Estas duas espécies já foram coletadas em outras áreas na Amazônia e tratadas como variantes geográficas de *Lutzomyia infraspinosa*. A ocorrência das duas formas e de *L. infraspinosa*, no mesmo local, e a ausência de formas intermediárias, reconfirma que se trata de espécies distintas.

*Lutzomyia douradoi* Freitas e Fé 1998 foi descrita a partir de material coletado no Município de São Gabriel da Cachoeira, no médio Rio Negro. É a única espécie do subgênero *Psychodopygus* a ser descrita desde 1988. As espécies deste subgênero são de interesse médico, por incluírem vetores de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania naiffi*. Numa excursão de volta à localidade tipo de *L. douradoi*, em outubro de 1999, foi confirmado que a nova espécie ataca ao homem com avidez (dados em análise).

Outra espécie de flebotomíneo identificada como sendo nova é abundante nas amostras coletadas na região de Barão de Melgaço/MT, e pertence ao grupo Migonei do gênero *Lutzomyia*.

Além da descrição de espécies novas, e de novas informações sobre a distribuição geográfica das espécies conhecidas, a criação de flebotomíneos no laboratório vem permitindo o exame de novos caracteres para separar espécies cujas fêmeas são morfologicamente afins, o estudo da diversidade morfológica das larvas, e a obtenção de material para futuros estudos moleculares.

(Fé NF, Freitas RA, Barrett TV 1998. Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia (Psychodopygus) douradoi* n. sp. Mem.Inst. Oswaldo Cruz 93: 331-336.

Freitas RA, Barrett TV 1999. *Lutzomyia derelicta* (Diptera: Psychodidae) a singular new phlebotomine sand fly from an inselberg in northeastern Amazonia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 629-633.)

## 5. Outros dados e materiais coletados, em fase de análise e caracterização.

- A utilização de amostras de flebotomíneos como indicador de alterações faunísticas nas diferentes fases de produção madeireira sob manejo sustentado está sendo realizada nas terras da Mil Madeireira Itacoatiara Ltda. Este estudo inclui o acompanhamento das taxas de infecção por tripanosomatíneos nas espécies que utilizam as bases dos troncos das árvores como refúgio durante o dia. Estes dados permitirão a comparação de áreas sob manejo, antes e depois do corte, com a área de preservação permanente e com uma área próxima onde ocorreu a extração predatória de madeira.
- Nos estudos de leishmaniose na península entre o Rio Negro e o Rio Solimões, foram isoladas uma dúzia de amostras de *Leishmania* de pacientes. Dissecção de flebotomíneos nesta área revelou flagelados em *Lutzomyia umbratilis* e *L. anduzei*, mas nenhuma amostra isolada dos insetos foi confirmada como sendo *Leishmania* até o presente. Isso contrasta com os resultados de uma campanha realizada no Amapá em outubro de 1999, quando foram constatadas altíssimas taxas de infecção por *Leishmania* em *L. umbratilis* e na população humana. Há indícios que nesta área, um dos fatores de risco para a doença humana seja a extração de cipó.
- Inquéritos domiciliares, utilizando formulários padronizados, foram realizadas nas áreas de campo, para caracterizar os ambientes domiciliar e peridomiciliar e avaliar os conhecimentos dos moradores sobre leishmaniose e doença de Chagas e seus vetores. Foram detectados focos peridomiciliares de flebotomíneos no sul do Pará e de *Triatoma sordida* no Mato Grosso.
- Nas coletas de cepas de *Leishmania* de pacientes nas áreas rurais, feitas em colaboração com os serviços de saúde locais, foi detectado um número preocupante de casos de pacientes em tratamento para leishmaniose, sem evidência de infecção pelo parasita. Estes casos incluem pacientes com



paracoccidioidomicose, que corriam risco de vida em decorrência do problema do diagnóstico diferencial. O problema está sendo analisado em colaboração com colegas da comunidade médica, e as sugestões para medidas mitigadoras serão divulgadas de forma mais ampla (e diplomática) possível.

- As análises faunísticas de flebotomíneos e a relação completa dos tripanosomatíneos estudados, bem como o detalhamento dos principais resultados, serão apresentados no Relatório Técnico Final do Projeto, em fevereiro de 2000.

## EQUIPE

Toby Vicent Barret (Coordenador); Raul Guerra de Queiroz; Dawin M. Wesson; Maria C. Brancardi; Rui Alves de Freitas; Maricleide de Farias Naiff; Sebastião Aldo Valente; Vera da Costa Valente; e Roberto Daibes Naiff.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)