



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**VIRGÍNIA PENÉLLOPE MACEDO E SILVA**

**PREFERÊNCIA ALIMENTAR E IDENTIFICAÇÃO DAS  
PRINCIPAIS FONTES DE REPASTO SANGÜÍNEO DE  
FÊMEAS *Lutzomyia* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM ÁREAS  
ENDÊMICAS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NA  
GRANDE NATAL.**

**NATAL  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**VIRGÍNIA PENÉLLOPE MACEDO E SILVA**

**PREFERÊNCIA ALIMENTAR E IDENTIFICAÇÃO DAS  
PRINCIPAIS FONTES DE REPASTO SANGÜÍNEO DE  
FÊMEAS *Lutzomyia* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM ÁREAS  
ENDÊMICAS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NA  
GRANDE NATAL.**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Norte como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica.

Orientadora: Dra. M<sup>a</sup> de Fátima Freire de Melo  
Ximenes

**NATAL  
2008**

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial Leopoldo Nelson.

Silva, Virgínia Penélope Macedo e.

Preferência alimentar e identificação das principais fontes de repasto sanguíneo de fêmeas *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas endêmicas para leishmaniose visceral na grande Natal / Virgínia Penélope Macedo e Silva. – Natal (RN), 2008.  
63 f.

Orientador: Maria de Fátima Freire de Melo Ximenes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Leishmaniose - Dissertação. 2. *Lutzomyia* - Dissertação. 3. Repasto sanguíneo - Dissertação. 4. Citocromo b - Dissertação. I. Ximenes, Maria de Fátima Freire de Melo. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BC

CDU 616.993.161 (043.3)

## DEDICATÓRIAS

*Ao meu pai, Francisco Francimário da Silva (in memorian), razão do meu continuar, meu maior exemplo de vida, amor e entrega sem limites. Dedico a você mais uma etapa da minha vida, que se finda hoje e se inicia amanhã.*

*Aos meus avós paternos, Francisco Lopes da Silva (in memorian) e Jovelina Hermília da Silva, pessoas que tiveram instrução limitada, mas que possuem um coração inflamado de tanto amor e resignação.*

*Aos meus avós maternos, José Guilherme de Macedo (in memorian) e Alba Macedo, sempre tão presentes em todas as fases da minha vida, sempre cuidando de mim e dos meus, melhor lembrança do meu passado, melhor presente.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, por ter preenchido minhas lacunas, por ter sido minha fortaleza e refúgio, por ter me escutado quando todos já estavam cansados da minha voz, por ter segurado forte minha mão quando a solidão prevalecia e quando tudo ao meu redor me fazia cair. Agradeço principalmente, por me dar de presente um sorriso após cada lágrima.

Agradeço ao meu pai, **Francisco Francimário da Silva** (*in memoriam*), razão da minha busca incessante, razão contínua da minha alegria. Amor que me faz continuar, dia após dia, noite após noite, mesmo quando tudo parece desmoronar. Há uma certeza entre nós: somos mais porque ainda continuamos juntos.

À minha mãe e fortaleza, **Mirian Macedo e Silva**, por ter compreendido minhas escolhas, por ter acolhido meus sonhos, por permanecer integralmente ao meu lado mesmo nos momentos em que eu queria ficar só. Obrigada por ser o que é, por ser do jeito que é e por continuar ao meu lado incansavelmente apesar do que sou.

Aos meus irmãos, **Vivianny, Vinícius e Hayanne**, também filhos meus, minhas jóias, a maior preciosidade que existe nos meus dias. Com quem aprendi a andar lado a lado, pulando os obstáculos e tentando preencher alguns vazios. A vocês, meu sincero, gratuito e consistente amor. Não nos percamos!

À tia **Marília** por ter me ajudado com o transporte nessa fase final. Sempre tão disposta, com um coração tão grandioso.

À minha orientadora, professora, amiga, mãe, diva e divã, **Fátima Ximenes**, que confiou no meu trabalho, soube compreender minhas dúvidas, medos e trapalhadas durante esses 8 anos de convivência. Alguém que me lapidou, que me ensinou calmamente a viver as etapas da academia, alguém que eu carrego com orgulho, apreço e um carinho indecifrável. A você muito mais do que um agradecimento.

À professora e também orientadora, **Selma Jerônimo**, minha chefinha, alguém que carrega a dureza de um diamante, mas assim como ele carrega também a beleza de ser límpida e transparente. Obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório, por ter custeado parte dos meus experimentos e por estar sempre por perto quando as coisas não iam tão bem. A você minha sincera admiração e respeito.

À **Daniella Martins**, minha flor, minha professora e orientadora. Alguém que divide o conhecimento, o colo, a amizade e que participou efetiva e afetivamente dessa jornada às vezes tão tortuosa, às vezes tão plana. A você o meu afeto, carinho e gratidão.

À todos do laboratório de Imunogenética, **Núbia, Glória, Olívia, Paula, Hênio, Eliene, Michelli, Bruna e Eliana Tomaz** pela agradável e prazerosa convivência durante todo esse tempo de convívio.

Ao meu amigão **Sérgio Fernandes**, amigo sempre tão presente. Sem sombra de dúvidas, depois do título, minha maior conquista no mestrado.

Aos meus meninos, **James, Léo, João Neto e Thiaguinho** pelos momentos de descontração.

À **Carlos Maia**, alguém que aprendi a respeitar e admirar, um poço de brutalidade e um mar de solidariedade e prontidão. Obrigada pela companhia, pelos ensinamentos, pelo seqüenciamento e principalmente por estar sempre disposto a ajudar.

À minha turma de mestrado, **Adriana** 'A brilhante', **Ana Celly**, **Daniele**, **Juliana**, **Lissandra**, **Ludovico**, **Micheline**, **Rodrigo**, **Pablo** e **Videanny** pela alegria e companhia dispensada nesses dois anos de convívio.

Ao professor **Maurício Pereira de Sales**, pela amizade, pelos cuidados e principalmente pelos laços construídos além dos corredores da bioquímica.

A **Gioconda** e **Ticiano**. Presentes de Deus na minha vida. Amigas de todas as horas, amigas mais chegadas que um irmão, amigas de sempre e para sempre. A vocês o meu mais belo sorriso e a minha mais verdadeira gargalhada. Pra vocês o que há de melhor em mim.

A **Cleusyvan** e **Maria Emília**, um só coração que ocupa dois corpos no espaço, pela amizade, atenção e companhia sagrada de cada final de semana.

A **Ana Celly**, **Aline** e **Sheyla**, amigas tão queridas, tão amadas, pessoas com quem eu dividi tudo que foi vivido nessa caminhada. Pessoas que aprendi a amar e respeitar. A vocês meu sincero agradecimento e meu mais caloroso abraço.

À **Lorena Candice**, pela energia, companheirismo e preocupação. Prova de que o tempo é ínfimo diante dos laços que existem entre nós.

À **Luiza Barros**, **Raquel Barbalho** e **Paula Rafaela** pelos momentos etílicos, nicotinados e sempre glamourosos.

A **Eduardo Henrique Cunha de Farias (Duda)** e **Roberta Melo**, pelos momentos de resgate no laboratório e pelos prazerosos momentos etílicos em Tabatinga ou em qualquer bar, momentos regados a muita música, vodkas e muita verdade. Sempre!

A **Raphael (Japa)** e **Breno Frias Dutra**, pela amizade verdadeira, pelos momentos inesquecíveis juntos e por mais essa oportunidade de recomeçar.

A **Shirley, Priscila** e **Nuara** pela amizade de décadas, que não cabe nas palavras.

À família **Salerno**, por ser a alegria dos meus domingos, por ter me acolhido e compreendido a minha ausência em nossas reuniões semanais.

A **Edson, Richele** e **Ana Lis** por compreenderem minha ausência.

À **Rodrigo Aquino**, pelos anos de convivência, pela ajuda, pelas caronas, pelos momentos de companheirismo e por tudo que ele tem me ensinado nos últimos meses.

A **Adeliana, Leonardo Pepino, Norba, Joelma, Kátya Anaya** e **Fabiano Texeira** meu sincero obrigada pelos momentos divididos, os alegres e os desesperadores.

A todos que fazem parte do **LQFPB**, minha terceira casa.

À **Jailma Almeida**, mais um anjo de Deus na minha vida, alguém que chega de mansinho e que no final faz uma diferença enorme. Obrigada pela formatação da tese e pela sua imensa habilidade com o Office 2007.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, **Dilma Lima, Fernanda Wanderley, Roberto Dimenstein, Carlos Bola, Edda Lisboa,**

**Hugo Alexandre, Luís Diz, Suely Chavante, João Felipe, Elizeu Antunes, Jacira Andrade e Luciana da Mata.**

A todos os funcionários do **Departamento de Bioquímica.**

A todos que fazem o **Laboratório de Entomologia.**

À **Edson Santana** pela ajuda nas coletas, por estar sempre disposto a ir a campo, independente das dificuldades.

À **Secretaria Municipal de Saúde de São Gonçalo do Amarante**, na pessoa de **Geane Benedito da Silva** – Programa de controle da leishmaniose visceral, pelas coletas realizadas nas localidades de São Gonçalo do Amarante.

Aos colegas de Laboratório da Entomologia, **Katrine, Vanessa, Gláucia, Rodrigo e Hilário.**

À **Caio César**, o IC mais querido e amável de todos os tempos.

À **CAPES**, Coordenação de Apoio a Pesquisa e Ensino Superior, pelo suporte financeiro.

*Somos uma temível mistura de ácidos nucléicos e lembranças,  
desejos e proteínas.  
O século que termina ocupou-se muito de ácidos nucléicos e proteínas.  
O seguinte vai concentrar-se sobre as lembranças e os desejos.  
Saberá ele resolver essas questões?  
Francois Jacob*

## RESUMO

As leishmanioses são doenças endêmicas em regiões do Velho e Novo Mundo causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. No Novo Mundo, a distribuição das diversas formas de leishmaniose é quase que inteiramente intertropical. No Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil, 85% da fauna flebotomínica capturada no Estado, corresponde a *Lutzomyia longipalpis* e sua distribuição se sobrepõe à distribuição da doença estando associada à presença de abrigos de animais domésticos. A exposição de pessoas a esses ambientes aumenta a probabilidade de infecção por diversas espécies de *Leishmania*. O estudo teve como objetivo avaliar a preferência alimentar de fêmeas do gênero *Lutzomyia* em condições laboratoriais, observar o ciclo biológico a diferentes temperaturas e identificar as principais fontes de repasto sanguíneo em áreas endêmicas de leishmaniose visceral na Grande Natal. Foram realizadas coletas nos municípios de São Gonçalo do Amarante e Nísia Floresta dos quais foram separados grupos de fêmeas para manutenção de colônia em laboratório e para avaliação da preferência alimentar em ambiente natural. As fêmeas apresentaram um percentual de preferência alimentar e taxa de oviposição de 97,0% para *Cavia porcellus* com oviposição de 19 ovos/fêmea; 97,0% para *Equus caballus*, com 19 ovos/fêmea; 98,0% para sangue humano, com 14 ovos/fêmea; 71,3% em *Didelphis albiventris*, com 8,4 ovos/fêmea; 73,0% em *Gallus gallus*, com 14 ovos/fêmea; 86,0% em *Canis familiaris*, com 10,3 ovos/fêmea; 81,4% em *Galea spixii*, com 26 ovos/fêmea; 36,0% em *Callithrix jachus*, com 15 ovos/fêmea; 42,8% para *Monodelphis domestica* com 0,0% de oviposição. As fêmeas não realizaram repasto sanguíneo em *Felis catus*. O ciclo de vida de flebotomíneos em laboratório é de 32-40 dias, com taxa de oviposição de aproximadamente 21-50 ovos/fêmea. Foi observado que a 32°C o ciclo biológico é de 31 dias, enquanto que a 28°C este aumenta para 50 dias e a 22°C para 79 dias. Com o aumento da temperatura para 35°C, os ovos não eclodiram, inviabilizando o curso do ciclo biológico. Foi coletado um total de 1.540 flebotomíneos, sendo 1310 machos e 230 fêmeas. A espécie mais encontrada foi *Lutzomyia longipalpis* com 86,0%, *Lutzomyia evandroi* 10,5%, *Lu. lenti* com 3,2% e *Lu. whitmani* com 0,3%. A relação entre macho e fêmea foi de aproximadamente 6 machos para 1 fêmea. 50,7% das fêmeas coletadas em Nísia Floresta realizaram repasto apenas em peba, 12,8% das fêmeas coletadas em São Gonçalo do Amarante realizaram repasto sanguíneo somente em humanos. Dentre as fêmeas coletadas em São Gonçalo do Amarante, 80 foram analisadas para a infectividade para o kDNA de *Leishmania* e 5% apresentaram amplificação para o kDNA de *Leishmania*. Fêmeas de *Lutzomyia* spp. apresentaram perfil alimentar oportunista. Os parâmetros comportamentais parecem ter uma maior influência na oviposição do que os níveis de proteínas totais encontrados no sangue dos hospedeiros. Uma maior viabilidade do ciclo de *Lu. longipalpis* foi observada a temperatura de 28°C. A elevação da temperatura reduziu a duração do ciclo biológico, sendo este possivelmente influenciado pela temperatura, fonte de repasto e umidade relativa do ar. *Lu. longipalpis* foi a espécie mais encontrada em ambiente intra e peridomiciliar. Em Nísia Floresta, os pebas foram a principal fonte de repasto sanguíneo de fêmeas *Lutzomyia* spp. No município de São Gonçalo do Amarante, os humanos foram a principal fonte de repasto em consequência das coletas terem sido realizadas no intradomicílio.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are endemic diseases widely spread in the New and Old World, caused by the flagellated protozoan *Leishmania*. In the New World, the distribution of different forms of leishmaniasis is mostly in tropical regions. In the State of Rio Grande do Norte, Northeast Brazil, 85% of the captured sand flies fauna is *Lutzomyia longipalpis*. The distribution of the sand fly vector in the state overlaps with the disease distribution, where the presence of sand flies is associated with presence of animals shelters. The aim of this study was to analyse the blood meal preference of sand flies vector from the genus *Lutzomyia* spp. in laboratory conditions, to verify the vector life cycle at different temperatures sets and to identify the main blood meal source in endemic areas for visceral leishmaniasis (VL) at peri-urban regions of Natal. Sand flies samples were collected from the municipalities of São Gonçalo do Amarante and Nísia Floresta where female sand flies were grouped for the colony maintenance in the laboratory and for the analysis of the preferred source of sand fly blood meal in natural environment. The prevalence of blood meal preference and oviposition for the females sand flies was 97% for *Cavia porcellus* with oviposition of 19 eggs/female; 97% for *Equus caballus* with 19 eggs/female; 98% for human blood with 14 eggs/female; 71.3% for *Didelphis albiventris* with 8.4 eggs/female; 73% for *Gallus gallus* with 14 eggs/female; 86% for *Canis familiaris* with 10.3 eggs/female; 81.4% for *Galea spixii* with 26 eggs/female; 36% for *Callithrix jachus* with 15 eggs/female; 42.8% for *Monodelphis domestica* with 0% of oviposition. Female sand flies did not take a blood meal from *Felis catus*. Sand flies life cycle ranged from 32-40 days, with 21-50 oviposition rates approximately. This study also showed that at 32°C the life cycle had 31 days, at 28°C it had 50 days and at 22°C it increased to 79 days. Adjusting the temperature to 35°C the eggs did not hatch, thus blocking the life cycle. A total of 1540 sand flies were captured, among them, 1.310 were male and 230 were female. Whereas 86% of the sand flies captured were *Lu. longipalpis* as compared to 10.5% for *Lu. evandroi* and, 3.2% for *L. lenti* and 0.3% for *Lu. whitmani*. The ratio between female and male sandfly was approximately 6 males to 1 female. In Nísia Floresta, 50.7% of the collected females took their blood meal from armadillo, 12.8% from human. Among the female sand flies captured in São Gonçalo do Amarante, 80 of them were tested for the *Leishmania* KDNA infectivity where 5% of them were infected with *Leishmania chagasi*. Female *Lutzomyia* spp. showed to have an opportunistic blood meal characteristic. The behavioral parameters seem to have a higher influence in the oviposition when compared to the level of total proteins detected in the host's bloodstream. A higher *Lu. longipalpis* life cycle viability was observed at 28°C. The increase of temperature dropped the life cycle time, which means that the life cycle is modified by temperature range, source of blood meal and humidity. *Lu. longipalpis* was the most species found in the inner and peridomiciliar environment. In Nísia Floresta, armadillos were the main source of blood meal for *Lutzomyia* spp. At São Gonçalo do Amarante, humans were the main source of blood meal due to CDC nets placed inside their houses

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	19
Figura 2 - Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> .....	20
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	21
Figura 4 - Manifestações clínicas das leishmanioses .....	23
Figura 5 - Distribuição mundial da leishmaniose cutânea.....	25
Figura 6 - Distribuição mundial da leishmaniose visceral.....	26
Figura 7 - Macho de flebotomíneo.....	30
Figura 8 - Fêmea de flebotomíneo.....	30
Figura 9 - Região metropolitana de Natal.....	36
Figura 10 - Armadilha CDC.....	37
Figura 11 - Disposição das armadilhas em Nísia Floresta.....	38
Figura 12 - Duração do ciclo biológicos de <i>Lu. longipalpis</i> a diferentes temperaturas.....	45
Figura 13 - Abundância de flebotomíneos machos em São Gonçalo do Amarante.....	46
Figura 14 - Abundância de flebotomíneos machos em Nísia Floresta.....	47
Figura 15 - Géis controle.....	48
Figura 16 - Amplificações do gene do <i>cyt b</i> de <i>Euphractus sexcintus</i> em fêmeas <i>Lutzomyia</i> .....	49
Figura 17 - Amplificações do gene do <i>cyt b</i> de <i>Homo sapiens</i> em fêmeas <i>Lutzomyia</i> .....	49

Figura 18 - Alinhamento entre as sequências nucleotídicas de <i>Homo sapiens</i> .....	50
Figura 19 - Alinhamento entre as sequências nucleotídicas de <i>Euphractus sexcintus</i> .....	50
Figura 20 - Amplificação de kDNA de Leishmania em fêmeas Lutzomyia.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de primers para gene do citocromo b. ....	40
Tabela 2 - Preferência alimentar de <i>Lu. longipalpis</i> alimentadas em diferentes animais. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	Basic local alignment search tool
CDC	Control Disease Center
DCL	Leishmaniose cutâneo-difusa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
LV	Leishmaniose visceral
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase

## INDÍCE

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Considerações gerais.....	19
1.2 Manifestações clínicas das Leishmanioses.....	22
1.3 Epidemiologia.....	25
1.4 Mudanças climáticas e ocorrência das leishmanioses.....	28
1.5 Vetores e reservatórios de <i>Leishmania</i> .....	29
1.6 Métodos de identificação do repasto sanguíneo em flebotomíneos.....	33
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivos específicos.....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 Caracterização da área de estudo.....	36
3.2 Captura de flebotomíneos.....	36
3.3 Triagem, identificação e conservação de flebotomíneos.....	38
3.4 Grupo de fêmeas para manutenção da colônia em laboratório.....	38
3.4.1 Preferência alimentar de fêmeas <i>Lu. longipalpis</i> geradas em laboratório.....	39
3.5 Grupos de fêmeas submetidos a diferentes temperaturas.....	39
3.6 Grupo de fêmeas para realização da PCR.....	40
3.6.1 Desenhos dos oligonucleotídeos.....	40
3.6.2 Extração de DNA.....	41
3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	41
3.6.4 Sequenciamento.....	42

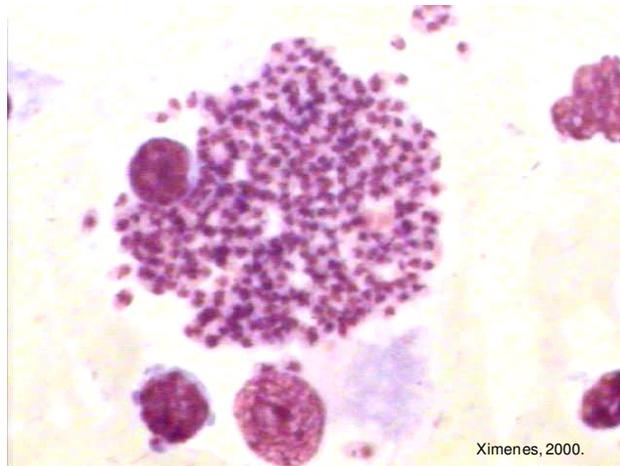
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Preferência alimentar de <i>Lu. longipalpis</i> em animais anestesiados e taxa de oviposição.....	43
4.2 Ciclo biológico de <i>Lu. longipalpis</i> em laboratório a diferentes temperaturas.....	44
4.3 Abundância e diversidade das espécies de flebotomíneos .....	45
4.4 Identificação das fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos.....	47
4.5 Prevalência de infecção por <i>Leishmania chagasi</i> em fêmeas coletadas em área endêmica para leishmaniose visceral.....	51
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações gerais

As leishmanioses são doenças endêmicas em regiões do Velho e Novo Mundo causadas por protozoários flagelados pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Leishman, 1994). O gênero *Leishmania* compreende aproximadamente 30 espécies, das quais cerca de 20 são patogênicas para a espécie humana (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). As formas clínicas de apresentação destas doenças variam do acometimento de pele e mucosas até doença visceral (Salotra; Singh, 2005) e constituem um grave problema de saúde pública em muitos países.

No seu ciclo de vida, a leishmania apresenta duas formas básicas, a forma amastigota e a promastigota. As amastigotas apresentam forma oval, ou esférica, intracelulares obrigatórias e parasitam vacúolos lisossomais de macrófagos de hospedeiros vertebrados (Figura 01) (Alexander; Satoskar; Russell, 1999; Chang; Chaudhuri; Fong, 1990; Lainson; Ryan; Shaw, 1987). A forma promastigota é flagelar veja se a palavra mais usada é flagelada, extracelular, encontrada livre no trato digestivo do inseto ou aderida às microvilosidades da cutícula intestinal (Figura 02) (Killick-Kendrick, 1990; Walters *et al.*, 1989a; Walters *et al.*, 1989b).



**Figura 1 - Formas amastigostas de *Leishmania* infectando macrófagos (1000x).**



**Figura 2 - Formas promastigotas de *Leishmania* (1000x).**

A transmissão do protozoário ocorre quando a fêmea hematófaga realiza repasto sanguíneo em animais infectados com o parasito e juntamente com o sangue ingere as formas amastigotas do protozoário. Após o repasto sanguíneo, o parasito passa por uma série de modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais no interior do trato digestivo do inseto (Killick-Kendrick, 1990; Walters, *et al.*, 1989a; Walters, *et al.*, 1989b). Essas modificações são determinantes para a sobrevivência do parasito em um meio totalmente distinto do existente no interior do macrófago (Sacks, 1989). Uma vez no trato digestivo do invertebrado, o protozoário assume sua forma promastigota, diferenciando-se em promastigota procíclica, evitando a expulsão do parasita do intestino médio do vetor. Seqüencialmente, o parasita assume sua forma promastigota metacíclica infectante, estágio em que migra para as peças bucais do inseto e se torna capaz de infectar diversos outros hospedeiros no próximo repasto do vetor (Figura 3).

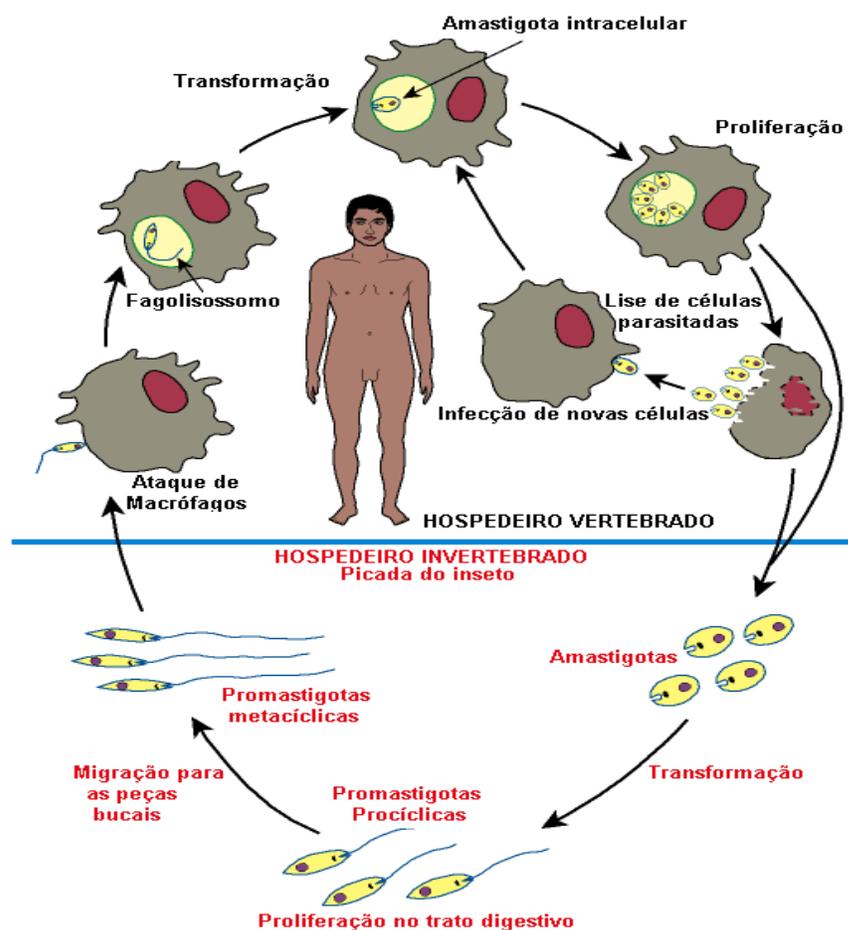


Figura 3 - Ciclo biológico de *Leishmania*

adaptado do site <http://www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html>

Durante a picada, a fêmea introduz suas peças bucais na pele do hospedeiro vertebrado, causa traumas e laceração de pequenos vasos e pequenas hemorragias locais (Ribeiro, 1987). A picada do inseto exerce na pele uma ação mecânica e enzimática por meio da probóscida e da saliva do inseto (Charlab *et al.*, 1999), ativando no local da picada mecanismos da resposta inata do hospedeiro (Gillespie; Mbow; Titus, 2000; Ribeiro, 1987). Os determinantes envolvidos na infecção por *Leishmania* resulta em susceptibilidade ou resistência do hospedeiro, estes determinantes dependem de padrões distintos de resposta imune, proveniente da modulação por componentes da saliva do inseto, proteínas da superfície do parasito, como glicoproteínas de 63 kDa e lipofosfoglicanos (Sacks;

Perkins, 1985) indicando que existem interações dinâmicas entre o vetor, o parasita e seus animais reservatórios (De Almeida *et al.*, 2003).

A hematofagia confere aos insetos vetores uma importância médico-veterinária associada à transmissão de vírus, bactérias e protozoários (Arias *et al.*, 1985; Young, 1994). No entanto, sua maior importância decorre da transmissão de protozoários do gênero *Leishmania*. O comportamento e os hábitos alimentares desses insetos têm sido ponto de grande relevância para compreensão ecológica e epidemiológica dos padrões de transmissão da doença.

### **1.2 Manifestações clínicas das Leishmanioses**

As leishmanioses são caracterizadas por um espectro de manifestações clínicas, representando assim um complexo de doenças. O gênero *Leishmania* compreende aproximadamente 30 espécies, dentre essas, 20 espécies são patogênicas para humanos (Ashford, 2000). As principais formas clínicas das leishmanioses são: leishmaniose cutânea (LC) (Figura 4A), cutâneo-mucosa (LCM) (Figura 4B), cutâneo-difusa (LCD) (Figura 4C), leishmaniose visceral (LV) ou calazar (Figura 4D) e a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) (Ashford, 2000; Desjeux, 2004).

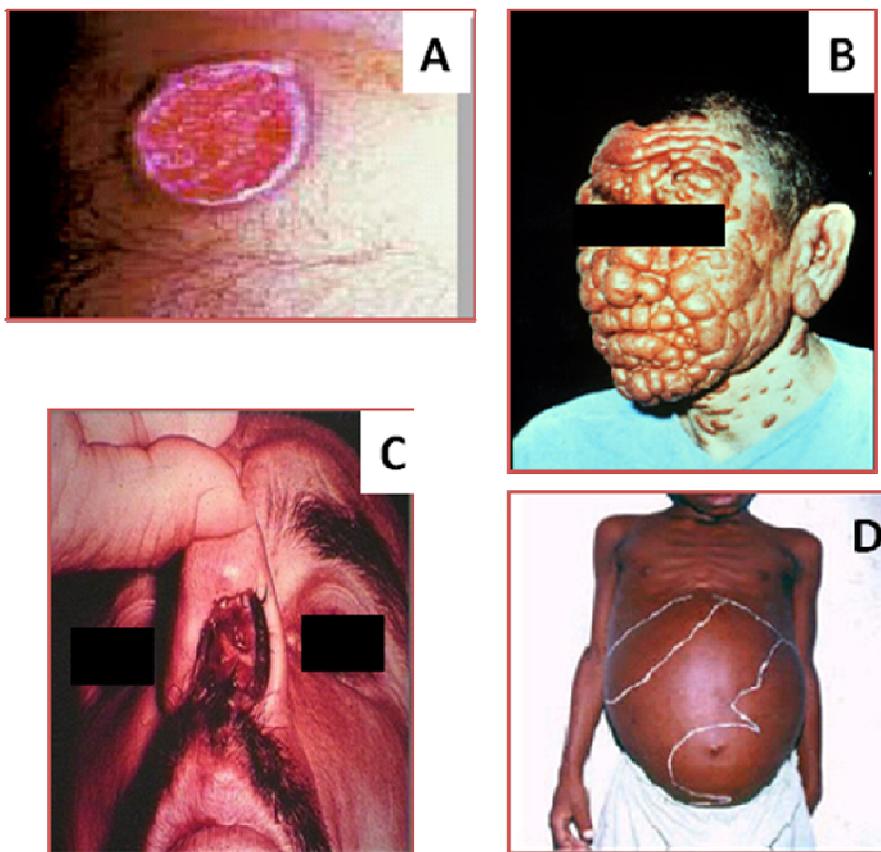


Figura 4 - Manifestações clínicas das Leishmanioses. melhor colocar a fonte

A leishmaniose cutânea surge como uma lesão no local da picada, podendo evoluir com lesões múltiplas ou únicas. Os principais agentes etiológicos da LC no Velho Mundo são: *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica*; no Novo Mundo a LC é causada por espécies do complexo *Leishmania (L.) mexicana* e do subgênero *Viannia* (*Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis*) (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). O período de incubação varia de 2 a 8 semanas, podendo apresentar intervalos maiores de incubação da doença (Ashford, 2000).

A leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), também conhecida como “espúndia”, semelhante à LC, acomete a pele e mucosas, podendo resultar em desfiguração e mutilações na face causadas pelo comprometimento do tecido cartilaginoso (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). No Velho Mundo, o principal agente etiológico da LCM é *Leishmania major*, nas Américas, é *Leishmania braziliensis* e aproximadamente 5% dos casos de LC causados por esta espécie evoluem para

---

LCM. O período de incubação da doença é de aproximadamente 1 a 3 meses, podendo também ocorrer anos após a ferida inicial (Ashford, 2000).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) apresenta-se normalmente como uma leishmaniose cutânea associada à deficiência na resposta imune mediada por células. As lesões podem se restringir a borda das orelhas, ou podem se distribuir por todo o corpo, as lesões apresentam um elevado número de parasitas. O principal agente etiológico da LCD é *Leishmania aethiopica* e *Leishmania amazonensis* (Ashford, 2000; Desjeux, 2004).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a forma mais severa e caracteriza-se por perda de peso, febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, linfadenopatia e anemia. A LV possui como agente etiológico espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. Geralmente acomete crianças abaixo dos 10 anos de idade e é fatal em 5 -10% mesmo com o tratamento específico, o óbito geralmente ocorre devido infecções secundárias. O período de incubação da infecção é de 3 a 14 meses (Ashford, 2000; Desjeux, 2004; Evans *et al.*, 1992). No Brasil a LV é causada por *Leishmania infantum chagasi*.

A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é uma manifestação cutânea após a infecção por leishmaniose visceral, caracterizada por lesões na pele, nódulos ou pápulas, geralmente se desenvolve de 2 – 7 anos após a infecção por LV. No Sudão e na Índia, aproximadamente 10% dos casos tratados para LV evoluem para LDPC. A presença de intenso infiltrado de *Leishmania* nestas lesões cutâneas tem um impacto na transmissão do parasito, uma vez que estes indivíduos podem funcionar como importantes reservatórios do parasito, além de contribuir na manutenção do ciclo epidemiológico nessas localidades. A LDPC possui como agente etiológico, espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (Ashford, 2000; Desjeux, 2004) e embora não seja comum em pacientes com LV, na América Central foi observado envolvimento cutâneo inicial causado por *Leishmania chagasi* (Ponce *et al.*, 1991).

### 1.3 Epidemiologia

Em âmbito mundial, as leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, ocorrendo em mais de 100 países de clima tropical e subtropical. O sul da Europa, norte da África, o Oriente, América Central e América do Sul são consideradas áreas endêmicas para as leishmanioses (Ashford, 2000). A forma cutânea da doença perfaz um total de 90% dos casos em países como Afeganistão, Paquistão, Síria, Sudão, Arábia Saudita, Algéria, Irã, Peru e Brasil (Figura 05) (Desjeux, 2004). No Novo Mundo, a distribuição das diversas formas de leishmaniose é quase que inteiramente intertropical (WHO, 2001).

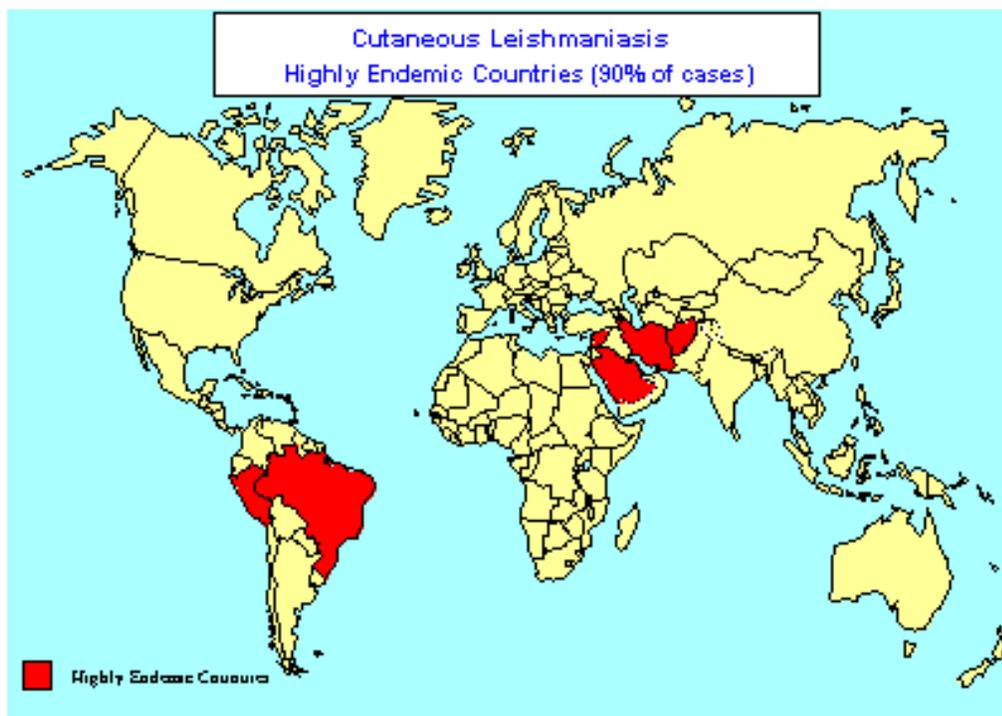
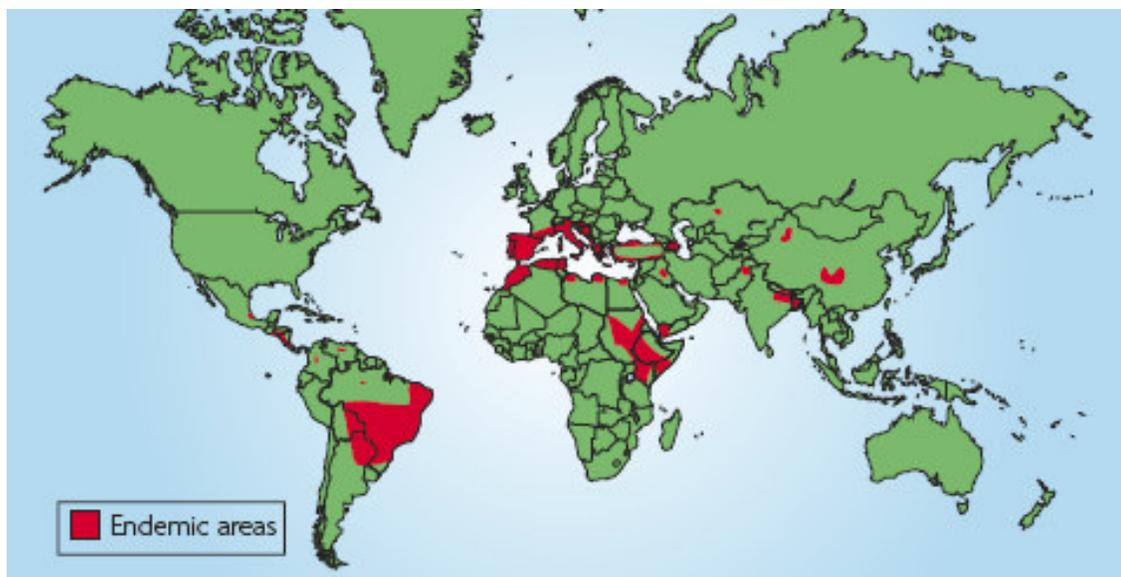


Figura 5 - Distribuição mundial da leishmaniose cutânea.

A forma visceral é endêmica em 65 países, com um total estimado de 350 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção e com 90% dos casos ocorrendo na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Desjeux, 2004). Apesar da LV ser uma doença mais prevalente na Índia, na América Latina ela é amplamente distribuída, se estendendo desde norte do México ao sul da Argentina e, no Brasil apresenta-se como um grave problema epidemiológico (Figura 06) (Grimaldi; Tesh;

McMahon-Pratt, 1989; Lainson; Rangel, 2005). Em virtude da expansão geográfica da doença a Organização Mundial da Saúde passou a considerar a LV uma das doenças prioritárias entre as endemias tropicais (WHO, 2001).



**Figura 6 - Distribuição mundial da leishmaniose visceral.**

Os primeiros casos de LV no Brasil foram notificados em 1934 no Nordeste (Alencar *et al.*, 1974; Deane; Deane, 1954) e estudos realizados posteriormente por Evandro Chagas constataram que o principal agente etiológico da LV é *Leishmania infantum chagasi*. Inicialmente, a ocorrência da doença estava associada à pobreza e habitações inapropriadas em áreas rurais do Nordeste, no entanto, nos últimos 20 anos, ocorreram modificações drásticas na distribuição geográfica da LV no Brasil. A migração massiva de pessoas das áreas rurais para a periferia de grandes cidades e a habitação inapropriada dessas áreas (Jeronimo *et al.*, 2004; Jeronimo, *et al.*, 1994) atrelada as modificações ambientais, destruição de habitats, mudanças demográficas, conseqüências das ações humanas, associados a outros fatores certamente têm colaborado para a modificação no cenário epidemiológico da doença, estreitando dessa forma, relações entre hospedeiros intermediários e definitivos, vetores e agentes etiológicos, determinando mudanças nos níveis endêmicos ou epidêmicos de doenças infecciosas (Ambroise-Thomas, 2000; Curtis; Cairncross; Yonli, 2000; Patz *et al.*, 2000), explicando dessa forma, como a transmissão da *L. i. chagasi*, inicialmente restrita às áreas rurais, passou a ocorrer

---

de forma endêmica e epidêmica na periferia dos grandes centros do nordeste brasileiro (Costa; Pereira; Araujo, 1990; Mendes Wda *et al.*, 2002).

O resultado das ações antrópicas associadas às mudanças nos padrões de distribuição das leishmanioses têm favorecido relações de co-infecção, como é o caso da *Leishmania* e infecção por HIV (Cruz *et al.*, 2006). A co-infecção por HIV é um fator de risco elevado para desenvolvimento de formas graves de leishmanioses, com variabilidade de resposta à terapia padrão (Desjeux, 2004). Indivíduos infectados por HIV são altamente susceptíveis a infecção por *Leishmania* e, em pacientes soropositivos as leishmanioses aceleram o desenvolvimento da síndrome devido à imunossupressão e estimulação da replicação do vírus, e por apresentar alta parasitemia (Salotra; Singh, 2005).

De forma geral, a leishmaniose visceral humana apresenta surtos epidêmicos de 7 a 10 anos (Arias; Monteiro; Zicker, 1996; Jeronimo, *et al.*, 2004) e esse padrão cíclico de ocorrência de surtos, provavelmente, reflete, em parte, a resposta do vetor às mudanças ambientais (Franke *et al.*, 2002), e também pode está relacionado com a queda na imunidade da comunidade '*herd immunity*' (Basu; Mallik, 1995), uma vez que, a exposição de indivíduos de uma população a patógenos acarreta na imunização desses indivíduos e, quanto maior o número de indivíduos imunizados menor a probabilidade de um indivíduo susceptível entrar em contato com o patógeno circulante. A periodicidade dos casos de LV no nordeste do Brasil, além de estar associada à migração humana pode resultar da influência de eventos climáticos como é o caso do evento El Niño, evento que causa uma forte flutuação climática caracterizada pelo aquecimento irregular em larga escala das águas do Oceano Pacífico, ocorrendo de 3 a 4 anos, causando seca e escassez de alimentos, além disso este evento tem sido fortemente associado a um aumento de transmissão de doenças causadas por insetos vetores em todo o mundo (Franke, *et al.*, 2002).

Em 1984, foi estimado que 90% dos casos de LV no Novo Mundo eram oriundos do Brasil (Lainson; Rangel, 2005; Vieira; Lacerda; Marsden, 1990). De 1980 a 2005 um total de 60.969 casos de LV foi notificado no país, sendo distribuído em 7,03% na Região Norte; 82,32% no Nordeste; 7,59% no Sudeste; 3,04% no Centro-Oeste e nenhum caso foi notificado na Região Sul (Ministério Da Saúde, 2006). Na década de 90, os estados do Pará e Tocantins (Norte), Mato

Grosso do Sul (Centro Oeste), Minas Gerais e São Paulo (Sudeste) passaram a influir de maneira significativa no quadro epidemiológico da leishmaniose visceral no Brasil (Funasa, 2001).

No Rio Grande do Norte o primeiro surto urbano de LV ocorreu entre os anos de 1989 – 1992, recentemente a LV tem apresentado um perfil emergente de distribuição do parasito em áreas periurbanas (Jeronimo, *et al.*, 2004; Jeronimo, *et al.*, 1994). No Estado, a expansão da doença teve início em 1983 atingindo 28 municípios, aumentando para 40 em 1994 e para 133, dos 166 municípios estaduais em 2000 (Funasa, 1994; Sesap, 1997). Em Natal, a distribuição espacial dos casos de leishmaniose visceral mostra que aproximadamente 70% dos casos foram notificados no litoral oriental, área mais úmida do RN, e os demais distribuídos nas outras zonas estaduais (Ximenes M de *et al.*, 2007). A maior prevalência é observada entre crianças com idade inferior a 10 anos atingindo uma taxa de mortalidade entre 5 e 10% (Jeronimo, *et al.*, 2004).

#### **1.4 Mudanças climáticas e ocorrência das leishmanioses**

A distribuição e incidência de doenças infecciosas transmitidas por insetos são diretamente afetadas por determinantes climáticos e ambientais. Fatores como clima, geografia e sazonalidade influenciam diretamente na replicação de patógenos, aumento na densidade populacional de vetores e animais reservatórios, contribuindo assim na emergência de doenças transmitidas por insetos vetores (Cazelles; Hales, 2006). A dinâmica populacional de espécies tropicais difere das observadas em espécies temperadas, onde variações cíclicas na densidade populacional de vetores refletem estratégias de sobrevivência do vetor em resposta as variações climáticas. No Brasil, surtos epidêmicos de leishmaniose visceral humana ocorrem a cada 10 anos (Jeronimo, *et al.*, 2004; Momen, 1998), este padrão cíclico reflete a resposta do vetor as mudanças ambientais (Franke, *et al.*, 2002) e suas interações com animais hospedeiros e humanos susceptíveis. Dentre os diversos fatores ecológicos, o clima parece ser fator crítico na distribuição de espécies de *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Cardenas; Gonzalez-Serva; Cohen, 2004). Estudos têm indicado mudanças na distribuição

geográfica de flebotomíneos em consequência da variabilidade climática de determinadas áreas, na Ásia a expansão de *Phlebotomus papatasi* tem sido diretamente associada ao aquecimento global (Cross; Hyams, 1996; Cross; Newcomb; Tucker, 1996). Alguns estudos têm apresentado fortes evidências da relação entre El Niño e aumento do número de casos de doenças transmitidas por insetos vetores em todo o mundo (Kovats, 2000; Nicholls, 1993), na Colômbia a variabilidade climática em consequência do El Niño apresenta alta influência sobre os casos de leishmaniose na região (Cardenas *et al.*, 2006). No Estado da Bahia, foi observado um aumento de aproximadamente 35% na incidência dos casos de LV em períodos pós El Niño nos anos de 1989 e 1995 (Franke, *et al.*, 2002).

### **1.5 Vetores e reservatórios de *Leishmania*.**

Os insetos transmissores das leishmanioses são insetos holometábolos, diminutos, bastante pilosos, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, única responsável pela transmissão de *Leishmania* (Barreto, 1955; Vianna-Martins, 1978). São popularmente conhecidos como flebótomo, birigui, tatuquira, asa dura, orelha de veado, mosquito palha e cangalhinha. Geralmente são encontrados em locais úmidos e escuros com temperaturas moderadas.

O gênero *Phlebotomus* hospeda espécies de *Leishmania* do Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia* espécies do Novo Mundo (Killick-Kendrick, 1990; Lainson; Ryan; Shaw, 1987).

Os flebotomíneos possuem aparelho bucal do tipo picador-sugador e ambos os sexos utilizam basicamente carboidratos como sua principal fonte de energia, que adquirem na natureza a partir da seiva de plantas, néctar (Alexander; Usma, 1994), excreções de afídeos e frutas maduras (Cameron *et al.*, 1995a; Cameron *et al.*, 1995b). Para as fêmeas, esses carboidratos são utilizados como complementação na alimentação sanguínea. As fêmeas são hematófagas e necessitam das proteínas presentes no sangue para maturação de seus ovários (Forattini *et al.*, 1976). Os machos distinguem-se das fêmeas por possuírem

terminália formada por três pares de apêndices (Figura 07), enquanto a fêmea apresenta abdome curvo para baixo (Figura 08).



**Figura 7 - Macho de flebotomíneo.**



**Figura 8 - Fêmea de flebotomíneo.**

A distribuição geográfica das espécies de *Lutzomyia* é influenciada por barreiras físicas, precipitação pluviométrica, vegetação, luminosidade e abundância de hospedeiros vertebrados (Arias, *et al.*, 1985). Sabe-se ainda que a presença de animais influencia na densidade dos flebotomíneos dentro ou próximo à habitações humanas e, conseqüentemente, aumenta os riscos de transmissão de espécies de

*Leishmania* para humanos (Ximenes; Souza; Castellon, 1999). Alguns estudos têm mostrado que a agregação de flebotomíneos em ambiente peridomiciliar está relacionada com a liberação de feromônios pelos insetos e cairomônios pelos hospedeiros (Dougherty; Hamilton; Ward, 1993; Quinnell; Dye, 1994).

*Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 é a principal espécie envolvida na transmissão da LV nas Américas, tem ampla distribuição desde o México até a América do Sul (Lainson; Shaw, 1978; Lanzaro *et al.*, 1993), embora seu padrão de distribuição e abundância varie de região para região dependendo das características ambientais e sazonalidade. Observações feitas na região Amazônica brasileira indicaram que *Lu. longipalpis* é uma espécie silvestre, entretanto estudos feitos no Nordeste do país mostraram um alto grau de adaptação desta espécie ao peridomicílio (Lainson; Rangel, 2005).

O comportamento eclético, oportunista e também antropofílico de *Lu. longipalpis*, tem propiciado diversos estudos sobre seu comportamento alimentar (Christensen *et al.*, 1982; Tesh *et al.*, 1971), e os dados obtidos têm norteado investigações quanto à preferência alimentar desses dípteros e conseqüentemente a compreensão de aspectos epidemiológicos da doença.

No Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil, 85% da fauna flebotomínica capturada corresponde a *Lu. longipalpis*, e a distribuição do vetor se sobrepõe a distribuição da doença (Ximenes *et al.*, 2000). A densidade de flebotomíneos está associada às precárias condições de higiene encontradas em ambiente peridomiciliar e também à presença de abrigos de animais domésticos, como galinhas, cães, porcos e cavalos no peridomicílio (Ximenes; Souza; Castellon, 1999). A abundância de *Lu. longipalpis* nas áreas peri-urbanas do litoral oriental, incluindo áreas da Grande Natal, sugere um acentuado grau de adaptação dessa espécie às áreas sob influência antrópica (Ximenes Mde, *et al.*, 2007). Além disso, a presença de animais em áreas peridomiciliares combinado às precárias condições de higiene, e aos elevados índices de umidade e temperatura, cria um hábitat favorável à agregação de *Lu. longipalpis* e outros flebotomíneos, contribuindo para o aumento da densidade populacional dos vetores das leishmanioses em áreas periféricas do Rio Grande do Norte, aumentando assim o risco de transmissão de *Leishmania chagasi* (Ximenes; Souza; Castellon, 1999).

Os cães e as raposas são considerados os principais reservatórios de *Leishmania* (Lainson; Shaw; Lins, 1969). No sudeste do país, *Lu. migonei* e *Lu.*

*whitmani* tem apresentado padrões diferentes de preferência alimentar (Teodoro *et al.*, 1993) e na Bahia, a flutuação de *Lu. longipalpis* e novos casos de leishmaniose visceral foram associados à presença do marsupial *Didelphis albiventris* em áreas do peridomicílio (Sherlock, 1996). Embora os cães domésticos sejam considerados os principais reservatórios na leishmaniose visceral, muitos trabalhos ainda são realizados na Índia, China, Mediterrâneo, África Central e Américas no sentido de determinar o verdadeiro papel desse vertebrado na cadeia epidemiológica da doença. Os principais animais encontrados como reservatórios do protozoário variam de região para região, ora compreendendo animais domésticos, ora silvestres ou, ainda, ambos servindo de fonte de repasto sanguíneo para as fêmeas. Estudos realizados no Rio Grande do Norte mostraram que abrigos de alguns animais têm servido com local de reprodução e repouso para diversas espécies de *Lutzomyia* e que dentre os animais presentes no peridomicílio, os cavalos e as galinhas exerceram uma maior atração sob os flebotomíneos, embora estes não sejam apontados como reservatórios de leishmanias são importantes mantenedores das populações vetoras, pois servem de atrativo para machos e fêmeas *Lu. longipalpis*, atuando como elo entre animais domésticos e sinantrópicos em ambiente peridomiciliar, além disso o potencial reprodutivo destes insetos depende diretamente da fonte de sangue utilizada para repasto (Alexander *et al.*, 2002; Ximenes; Souza; Castellon, 1999). Roedores da espécie *Galea spixii* são abundantemente encontrados no Estado e em virtude de sua boa adaptação às inóspitas condições do semi-árido nordestino, são também considerados importantes fonte de proteína animal para populações rurícolas, especialmente nos períodos de escassez pluviométrica (Pinheiro, 1989), sendo comumente encontrados próximos às residências em propriedades rurais e periferias das cidades interioranas. Estudos realizados no RN a partir da infecção experimental de preás – *Galea spixii* mostrou que esses animais são resistentes à infecção por *L. infantum chagasi* sendo capazes de manter a infecção estável sem alterações dos parâmetros bioquímicos hematológicos. Embora esses animais não sejam bons modelos para o estudo da leishmaniose visceral, podem atuar como fontes de repasto para flebotomíneos em áreas endêmicas do RN (Barbosa, 2005).

## 1.6 Métodos de identificação do repasto sanguíneo em flebotomíneos

Para compreensão epidemiológica dos padrões de transmissão de doenças causadas por insetos vetores é necessário inicialmente reunir dados acerca da ecologia, biologia, etologia, avaliar hábitos e preferências alimentares, definindo o grau de antropofilia desses vetores. Animais silvestres como as raposas (*Cerdocyon thous*), o timbu (*Didelphis albiventris*) e o rato preto (*Rattus rattus*), são comumente encontrados freqüentando o peridomicílio, atuando como animais sinantrópicos e potenciais reservatórios de *Leishmania* (Sherlock, 1996). A presença desses animais sejam eles domésticos e/ou sinantrópicos são fatores decisivos na manutenção da leishmaniose visceral em áreas periurbanas (Dias Fde; Lorosa; Rebelo, 2003). Para auxiliar na compreensão do papel desses animais na cadeia epidemiológica, técnicas imunológicas e de biologia molecular têm sido utilizadas na identificação do conteúdo intestinal de flebotomíneos e têm acrescentado informações importantes na compreensão da epidemiologia e comportamento alimentar auxiliando assim na indicação de potenciais reservatórios da infecção (Dias Fde; Lorosa; Rebelo, 2003). Desde início do século XX, técnicas imunológicas têm sido empregadas na detecção de sangue ingerido por artrópodes e têm sido adaptadas para auxiliar na determinação da fonte alimentar utilizada por diferentes insetos (King, 1923). Procedimentos sorológicos para identificação de repasto sanguíneo em artrópodes têm sido baseados na detecção de antígenos do hospedeiro por fixação do complemento (Pant, 1987; Staak *et al.*, 1981) ou por ensaios imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assays), utilizando anticorpos policlonais contra componentes dos soros de possíveis hospedeiros (Chow; Wirtz; Scott, 1993). Embora os métodos sorológicos possibilitem resultados avaliáveis, essas técnicas apresentam dificuldades inerentes à necessidade de produção de anti-soros de alta qualidade para todas as espécies de vertebrados inclusas no ensaio (Rurangirwa *et al.*, 1986), produção de anticorpos altamente específicos a fim de eliminar as reações cruzadas de proteínas do soro de espécies próximas; e perda da qualidade do sangue devido à degradação parcial dos produtos pelo tempo de digestão (Kent; Norris, 2005).

A introdução de ferramentas de biologia molecular na identificação do repasto sanguíneo de insetos tem eliminado grandes obstáculos quando comparado

aos testes imunológicos. A identificação do repasto sanguíneo em insetos baseado na identificação do DNA proveniente do sangue ingerido, é uma alternativa conveniente e confiável, uma vez que permite avaliar o perfil alimentar individual de cada inseto. O DNA mitocondrial tem sido utilizado em estudos evolucionários (Kocher *et al.*, 1989), na identificação de espécies (Bataille *et al.*, 1999), detecção de DNA de mamíferos (Tobolewski *et al.*, 1992), identificação de repasto sanguíneo em insetos (Matsunaga, 1998) e também tem servido como marcador para diagnóstico molecular (Boakye *et al.*, 1999; Irwin; Kocher; Wilson, 1991; Ngo; Kramer, 2003). A utilização do material genético mitocondrial é preferível quando comparado ao DNA genômico, por apresentar várias cópias e com grau de polimorfismo limitado (Mukabana; Takken; Knols, 2002).

Diante do exposto e em virtude do processo de expansão das áreas endêmicas de leishmanioses, o presente estudo almejou avaliar a influência da temperatura no ciclo biológico de *Lutzomyia* spp., identificar possíveis fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos capturados em ambiente peridomiciliar, objetivando compreender as relações estabelecidas entre os flebotomíneos e outros animais hospedeiros de *Leishmania* e conseqüentemente fornecer subsídios às ações de controle da doença no Estado.

---

## 2 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a preferência alimentar de fêmeas do gênero *Lutzomyia* em condições experimentais, acompanhar o ciclo biológico a diferentes temperaturas e identificar as principais fontes de alimentação sanguínea dessas fêmeas em áreas endêmicas de LV na região metropolitana de Natal.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a preferência alimentar de fêmeas *Lutzomyia* diante de fontes diversas de repasto, em laboratório.
2. Avaliar a influência do sangue de diferentes animais na taxa de oviposição desses insetos.
3. Avaliar a influência da temperatura no ciclo biológico de fêmeas *Lutzomyia*.
4. Identificar as espécies de *Lutzomyia* presentes no peridomicílio dos municípios de Nísia Floresta e São Gonçalo do Amarante, área da Grande Natal, RN.
5. Identificar as fontes principais de repasto sanguíneo de fêmeas *Lutzomyia*, em áreas endêmicas para LV, utilizando como marcador molecular o gene do citocromo b das espécies comumente expostas ao vetor: *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Gallus gallus*, *Equus caballus* e *Euphractus sexcintus*.
6. Analisar a prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* em fêmeas *Lutzomyia* capturadas em áreas endêmicas para leishmaniose visceral.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização da Área de Estudo

A região metropolitana de Natal é constituída por oito municípios, compreendendo Natal, Parnamirim, São Gonçalo do Amarante, Ceará-Mirim, Macaíba, Extremoz, Nísia Floresta e São José do Mipibu (Figura 09).

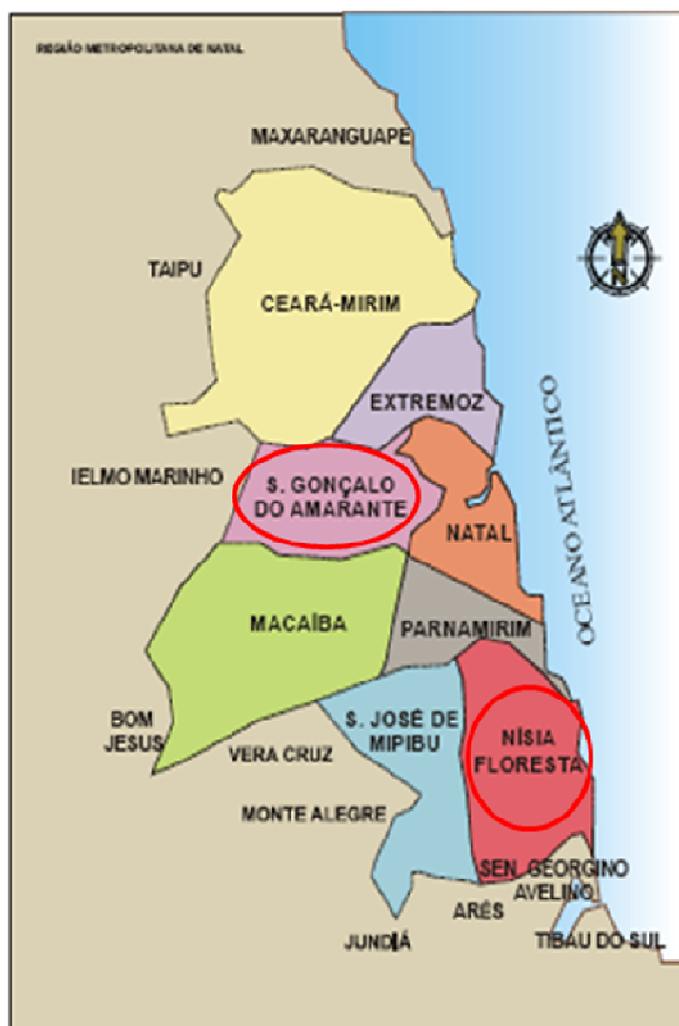


Figura 9 - Região Metropolitana de Natal.

Essa região ocupa uma superfície de 2.511,80 Km<sup>2</sup>, cobrindo 4,7% do território estadual, contando com uma população em 2000 de 1.097.273 habitantes que corresponde a 39,5% da população do Estado. A região metropolitana de Natal cresceu, entre 1991 e 2000; 2,6% ao ano (IBGE, 2000).

### 3.2 Captura de flebotomíneos

Foram realizadas coletas em áreas da região metropolitana, de fevereiro a junho durante os anos 2006 e 2007, nos municípios de Nísia Floresta e São Gonçalo do Amarante.

Para captura dos insetos foram utilizados capturadores manuais e armadilhas luminosas do tipo CDC (Control Disease Center), instaladas em áreas extra e peridomiciliares (Figura 10) entre as 17h30min e 18h00 e retiradas às 06h00 do dia seguinte.



Figura 10 - Armadilha do tipo CDC, em ambiente extradomiciliar.

Em Nísia Floresta, as armadilhas foram colocadas em área peridomiciliar (Figura 11), próximas a abrigos de animais como: cão, cavalo, jumentos, galinhas,

pebas, além da presença de humanos. Em São Gonçalo do Amarante, as capturas foram feitas manualmente utilizando capturadores de Castro no intradomicílio.

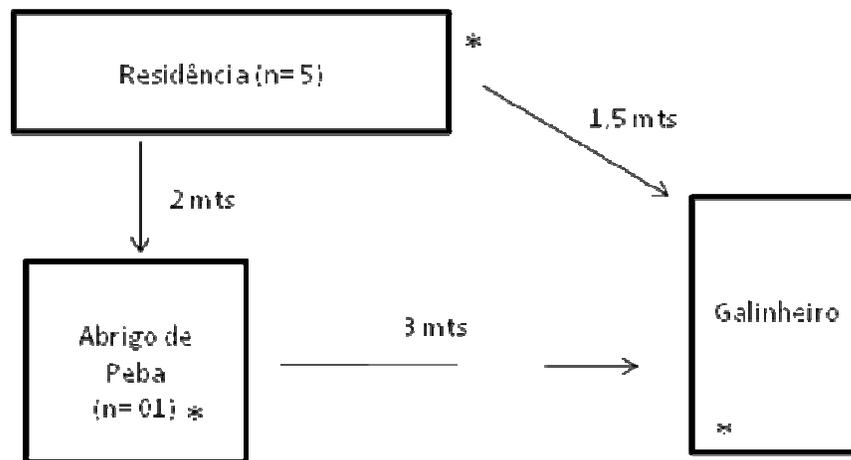


Figura 11 - Disposição das armadilhas (\*) no peridomicílio em Nísia Floresta.

### 3.3 Triagem, identificação e conservação dos flebotomíneos

Os insetos foram transportados para o laboratório de Bioecologia de Parasitos e Vetores – Departamento de Microbiologia e Parasitologia no Centro de Biociências da UFRN. No laboratório, os insetos capturados foram triados, sendo os flebotomíneos separados dos diversos outros insetos. As fêmeas foram mantidas na colônia, os machos foram identificados utilizando a chave de identificação de YOUNG e DUNCAN (Young, 1994).

### 3.4 Grupo de fêmeas para manutenção da colônia em laboratório

As fêmeas silvestres foram alimentadas em hamster anestesiado com ketamina / xylasina (1:1). Após a hematofagia, as fêmeas foram transferidas para potes de gesso para realização da postura dos ovos. Após a postura, os ovos foram

---

contados e o ciclo biológico de *Lu. longipalpis* foi acompanhado. A geração F<sub>1</sub> foi mantida em estufa BOD, à temperatura de 25°C e umidade entre 80 e 90%.

#### **3.4.1 Preferência alimentar de fêmeas *Lu. longipalpis* geradas em laboratório**

Grupos de aproximadamente 100 fêmeas da geração F<sub>1</sub> foram alimentadas em vertebrados de pequeno porte, incluindo preá – *Galea spixii*, porquinho da Índia - *Cavia porcellus*, catita - *Monodelphis domestica*, timbu - *Didelphis albiventris*, sagui - *Callithrix jachus*, gato - *Felis catus*, cão - *Canis familiaris*, galinha *Gallus gallus* e hamster - *Mesocricetus auratus* todos sedados com ketamina/xilasina (1:1). Por meio de uma membrana de pele de pinto, em um alimentador artificial 66 fêmeas foram alimentadas com sangue humano. Um total de 97 fêmeas capturadas durante o repasto sanguíneo em cavalos, em seguida foram transferidas para potes de postura, onde o desenvolvimento dos flebotomíneos foi acompanhado.

Foi realizada dosagem protéica do sangue dos animais utilizados nesse experimento, para observar se havia diferenças significativas nas concentrações do soro de cada animal.

#### **3.5 Grupos de fêmeas submetidos a diferentes temperaturas**

Grupos de fêmeas *Lutzomyia longipalpis* da geração F<sub>1</sub> foram mantidos em estufa BOD, em temperaturas variadas, 22°, 28°, 32° e 35°C, fotoperíodo 12:12h e umidade em torno de 80%.

### 3.6 Grupo de fêmeas para realização da PCR

As fêmeas coletadas próximas a abrigos de animais foram sacrificadas a -20°C, e em seguida, foram mantidas e conservadas em freezer -80°C para ser usadas na determinação do animal fonte do repasto sanguíneo e avaliação da infectividade por *Leishmania*.

#### 3.6.1 Desenho dos oligonucleotídeos (primers)

Cinco pares de primers, contendo 25 pares de base (pb) cada, foram desenhados utilizando o software Primer3, a partir de um alinhamento múltiplo das seqüências polimórficas do gene do citocromo b provenientes do Genbank de espécies distintas: *Homo sapiens* (EF488201.1), *Canis familiaris* (NC\_002008.4), *Gallus gallus* (NC\_007236.1), *Equus caballus* (AY584828.1) e *Euphractus sexcintus* (DQ243724.1). Para evitar o anelamento cruzado (dimerização) foi utilizado uma diferença de 5 a 7 pb entre os pares de primers utilizados no estudo (Tabela 1).

**Tabela 1 - Sequência de primers para gene do citocromo b.**

Primer	Sequência	Tm	Tamanho do produto
<i>Homo sapiens</i> FW	ATACGCAAATAACCCCTAATAA		
<i>Homo sapiens</i> RV	ATGTTTCAGGCTTCTGAGTAGAGAA	53°C	335
<i>Canis familiaris</i> FW	CTAACATCTCTGCTTGATGGAAGCTT		
<i>Canis familiaris</i> RV	TGCGAATAATAGTACAATTCCAATG	58°C	293
<i>Gallus gallus</i> FW	AATTAACAACCTCCCTAATCGACCTC		
<i>Gallus gallus</i> RV	TGTGAAGGAAGATACAGATGAAGAA	58°C	254
<i>Equus caballus</i> FW	TCACTCTTTTATTGACCTACCAACC		
<i>Equus caballus</i> RV	GAATGTGTAAGAGCCGTAGTAGAGG	61°C	283
<i>Euphractus sexcintus</i> FW	ATGACTAACATCCGTAAGACTCACC		
<i>Euphractus sexcintus</i> RV	GAAATAGGCCTGTAAAATTTGGAT	58°C	151

### 3.6.2 Extração de DNA

O DNA total dos insetos foi extraído de acordo com a metodologia padronizada por Michalsky et. al., 2002. Os insetos foram macerados individualmente em 35 µl de tampão de lise (100mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0). Após a adição de 5 µl/inseto de proteinase K (10 mg/ml), estes foram incubados a 56°C por 3 horas. O DNA foi extraído por adição equivalente de fenol: clorofórmio: isoamílico (25:24:1) e precipitado com adição de 0,1 volume de acetato de amônio 7,5 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Este foi levado ao freezer - 80°C durante 40 minutos, em seguida o precipitado foi lavado com etanol 70%, após a secagem o DNA foi ressuspensão em 50 µl de H<sub>2</sub>O miliQ.

A extração do DNA dos animais inclusos no estudo foi feito a partir da coleta do sangue periférico segundo a técnica de Grimberg (Grimberg *et al.*, 1989). O DNA de todas as amostras foi quantificado em espectrofotômetro (Ultrospec1100) a 260 nm. As amostras de DNA foram utilizadas na concentração de 20 ng/µl e mantidas a 4°C para uso nas PCR's.

### 3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Os segmentos do gene do citocromo b foram amplificados utilizando 5µl da amostra de DNA (20ng/µl); 2,5µl de tampão NEB (10x); 1,0µl de dNTP's (10 µM); 0,5 µl de primer forward (10µM/µL); 0,5 µl de primer reverse(10 µM/µL); 0,05 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl) e 15,45 µl de água miliQ, sendo o volume final de 25 µL/tubo. As condições de ciclagem da reação para o gene do citocromo b, consistiam numa desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos e a extensão final se deu a 68°C por 05 minutos.

Na reação em cadeia da polimerase para amplificação do kDNA de *Leishmania* foram utilizados 5 µl da amostra de DNA (20 ng/µl); 2,5 µl de tampão NEB (10x); 1,0 de dNTP's (10 µM); 1,0 µl de primer forward (5'- GGG GTT GGT GTA AAA TAG -3'); 1,0 µl de primer reverse (5' – CCA GTT TCC CGC CCC G -3');

0,25 µL de *Taq* polimerase (5 U/µl) e 15,25 µl de água miliQ, senod volume final de 25 µl/tubo. Para o kDNA, as condições de ciclagem foram: uma desnaturação inicial de 93°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 93°C por 30 segundos, 60,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz UV. Para avaliar a sensibilidade e especificidade dos primers para o gene do citocromo b, foram testados os DNAs dos animais (*Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Equus caballus*, *Gallus gallus* e *Euphractus sexcintus*) com todos os sets de primers dos animais inclusos no estudo.

#### **3.6.4 Seqüenciamento**

Os produtos de PCR foram purificados utilizando 5U de Exonuclease I e 2,5U de fosfatase alcalina de camarão. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora e as enzimas desnaturadas a 75°C por 15 min. Os produtos de PCR foram então seqüenciados utilizando o kit BigDye® versão 3.1 (Applied Biosystems) e os produtos de reação precipitados segundo o protocolo do fabricante. Os produtos foram então desnaturados em 10 uL de formamida e submetidos à separação no analisador genético ABI 3100 *Avant* (Applied Biosystems).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Preferência alimentar de *Lu. longipalpis* em animais anestesiados e taxa de oviposição

As fêmeas geradas em laboratório e alimentadas em animais anestesiados apresentaram variabilidade na preferência alimentar de acordo com os animais oferecidos para repasto sangüíneo. As fêmeas alimentadas com sangue humano, em um alimentador artificial com pele de pinto, apresentaram uma taxa de preferência alimentar de 98,0% e uma taxa de oviposição de 14 ovos/fêmea; 97,0% para o porquinho da Índia - *Cavia porcellus* com oviposição de 19 ovos/fêmea; 97,0% para o cavalo - *Equus caballus* com 19 ovos/fêmea; 86,0% no cão - *Canis familiaris* com 10,3 ovos/fêmea; 81,4% no preá – *Galea spixii* com 26 ovos/fêmea; 73,0% na galinha - *Gallus gallus* com 14 ovos/fêmea; 71,3% no timbu - *Didelphis albiventris* com 8,4 ovos/fêmea; 73,0% na galinha - *Gallus gallus* com 14 ovos/fêmea; 36,0% no sagüi - *Callithrix jachus* com 15 ovos/fêmea; nenhuma fêmea realizou repasto em gato - *Felis catus* (Tabela 2).

**Tabela 2 - Preferência alimentar de *Lu. longipalpis* alimentadas em diferentes animais.**

Fonte de Repasto	Aceitação %	Ovos/fêmea
Pele de Pinto - Sangue Humano	98	14
<i>Cavia porcellus</i>	97	19
<i>Equus caballus</i>	97	19
<i>Canis familiaris</i>	86	10,3
<i>Galea spixii</i>	81,4	26
<i>Gallus gallus</i>	73	14
<i>Didelphis albiventris</i>	71,3	8,4
<i>Monodelphis domestica</i>	42,8	0
<i>Callithrix jachus</i>	36	15
<i>Felis catus</i>	0	0

#### 4.2 Ciclo biológico de *Lu. longipalpis* em laboratório a diferentes temperaturas

O ciclo de vida de flebotomíneos à temperatura ambiente utilizando como fonte de repasto hamster anestesiado mostrou uma taxa de oviposição variável entre 21 – 50 ovos por fêmea. Os fatores exógenos que afetaram esta média incluíram umidade e temperatura. O período de incubação dos ovos, sob condições experimentais, foi de 5 – 11 dias. Após a eclosão dos ovos observou-se a seqüência ao ciclo biológico seguindo os estádios larvais (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>). Este período variou de 17 – 20 dias. Após o 4º estágio, a larva se prendeu a um substrato e se manteve em uma fase de dormência, permanecendo imóvel cerca de 10 dias, ou seja, a fase pupal, até a emergência do inseto adulto. O ciclo biológico total de flebotomíneos, à temperatura ambiente, sob condições laboratoriais, foi de 32 – 40 dias. À temperatura de 28°C, umidade relativa do ar entre 80 – 90% e ciclo claro – escuro 12: 12h, a população F<sub>1</sub> de *Lu. longipalpis* mostrou uma duração média de 50,8 dias, sendo estes dias distribuídos em 5,5 dias no tempo de incubação dos ovos; 21,4 dias em estágio larval; 3,2 dias para emergência de adultos/ tempo em pupa e expectativa de vida das fêmeas de 14,8 dias.

O ciclo biológico dos flebotomíneos se mostrou influenciado pela temperatura e umidade, foi observado que a 32°C o ciclo biológico é de 31 dias, enquanto que a 28°C este aumenta para 50 dias e a 22°C para 79 dias. Em temperaturas mais baixas as fases de ovo, larva e pupa são mais prolongadas. Com o aumento da temperatura para 35°C, os ovos não eclodiram, inviabilizando o curso do ciclo biológico (Figura 12).

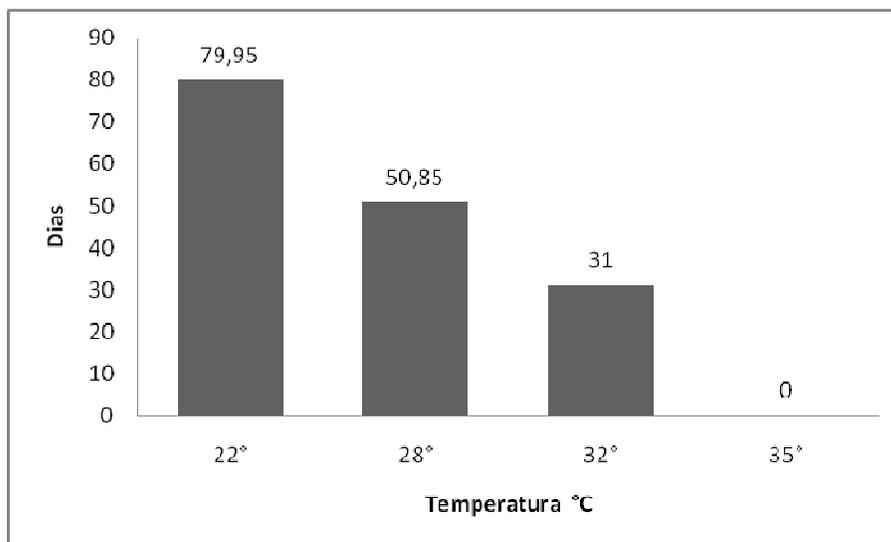


Figura 12 - Duração média, do ciclo biológico de *Lu. longipalpis*, a diferentes temperaturas.

#### 4.3 Abundância e diversidade das espécies de flebotomíneos

Nos municípios de Nísia Floresta e São Gonçalo do Amarante, foi coletado um total de 1.768 exemplares de flebotomíneos, sendo 1.538 machos e 230 fêmeas. Entre os machos, foram encontradas quatro espécies do gênero *Lutzomyia*: *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 foi a espécie mais prevalente com 86,0%, *Lutzomyia evandroi* Costa Lima & Antunes, 1936 com 10,5%, *Lu. lenti* Mangabeira, 1938 com 3,2%, *Lu. whitmani* Antunes & Coutinho, 1939 com 0,3%. A relação entre macho e fêmea foi de 6 machos para 1 fêmea.

Nas seis localidades de coleta em São Gonçalo do Amarante, a espécie mais encontrada foi *Lu. longipalpis* (n= 805), seguida de *Lu. evandroi* (n=28) encontrada nas localidades de Canaã e Regomoleiro, *Lu. whitmani* (n=3) foi encontrada apenas na localidade de Regomoleiro (Figura 13).

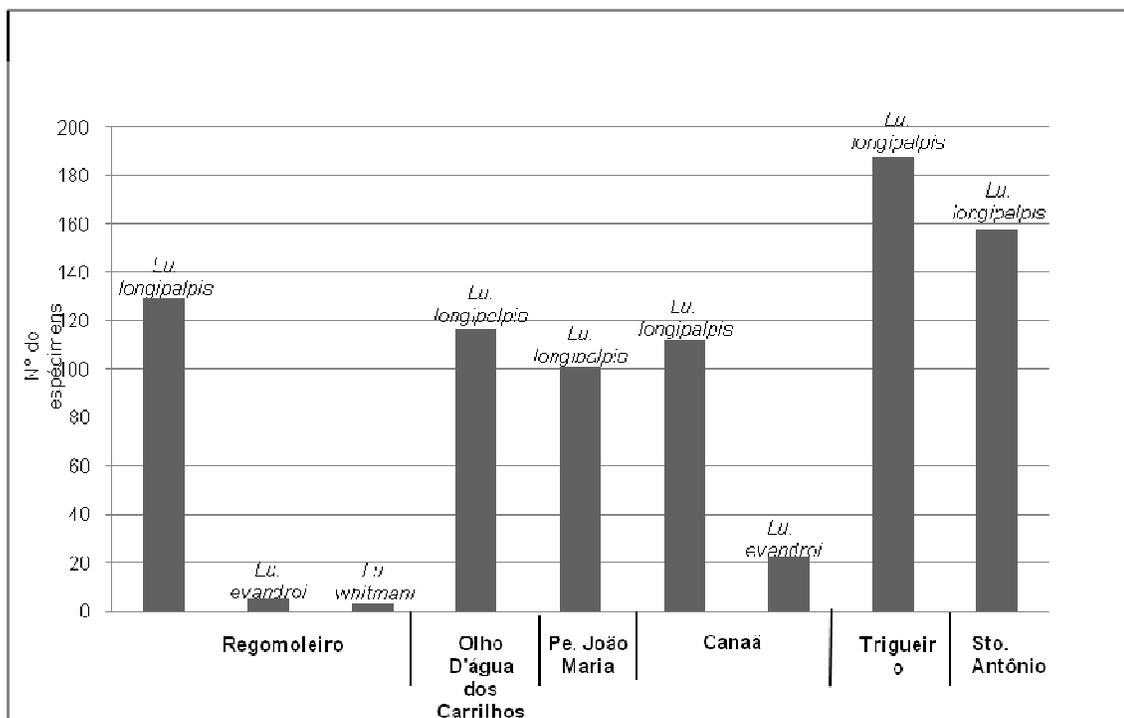
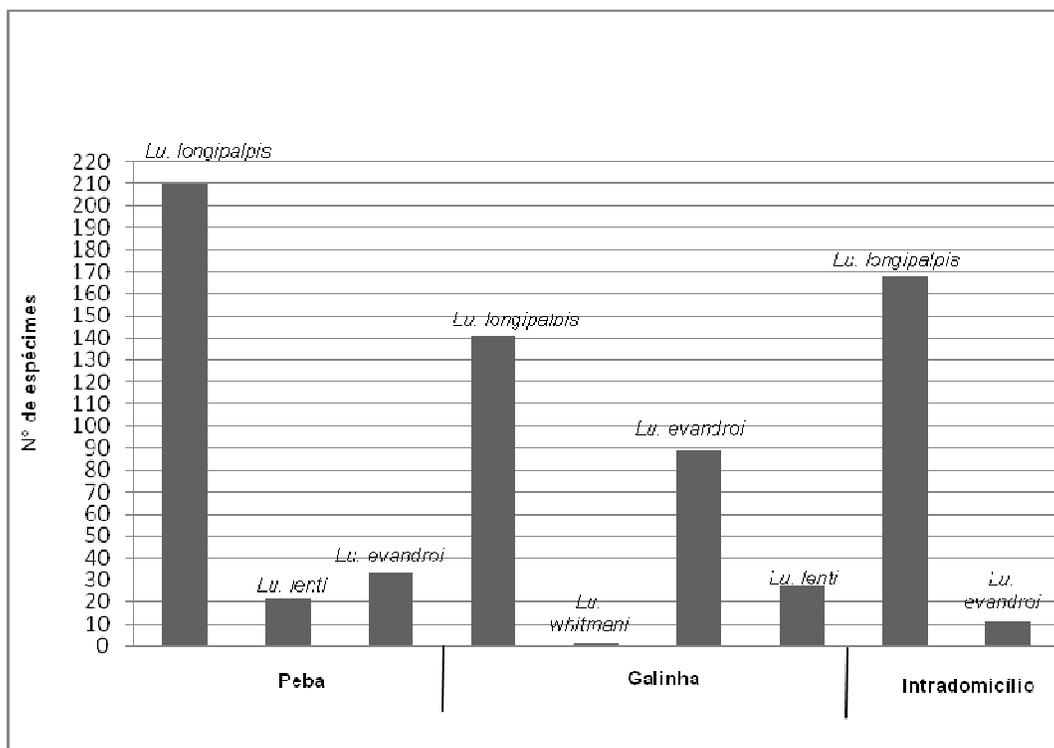


Figura 13 - Abundância de flebotomíneos machos em São Gonçalo do Amarante.

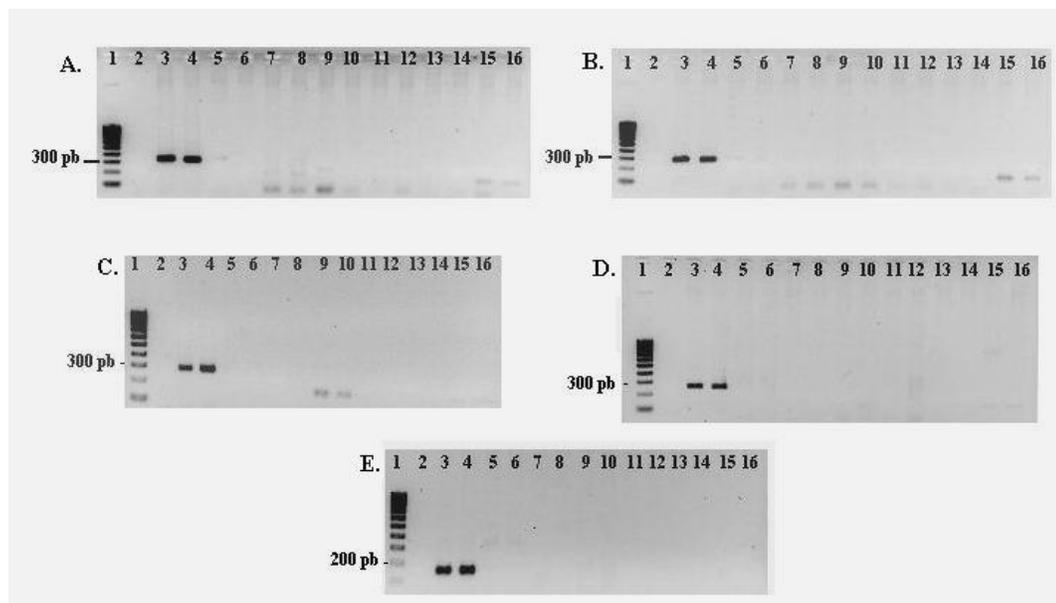
Semelhante ao que foi observado em São Gonçalo do Amarante, em Nísia Floresta *Lu. longipalpis* (n=519) também foi a espécie mais prevalente sendo encontrada em todas as armadilhas próximas ao abrigo do peba, galinheiro e a residência. *Lu. evandroi* (n=133) foi a segunda espécie mais encontrada nos três micro-ambientes, seguida de *Lu. lenti* (n=49) encontrada apenas próximo ao abrigo do peba e do galinheiro, apenas um espécime de *Lu. whitmani* foi encontrado próximo ao galinheiro (Figura 14).



**Figura 14 - Abundância de flebotomíneos machos no peridomicílio em Nísia Floresta. Acate a sugestão feita pela banca e coloque tatu-peba em tudo**

#### 4.4 Identificação das fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos

Das 230 fêmeas coletadas 136 foram provenientes de Nísia Floresta e 94 de São Gonçalo do Amarante. Foi extraído DNA de todos os espécimes com objetivo de avaliar por PCR a principal fonte de repasto utilizada nas duas localidades, como também a taxa de infectividade. Os marcadores moleculares utilizados no estudo da identificação da fonte de repasto sanguíneo apresentaram elevada especificidade, uma vez que não foram observados anelamentos interespecíficos (Figura 15).



**Figura 15 - Géis controle. Painel A – Controle humano:** Linha 1: Marcador de peso molecular, Linha 2: Branco, Linhas 3 e 4: DNA humano (controle positivo - 335 pb), Linhas 5 e 6: DNA humano + primer cão, Linhas 7 e 8: DNA humano + primer cavalo, Linhas 9 e 10: DNA humano + primer peba, Linhas 11 e 12: DNA humano + primer galinha, Linhas 13 e 14: DNA humano + primer timbu, Linhas 15 e 16: DNA humano + primer kDNA de *Leishmania*.

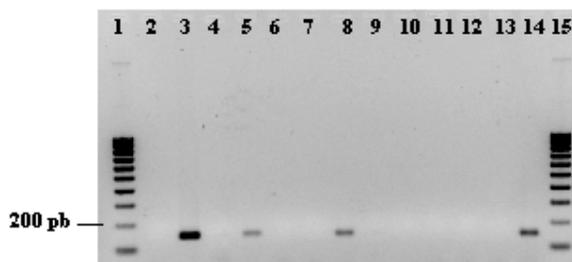
**Painel B – Controle cão:** Linha 1: Marcador de peso molecular de 100pb, Linha 2: Branco, Linhas 3 e 4: DNA cão (controle positivo – 293 pb), Linhas 5 e 6: DNA cão + primer humano, Linhas 7 e 8: DNA cão + primer cavalo, Linhas 9 e 10: DNA cão + primer peba, Linhas 11 e 12: DNA cão + primer galinha, Linhas 13 e 14: DNA cão + primer timbu, Linhas 15 e 16: DNA cão + primer kDNA de *Leishmania*.

**Painel C – Controle cavalo:** Linha 1: Marcador de peso molecular de 100pb, Linha 2: Branco, Linha 3 e 4: DNA cavalo (controle positivo – 283 pb), Linhas 5 e 6: DNA cavalo + primer humano, Linhas 7 e 8: DNA cavalo + primer cão, Linhas 9 e 10: DNA cavalo + primer peba, Linhas 11 e 12: DNA cavalo + primer galinha, Linhas 13 e 14: DNA cavalo + primer timbu, Linhas 15 e 16: DNA cavalo + kDNA de *Leishmania*.

**Painel D – Controle galinha:** Linha 1: Macador de peso molecular 100pb, Linha 2: Branco, Linha 3 e 4: DNA galinha (controle positivo – 254 pb), Linhas 5 e 6: DNA galinha + primer humano, Linhas 7 e 8: DNA galinha + primer cão, Linhas 9 e 10: DNA galinha + primer cavalo, Linhas 11 e 12: DNA galinha + primer peba, Linhas 13 e 14: DNA galinha + primer timbu, Linhas 15 e 16: DNA galinha + primer kDNA de *Leishmania*.

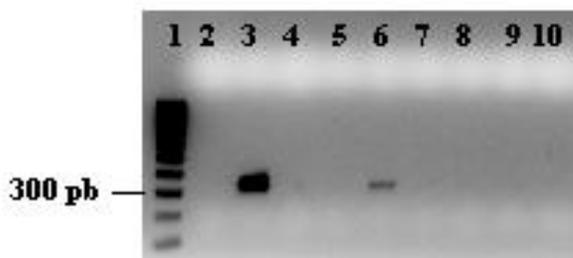
**Painel E – Controle peba:** Linha 1: Marcador de peso molecular 100pb, Linha 2: Branco, Linhas 3 e 4: DNA peba (controle positivo – 152 pb), Linhas 5 e 6: DNA peba + primer humano, Linhas 7 e 8: DNA peba + primer cão, Linhas 9 e 10: DNA peba + primer cavalo, Linhas 11 e 12: DNA peba + primer galinha, Linhas 13 e 14: DNA peba + primer timbu, Linhas 15 e 16: DNA peba + primer kDNA de *Leishmania*.

As fêmeas (n = 136) coletadas em Nísia Floresta apresentaram um percentual de 50,7% de repasto sanguíneo realizado em peba - *Euphractus sexcintus*, o amplificado corresponde a 151 pb (Figura 16).



**Figura 16 - Amplificações do gene do *cyt b* de *Euphractus sexcintus* em fêmeas *Lutzomyia*.**  
Linha 1 e 15 – Marcador de peso molecular 100 pb; Linha 2: Branco; Linha 3: Controle positivo;  
Linha 4: Controle negativo (DNA de macho *Lutzomyia*); Linhas 5, 8 e 14: fêmeas *Lutzomyia*.

Dentre as 94 fêmeas coletadas em São Gonçalo do Amarante 12,8% apresentaram amplificação de 335 pb (Figura 17), correspondente a repasto sanguíneo realizado em humanos - *Homo sapiens*. Não foi encontrada nenhuma amplificação referente aos demais animais observados no peridomicílio como cães, galinhas, jumentos, gatos, entre outros.



**Figura 17 - Amplificações do gene do *cyt b* de *Homo sapiens* em fêmeas *Lutzomyia*.**  
Linha 1: Marcador de peso molecular 100 pb; Linha 2: Branco; Linha 3: Controle positivo;  
Linha 4: Controle negativo (DNA de macho de *Lutzomyia*); Linha 6: fêmea *Lutzomyia*.

Para validar a reação em cadeia da polimerase e confirmar a identificação das fontes de repasto, foi realizado seqüenciamento dos produtos de PCR das fêmeas que apresentaram amplificação para o gene do citocromo b de *Homo sapiens* e *Euphractus sexcintus*.

O seqüenciamento dos amplificados apresentou grande similaridade com as seqüências obtidas a partir do GeneBank para o gene do citocromo b de *Homo sapiens* e *Euphractus sexcintus* (Figuras 18 e 19).

```

Homo sapiens AAATTAATTAACCACTCATTCATCGACCTCCCCACCCCATCCAACATCTCCGCATG-ATG
Amostra 1 -----N.....A.....C...

Homo sapiens AAAC TTCGGCTCACTCCTTGGCGCCTGCCTG-----ATCCTCCAAATCACACAGGACTA
Amostra 1 NAG...NC.AA..NNTCNM.G.NGG.NGG.GAAAG.....NTTCN

Homo sapiens --TTCCTAGCCATACACTACTCACCAGACGCCTCAACCGCCTTTTCATCAATCGCCACA
Amostra 1 AACNNN.T....GA.A.T...C.A.A.....

Homo sapiens TCACTCGAGACGTAAAT TATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCACGCCAATGGCGCCTCAA
Amostra 1 .....N.....TAT.....CCC.....

Homo sapiens TATTCTTTATCTGCCTCTTCCTACACATCGGGCGAGGCCTATATTACGGATCAT
Amostra 1 ..A.....C.

```

**Figura 18 - Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas de *Homo sapiens* (EF488201.1) e produto amplificado de PCR.** (-) GAP, (.) nucleotídeo idêntico, amostra 1: seqüência nucleotídica do produto de PCR amplificado fêmea *Lutzomyia* spp. com repasto realizado em *Homo sapiens*.

```

Euphractus sexcintus CACTATTTAAAATCATTAAACCAATCATTTCATTTGACTTACCCACCCCAACAAGCATCTCAT
Amostra 2 -----C..T.....

Euphractus sexcintus CATG-ATGAAAATTTT--GGTTCACTACTAGGCATCTGCCTAGTC
Amostra 2 .C.TC.CA.C..C..TG....CGGTA.....GT

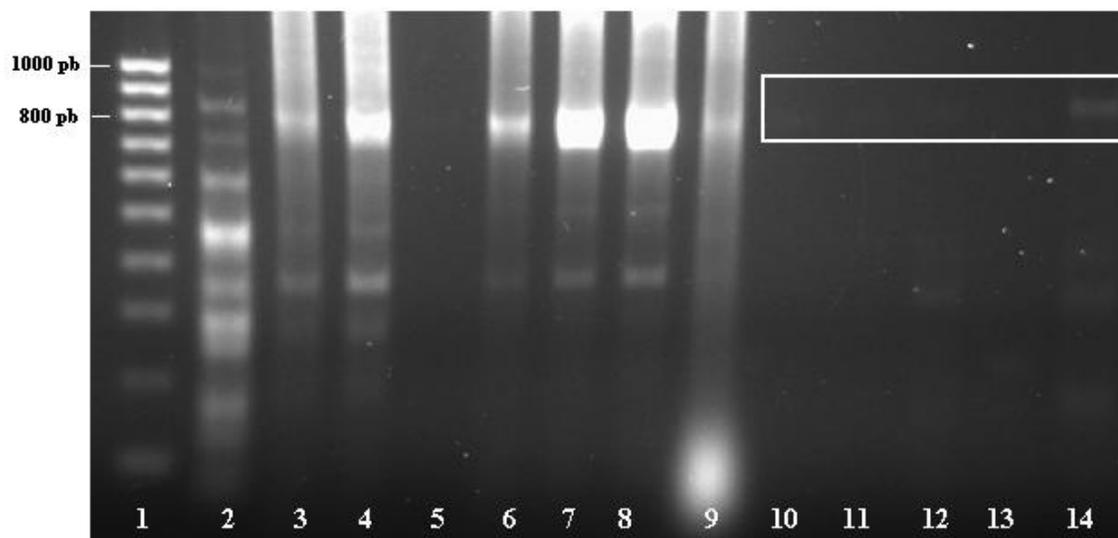
```

**Figura 19 - Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas de *Euphractus sexcintus* (DQ243724.1) e produto amplificado de PCR.** (-) GAP, (.) nucleotídeo idêntico, amostra 2 = seqüência nucleotídica do produto de PCR amplificado (fêmea *Lutzomyia* spp. com repasto realizado em *Euphractus sexcintus*).

A presença de gap's pode ter sido em consequência de uma baixa concentração de DNA presente no produto da PCR, uma vez que a reação avalia o perfil de repasto individual de cada fêmea *Lutzomyia* spp. Entretanto, quando realizamos o BLAST das seqüências, obtivemos um percentual de 84% para *Homo sapiens* e de 85% para *Euphractus sexcintus*, confirmando e validando os achados no estudo de preferência alimentar de fêmeas *Lutzomyia* spp.

#### 4.5 Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* em fêmeas *Lutzomyia* coletadas em áreas endêmicas para LV

Das 80 fêmeas analisadas, provenientes de São Gonçalo do Amarante, foi encontrada uma taxa de infectividade pelo kDNA de *Leishmania* correspondente a 5% (Figura 20).



**Figura 20 - Amplificação de kDNA de *Leishmania* em fêmeas *Lutzomyia*.**

Linha 1: Marcador de peso molecular, Linha 2: DNA humano, Linha 3 e 4: DNA de *Leishmania*, Linha 5: Branco, Linhas 6, 7, 8 e 9: DNA de *Leishmania*, Linhas 10, 11, 12, 13 e 14: Fêmeas coletadas em São Gonçalo do Amarante.

## 5 DISCUSSÃO

A distribuição da leishmaniose visceral na América do Sul tem mudado substancialmente nos últimos 30 anos. Atualmente, a LV tem se expandido para países subtropicais da América do Sul e América Central (Almeida *et al.*, 2005; Soares, 2003). *Lu. longipalpis*, o principal vetor da *L. i. chagasi* nas Américas apresenta ampla distribuição, em novas áreas, incluindo o norte da Argentina e Paraguai (Salomon *et al.*, 2008), além disso, nestas novas áreas têm sido confirmado casos de LV em cães e, esporadicamente, casos humanos. O delineamento de ações de intervenção e controle das leishmanioses tem sido permitido a partir de conhecimentos acerca da dinâmica populacional, características biológicas e comportamentais desses vetores. Dessa forma, a identificação dos índices de preferência alimentar de alguns insetos, sejam antropofílicos ou oportunistas, juntamente com a influência da temperatura na cadeia biológica do vetor é fundamental para delinear este novo padrão de transmissão das leishmanioses nas Américas.

A compreensão do ciclo biológico do vetor e de seus hábitos alimentares auxilia na determinação de ecossistemas compatíveis com a sobrevivência dos insetos e permite um maior entendimento acerca dos possíveis animais que possam está servindo de fonte de repasto, além de identificar quais destes estão sob o risco de adquirirem a infecção por *Leishmania*. A expansão da LV para novas áreas da América do Sul, incluindo áreas com invernos amenos, pode significar que as mudanças globais, em virtude do aquecimento, têm propiciado temperaturas mais compatíveis com a adaptação dos flebotomíneos para estas novas áreas (Cross; Hyams, 1996; Kovats *et al.*, 2001).

No Brasil, a leishmaniose visceral é causada por *L. i. chagasi* e inicialmente era considerada uma doença classicamente zoonótica de ocorrência rural, atualmente, a LV tem apresentado um padrão periurbano de transmissão (Berman, 2006), a região Nordeste tem acompanhado o mesmo perfil de transmissão da LV no país. No Rio Grande do Norte, o primeiro surto de leishmaniose visceral foi notificado no ano de 1989, em Natal, capital do Estado, com um segundo pico observado entre os anos de 1997 e 2000 (Jeronimo, *et al.*, 2004; Jeronimo, *et al.*, 1994). O desenvolvimento dos grandes centros urbanos em áreas endêmicas para

leishmaniose visceral resultou na expansão da doença no Brasil como um todo, tendo sido observada uma adaptação de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, ao ambiente periurbano (Lainson; Rangel, 2005; Lainson; Shaw, 1978; Sherlock, 1996; Walsh; Molyneux; Birley, 1993).

No Rio Grande do Norte, *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral nas Américas, perfaz um total de 85% da fauna flebotomínica, seguida de 11% de *Lu. evandroi* (Ximenes, *et al.*, 2000) e embora, os machos não realizem repasto sanguíneo, a abundância destes está diretamente associada à abundância de fêmeas (Morton; Ward, 1989). Populações de fêmeas de flebotomíneos capturadas em ambiente silvestre ou criadas em laboratório vem sendo utilizadas em diversos experimentos para compreensão de seus parâmetros alimentares. Estudos realizados sobre a preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* na Colômbia, demonstraram que esta espécie tem um amplo espectro de possíveis hospedeiros naturais e, que os insetos preferiram claramente porcos e vacas ao invés de galinhas, exibindo uma maior preferência por animais de grande porte (Morrison; Ferro; Tesh, 1993). Em um estudo semelhante realizado na Venezuela, o repasto sanguíneo de *Lutzomyia pseudolongipalpis* Arrivillaga & Feliciangeli, 2001 foi identificado por dot-ELISA e 37,3% dos espécimes coletados havia realizado repasto sanguíneo em cães e em cabras, um menor percentual foi observado em ratos (Agrela *et al.*, 2002). Um estudo de avaliação do perfil alimentar de *Lu. longipalpis* realizado no Brasil, concluiu que a atração por diferentes hospedeiros foi associada ao tamanho do animal que serve de fonte de repasto (Quinnell; Dye; Shaw, 1992) e esta mesma conclusão foi alcançada por Campbell-Lendrum e colaboradores com populações de *Lu. whitmani* (Campbell-Lendrum *et al.*, 1999).

No presente estudo, as fêmeas de *Lutzomyia* spp. geradas em laboratório também se alimentaram em animais de grande porte como humanos e cavalos, seguido pelos cães, no entanto apresentou uma maior preferência pelos roedores *Cavia porcellus* e *Galea spixii*, correspondendo a aproximadamente 90% dos repastos realizados, resultado semelhante ao encontrado por Rêbello e colaboradores em 2003. Em áreas rurais do semi-árido do Rio Grande do Norte, os preás - *Galea spixii* são encontrados em áreas endêmicas de LV e ao serem infectados experimentalmente com *Leishmania i. chagasi* não apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos hematológicos, nem lesões macro ou

microscópicas (Barbosa, 2005). No entanto, em laboratório observamos alta preferência alimentar de fêmeas por esse animal, e embora a participação desses animais nas cadeias epidemiológicas de LV ainda não esteja esclarecida, a presença desses roedores em ambiente peridomiciliar aliado a capacidade de manter a infecção estável, sugere a necessidade de novos estudos envolvendo os preás.

Diversos animais silvestres têm sido identificados como possíveis hospedeiros de *Leishmanias* envolvidos na transmissão da forma tegumentar da doença, entretanto, na forma visceral apenas cães, raposas, timbus e alguns ratos foram encontrados com infecção natural pelo parasita. Em laboratório, as fêmeas apresentaram um percentual de aproximadamente 73% de preferência alimentar em galinha *Gallus gallus*, e embora não exista nenhum relato na literatura sobre a infecção por *Leishmania* em aves, a presença de galinheiros nas proximidades contribui para uma maior adaptação de fêmeas *Lutzomyia* spp. e para a manutenção da doença no peridomicílio, nesse caso, a presença de flebotomíneos infectados no peridomicílio dependeria da presença de animais sinantrópicos, como timbus, juntamente com animais domésticos susceptíveis à infecção por *L. i. chagasi* (Dias Fde; Lorosa; Rebelo, 2003).

Do total de fêmeas alimentadas nos diferentes animais, 71% preferiram alimentação no marsupial. Esses animais freqüentemente visitam galinheiros em áreas peridomiciliares e, no Brasil e na Colômbia foram encontrados infectados com *Leishmania i. chagasi* (Sherlock, 1996; Travi *et al.*, 1994). A reduzida preferência alimentar pelos sagüis (*Callithrix jachus*), provavelmente se deve a utilização de estratos espaciais diferentes dos utilizados pelos insetos, uma vez que esses animais são arborícolas. A rejeição foi total em gatos *Felis catus*, e isso pode ser em consequência da existência de componentes químicos que provavelmente repelem o inseto, e embora os relatos de infecção por *Leishmania* spp. nesses animais sejam incomuns, um número crescente de casos tem sido relatados na América do Sul (Maroli *et al.*, 2007). Casos autóctones de infecção por *L. i. chagasi* e *L. braziliensis* em felinos tem sido recentemente relatados nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Maroli, *et al.*, 2007; Schubach *et al.*, 2004; Simoes-Mattos *et al.*, 2005), entretanto o papel desses animais como reservatórios da doença ainda não está esclarecido. Em contrapartida, foi demonstrado por Maroli e colaboradores que esses animais encontrados naturalmente infectados com um

padrão crônico para infecção por *Leishmania* são capazes de infectar um vetor competente para *Leishmania i. chagasi* (Maroli, *et al.*, 2007).

Apesar de alguns autores classificarem *Lu. longipalpis* como uma espécie antropofílica (Quinnell; Dye; Shaw, 1992), fêmeas de *Lu. longipalpis* têm sido observadas alimentando-se em uma variedade de animais vertebrados incluindo cavalos, porcos, galinhas e jumentos (Deane; Deane, 1962; Lainson; Ward; Shaw, 1977), este caráter oportunista já foi verificado e constitui um aspecto ecológico de grande relevância na epidemiologia do calazar (Morrison; Ferro; Tesh, 1993; Quinnell; Dye; Shaw, 1992), entretanto, ainda nenhuma afirmação precisa pode ser feita quanto a preferência alimentar destes insetos. No RN, estudos realizados em ambiente natural avaliaram a densidade populacional de *Lutzomyia* em abrigos de animais e mostraram que *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. evandroi* apresentaram comportamento eclético na escolha do biótopo (Ximenes; Souza; Castellon, 1999). Os resultados obtidos em laboratório corroboram os achados por Ximenes e colaboradores, confirmando que em ambiente natural, *Lu. longipalpis* apresentou uma maior preferência alimentar por cavalos, galinhas, roedores e pebas, entretanto, *Lu. evandroi* apresentou uma maior preferência alimentar por pebas, roedores, galinhas e cavalos (Ximenes; Souza; Castellon, 1999), provavelmente a atração que os cavalos exercem sob *Lu. longipalpis*, é em consequência do porte do animal e também devido ao grau de adaptação desta espécie ao peridomicílio, onde cavalos e jumentos são freqüentemente encontrados (Ximenes; Souza; Castellon, 1999).

A agregação de flebotomíneos em áreas peridomiciliares está diretamente associada às condições precárias de higiene e a presença de abrigos de animais. Esses abrigos servem como local de repouso para as fêmeas, e a presença de matéria orgânica em decomposição associada à temperatura e umidade elevadas contribui para o desenvolvimento das formas imaturas desses insetos (Ximenes; Souza; Castellon, 1999).

O potencial reprodutivo de flebotomíneos depende de vários fatores, dentre eles, a fonte de sangue utilizada para repasto tem sido bastante explorada, uma vez que esse parâmetro pode influenciar na taxa de oviposição desses insetos e, na capacidade que determinados animais apresentam em servir como reservatório para infecção por *Leishmania*. Estudos realizados avaliando o comportamento alimentar e a produtividade de ovos de duas colônias de *Lu. longipalpis*, mostraram

---

que o repasto sanguíneo realizado em hamster, quando comparado ao sangue humano aumenta a taxa de oviposição das fêmeas (Ready, 1978; Ready, 1979). Subseqüentemente, Rangel e colaboradores em 1986, estudaram o ciclo biológico de *Lu. longipalpis* sob diferentes condições, como resultado obtiveram que a oviposição ocorre 5 dias após o repasto sanguíneo e a taxa de oviposição varia de 24 a 52 ovos/fêmea e que a fonte de repasto sanguíneo também influencia nesse parâmetro. No presente estudo, a taxa de oviposição das fêmeas pareceu sofrer uma maior influência dos parâmetros comportamentais das fêmeas pela escolha dos hospedeiros, do que dos níveis de proteínas totais presentes em cada sangue.

Fatores abióticos como clima e temperatura são parâmetros fundamentais para compreensão da biologia desses insetos. Estudos realizados com *Phlebotomus papatasi*, principal vetor de *Leishmania major* no Velho Mundo, avaliando a biologia desses insetos a diferentes temperaturas, mostraram que com a diminuição da temperatura esses insetos apresentaram um metabolismo mais baixo e o período de desenvolvimento das formas imaturas, desde a eclosão dos ovos até a emergência de adultos, bem mais longo (Benkova; Volf, 2007). No nosso estudo, o ciclo biológico da geração F<sub>1</sub> de *Lu. longipalpis*, coletados de populações obtidas em áreas periurbanas da região metropolitana de Natal, apresentou uma duração média de 50 dias, resultado semelhante ao encontrado por Ximenes e colaboradores em 2001 com *Lu. evandroi*. Quando comparamos *Lu. evandroi* e *Lu. longipalpis*, ambas apresentam grande similaridade no comportamento, no ciclo de vida e na sua distribuição geográfica (De Melo Ximenes Mde; Maciel; Jeronimo, 2001), entretanto *Lu. evandroi* ainda não foi encontrada infectada com nenhuma espécie de *Leishmania*. No presente estudo o ciclo biológico de flebotomíneos criados em laboratório a 32°C se completou em 31 dias, mais rápido do que a 28°C e a 22°C, resultado semelhante ao encontrado com outras espécies de flebotomíneos e ao encontrado por Ximenes e colaboradores em 2001, estudando populações de flebotomíneos da Grande Natal, onde se observou que o aumento da temperatura diminuiu o período de incubação dos ovos e conseqüentemente a duração do ciclo biológico dos insetos (De Melo Ximenes Mde; Maciel; Jeronimo, 2001). Recentemente surtos epidêmicos de algumas doenças transmitidas por insetos vetores têm sido associadas ao aquecimento global e mudanças climáticas abruptas. O evento El Niño é uma forte flutuação climática inter-anual representada pelo aquecimento anormal das águas Oceano Pacífico Equatorial, com grandes

mudanças no clima global, causando longos períodos de seca (Cardenas, *et al.*, 2006). Muitos autores acreditam que variações sazonais nas populações de *Lutzomyia* são respostas do vetor às mudanças climáticas, a abundância do vetor também é influenciada pela temperatura, velocidade do vento e umidade, e a sazonalidade do vetor provavelmente está diretamente relacionada aos casos de LV na região (Ximenes Mde *et al.*, 2006). No Nordeste do Brasil o evento El Niño (ENOS) tem contribuído para reemergência das leishmanioses e as mudanças climáticas têm coincidido com os surtos epidêmicos de LV no Estado da Bahia, onde o ciclo de incidência anual da doença parece ter relação estreita com os episódios de frequência e duração do evento (Franke, *et al.*, 2002). Mudanças mínimas na temperatura global em decorrência de eventos climáticos tem sido um ponto de grande relevância na compreensão epidemiológica das leishmanioses, uma vez que estas mudanças causam alterações na densidade populacional do vetor, na capacidade de adaptação do parasito e na densidade dos animais hospedeiros. Um aumento de 4°C na temperatura resultou numa diminuição de 20 dias no ciclo biológico de *Lu. longipalpis*, esse resultado obtido em laboratório corrobora os achados literários relacionando diretamente eventos climáticos, mudanças exógenas e fatores abióticos sobre a densidade populacional do vetor. Além de proporcionar o aumento da densidade vetorial, o aumento de temperatura também acelera o desenvolvimento do parasito no intestino do vetor e conseqüentemente aumenta os riscos de transmissão de *Leishmanias* spp. (Chaves; Pascual, 2006). A compreensão do desenvolvimento das formas imaturas de *Lutzomyia* spp., em laboratório, a diferentes temperaturas, pode auxiliar na criação de novas medidas de controle do vetor e pode auxiliar também na logística de controle da transmissão da doença, de acordo com as mudanças climáticas de ocorrência na região.

Dentre os machos capturadas no peridomicílio, *Lu. longipalpis* foi a espécie mais abundante, revelando um maior grau de adaptação desta, já mostrado anteriormente por outros autores.

*Lu. evandroi* foi a segunda espécie mais encontrada (Ximenes, *et al.*, 2000) e, embora ainda não haja indícios da atuação dessa espécie como vetor na transmissão da leishmaniose em humanos (De Melo Ximenes Mde; Maciel; Jeronimo, 2001), estudos realizados em Jacobina, na Bahia, indicam que *Lu. evandroi* pode estar envolvida na transmissão de leishmaniose visceral canina

(Sherlock, 1996), e no RN foi a segunda espécie mais encontrada em áreas endêmicas para LV, perfazendo um total de 11% da fauna flebotomínica constituinte do Estado (Ximenes, *et al.*, 2000).

*Lutzomyia lenti* e *Lu. whitmani* foram encontradas em menor proporção no presente estudo e ambas são espécies envolvidas na transmissão das leishmanioses cutâneas.

No Brasil, a presença de *Lu. whitmani* tem sido registrada em 26 estados brasileiros com exceção de Santa Catarina, e esta espécie apresenta uma relação bastante próxima com as espécies de leishmania dermatóricas, no Nordeste, Sudeste e Norte do país tem sido considerada responsável pela transmissão da espécie *L. braziliensis*, além de também ser apontada como transmissora de *L. shawi*, sendo o principal elo entre os parasitos, animais reservatórios silvestres e, o homem (Da Costa *et al.*, 2007). Recentemente, a presença de *Lu. whitmani* também foi associada a uma variedade de vegetações desde a floresta amazônica, cerrado até a caatinga nordestina (Da Costa, *et al.*, 2007). No Maranhão, *Lu. whitmani* foi capturada no peridomicílio, indicando um padrão urbano de transmissão da leishmaniose cutânea (Leonardo; Rebelo, 2004), no Ceará, *Lu. whitmani* foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis* em área de leishmaniose cutânea (De Queiroz *et al.*, 1991). Além de estar presente em quase todo Brasil e em países da América Latina, como Guiana Francesa, Peru, Paraguai e Argentina, a presença de *Lu. whitmani* tem sido associada às drásticas modificações ambientais e, um novo padrão de transmissão de leishmaniose tem se estabelecido em consequência da devastação de áreas verdes, propiciando a adaptação desta espécie em área peridomiciliar (Da Costa, *et al.*, 2007).

Uma maior diversidade de flebotomíneos foi observada no município de Nísia Floresta, onde quatro espécies de *Lutzomyia* spp. foram encontradas, provavelmente devido a uma maior presença de abrigos de animais no peridomicílio, pelas precárias condições de higiene e também pelos pontos de coleta se localizarem próximos a um fragmento de Mata Atlântica. Nas coletas realizadas próximas ao domicílio capturamos exemplares de *Lu. longipalpis* (n=168) e *Lu. evandroi* (n=11), esta informação sugere a adaptação dessas espécies ao peridomicílio. Embora as galinhas não desenvolvam infecção por *Leishmania* spp., como citado anteriormente, as armadilhas dispostas próximas ao galinheiro foram as que apresentaram uma maior diversidade de espécies, sendo encontrados

---

exemplares de *Lu. longipalpis*, *Lu. evandroi*, *Lu. lenti* e *Lu.* . Nas proximidades do abrigo dos pebas não foram encontrados exemplares de *Lu. whitmani*.

Em todos os pontos de coleta a espécie mais encontrada foi *Lu. longipalpis*, confirmando o grau de adaptação dessa espécie e reforçando o seu caráter oportunista.

No município de São Gonçalo do Amarante dentre os seis pontos de coleta, um total de 805 exemplares de *Lu. longipalpis* foi encontrado em todos os locais, seguido de 28 exemplares de *Lu. evandroi* coletados apenas nas localidades de Canaã e Regomoleiro, apenas três exemplares de *Lu. whitmani* foram coletados na localidade de Regomoleiro. O alto número de espécimes de *Lu. longipalpis* coletados no peridomicílio em São Gonçalo do Amarante e Nísia Floresta explica o registro de ocorrência de casos de LV humana e canina confirmados nos municípios.

A compreensão da multiplicidade de relações estabelecidas entre flebotomíneos, animais hospedeiros e leishmanias, é essencial à epidemiologia das leishmanioses. Dias e colaboradores (Dias Fde; Lorosa; Rebelo, 2003) descrevem que o conhecimento de hábitos alimentares de espécies de flebotomíneos e suas fontes sanguíneas tem grande valor no delineamento de ações para controle e vigilância da doença em sua manifestação tegumentar ou visceral. A agregação de diversos animais vertebrados aliada às condições precárias de higiene e habitação proporciona uma maior ligação entre os flebotomíneos e a transmissão das leishmanioses no peridomicílio. A presença de abrigos de animais no peridomicílio influencia a disseminação da LV em áreas periurbanas da Grande Natal, as condições dos abrigos e os animais presentes nesses locais são atrativos aos flebotomíneos e contribuem com a peridomiciliação de *Lu. longipalpis*.

Neste estudo, fêmeas de *Lu. Longipalpis* coletadas em São Gonçalo do Amarante realizaram repasto sanguíneo somente em humanos, enquanto que, as fêmeas coletadas em Nísia Floresta realizaram repasto sanguíneo em pebas. Sabe-se que as galinhas exercem uma forte atração sobre os flebotomíneos, embora esses animais não desenvolvam a infecção por *Leishmania* a presença destes pode exercer um efeito zooprofilático na área (Alexander, *et al.*, 2002). Embora ainda não haja dados na literatura que evidenciem exatamente o papel dos pebas na transmissão das leishmanioses, a presença de abrigos desses animais no peridomicílio, em associação com cães, contribuiu para a agregação dos

flebotomíneos, possivelmente aumentam o risco de contato entre os insetos vetores e humanos e, conseqüentemente, poderia ser um fator de risco na transmissão de *Leishmania* spp. em ambientes periurbanos (Ximenes; Souza; Castellon, 1999). No Brasil, *Lu. (P.) ayrozai* Barreto e Coutinho, 1940 tem sido incriminado como vetor de *Leishmania (V.) naiffi* a partir de pebas *Dasypus novemcinctus* infectados, ocorrendo principalmente na região Norte (Le Pont, 1990). No presente estudo, o alto número de fêmeas alimentadas em peba pode ter resultado da facilidade de acesso ao animal, e conseqüentemente ao alimento, uma vez que os animais eram mantidos em um abrigo parcialmente fechado. Os resultados encontrados no presente estudo, sejam em condições de laboratório ou em ambiente natural, reforçam o comportamento eclético e oportunista de fêmeas *Lutzomyia* spp., e sugerem que uma maior atenção deve ser dada à presença de animais domésticos e sinantrópicos no peridomicílio. A presença desses animais em áreas periurbanas pode resultar na agregação de flebotomíneos nesses locais, possibilitando um micro-ambiente apropriado aos transmissores de *Leishmania* nessas áreas.

Sendo assim, a utilização de medidas de saneamento no peridomicílio são fatores importantes para diminuir a densidade de flebotomíneos em áreas urbanas. Na Índia, a alta densidade populacional humana aliada à presença de micro-ambientes favoráveis à agregação de *Phlebotomus papatasi*, tem levado a um comportamento alimentar de caráter antropofílico em ambientes peridomiciliares (Maroli; Khoury, 2004).

Em áreas onde a transmissão da doença é relativamente alta, a infecção natural de populações de fêmeas *Lutzomyia* spp. por *Leishmania* é de aproximadamente 0,5% (Rogers; Bates, 2007). No presente estudo, foi verificada a taxa de infectividade de 80 fêmeas coletadas em São Gonçalo do Amarante, destas 5% estavam infectadas com *Leishmania chagasi*, percentual 10 vezes maior que o normalmente encontrado. Dados encontrados na literatura mostram que a infecção do vetor por *Leishmania* manipula o comportamento alimentar do inseto, aumentando a eficiência de transmissão do parasito (Rogers; Bates, 2007). A presença do parasito no trato digestivo do inseto também aumenta a persistência de picada do vetor e estimula o repasto em múltiplos hospedeiros, além disso, esses dois aspectos, concomitantemente, promovem a diferenciação do parasito no interior do trato digestivo (Rogers; Bates, 2007). No município de São Gonçalo do Amarante, *Lu. longipalpis* foi a espécie mais encontrada no intradomicílio e a

principal fonte de repasto sangüíneo utilizada pelas fêmeas foram humanos, dentre as fêmeas coletadas, 4 estavam infectadas com *Leishmania chagasi*. Esse cenário explica a ocorrência dos casos de LV humana encontrados no município.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) Fêmeas de *Lutzomyia* spp., criadas em laboratório, apresentaram perfil alimentar eclético, como demonstrado em outros estudos.
- 2) Parâmetros comportamentais, como a escolha da fonte de repasto sanguíneo em laboratório, parecem ter uma maior influência na oviposição do que os níveis de proteínas totais presentes em cada hospedeiro.
- 3) O ciclo biológico de *Lu. longipalpis* é influenciado pela temperatura e umidade relativa do ar. Em condições de laboratório, a elevação da temperatura reduz a duração do ciclo biológico, diminuindo o intervalo para emergência de novos adultos prontos para alimentação em animais infectados por *Leishmania*, aumentando a possibilidade de instalação de um ciclo de transmissão do parasito entre os insetos e vertebrados presentes em áreas endêmicas.
- 4) Os pebas foram preferidos como fonte de alimento para os flebotomíneos quando se compara a galinhas, hospedeiros humanos e cão presentes no peridomicílio em Nísia Floresta.
- 5) Os pebas foram a principal fonte de repasto sanguíneo de fêmeas *Lutzomyia* spp., provavelmente devido a presença de um micro-ambiente favorável à agregação destes insetos. Além disso, esses dados apontam para o possível papel desse animal como fonte de alimento e, conseqüentemente, como elo de cadeias alimentares em ambiente natural, uma vez que, tais vertebrados são freqüentemente encontrados no sertão nordestino, nas mesmas áreas onde os flebotomíneos são capturados e casos de LV são notificados.
- 6) As capturas realizadas em São Gonçalo do Amarante não permitem conclusões acerca da preferência alimentar dos flebotomíneos, por terem sido realizadas predominantemente em ambiente intradomiciliar. No entanto, a taxa de infecção por *Leishmania* chama atenção para os riscos de transmissão do parasito para o homem e para a necessidade de vigilância entomológica constante.

---

---

## REFERÊNCIAS

- AGRELA, I.; SANCHEZ, E.; GOMEZ, B.; FELICIANGELI, M. D. Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela. **J Med Entomol.** v. 39, n. 3, p. 440-445, 2002.
- ALENCAR, J. E.; ALMEIDA, Y. M.; E SILVA, Z. F.; PAIVA, A. S.; DA FONSECA, M. F. [Current aspects of kala-azar in Ceara]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop.** v. 26-27, n., p. 27-53, 1974.
- ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALEXANDER, B.; USMA, M. C. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 88, n. 5, p. 543-549, 1994.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci.** v. 112 Pt 18, n., p. 2993-3002, 1999.
- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Parasitol.** v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.
- AMBROISE-THOMAS, P. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. **Int J Parasitol.** v. 30, n. 12-13, p. 1361-1367, 2000.
- ARIAS, J. R.; MILES, M. A.; NAIFF, R. D.; POVOA, M. M.; DE 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.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.** v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

BARBOSA, P. B. B. M. Estudo sobre a participação de roedores na transmissão de *Leishmania infantum* (Protozoa: Trypanosomatidae) no Rio Grande UFRN, Natal, 2005.

BARRETO, M. P. Sobre a sistemática da subfamília Phlebotominae Rondani (Diptera, Psychodidae). **Revista Brasileira de Entomologia.** v. 3, n., p. 173 - 190, 1955.

BASU, D.; MALLIK, K. K. Changes in age incidence of kala-azar in India. **Indian J Public Health.** v. 39, n. 1, p. 26, 1995.

BATAILLE, M.; CRAINIC, K.; LETERREUX, M.; DURIGON, M.; DE MAZANCOURT, P. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. **Forensic Sci Int.** v. 99, n. 3, p. 165-170, 1999.

BENKOVA, I.; VOLF, P. Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol.** v. 44, n. 1, p. 150-154, 2007.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian J Med Res.** v. 123, n. 3, p. 289-294, 2006.

BOAKYE, D. A.; TANG, J.; TRUC, P.; MERRIWEATHER, A.; UNNASCH, T. R. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. **Med Vet Entomol.** v. 13, n. 3, p. 282-287, 1999.

CAMERON, M. M.; MILLIGAN, P. J.; LLANOS-CUENTAS, A.; DAVIES, C. R. An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes. **Med Vet Entomol.** v. 9, n. 2, p. 127-132, 1995a.

CAMERON, M. M.; PESSOA, F. A.; VASCONCELOS, A. W.; WARD, R. D. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceara State, Brazil. **Med Vet Entomol.** v. 9, n. 3, p. 263-272, 1995b.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; BRANDAO-FILHO, S. P.; READY, P. D.; DAVIES, C. R. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. **Med Vet Entomol.** v. 13, n. 2, p. 209-211, 1999.

---

CARDENAS, G. A.; GONZALEZ-SERVA, A.; COHEN, C. Multiple leg ulcers in a traveler. **Cleve Clin J Med.** v. 71, n. 2, p. 109-112, 2004.

CARDENAS, R.; SANDOVAL, C. M.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; FRANCO-PAREDES, C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 75, n. 2, p. 273-277, 2006.

CAZELLES, B.; HALES, S. Infectious diseases, climate influences, and nonstationarity. **PLoS Med.** v. 3, n. 8, p. e328, 2006.

CHANG, K. P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of Leishmania virulence. **Annu Rev Microbiol.** v. 44, n., p. 499-529, 1990.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 96, n. 26, p. 15155-15160, 1999.

CHAVES, L. F.; PASCUAL, M. Climate cycles and forecasts of cutaneous leishmaniasis, a nonstationary vector-borne disease. **PLoS Med.** v. 3, n. 8, p. e295, 2006.

CHOW, E.; WIRTZ, R. A.; SCOTT, T. W. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **J Am Mosq Control Assoc.** v. 9, n. 2, p. 196-205, 1993.

CHRISTENSEN, H. A.; ARIAS, J. R.; DE VASQUEZ, A. M.; DE FREITAS, R. A. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the central Amazon of Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 31, n. 2, p. 239-242, 1982.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAUJO, M. V. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986]. **Rev Saude Publica.** v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

CROSS, E. R.; HYAMS, K. C. The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. **Environ Health Perspect.** v. 104, n. 7, p. 724-727, 1996.

CROSS, E. R.; NEWCOMB, W. W.; TUCKER, C. J. Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 54, n. 5, p. 530-536, 1996.

CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; CANAVATE, C.; DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. **Indian J Med Res.** v. 123, n. 3, p. 357-388, 2006.

CURTIS, V.; CAIRNCROSS, S.; YONLI, R. Domestic hygiene and diarrhoea - pinpointing the problem. **Trop Med Int Health.** v. 5, n. 1, p. 22-32, 2000.

DA 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.** v. 102, n. 2, p. 149-153, 2007.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 98, n. 7, p. 861-870, 2003.

DE MELO XIMENES MDE, F.; MACIEL, J. C.; JERONIMO, S. M. Characteristics of the biological cycle of *Lutzomyia evandroi* Costa Lima & Antunes, 1936 (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 96, n. 6, p. 883-886, 2001.

DE QUEIROZ, R. G.; VASCONCELOS, A. W.; VASCONCELOS IDE, A.; DE SOUSA, R. N.; PESSOA, F. A.; DE ALENCAR, J. E.; DAVID, J. R. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an American cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturite, Ceara State, northeast Brazil. **Parassitologia.** v. 33 Suppl, n., p. 159-167, 1991.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. [Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara.]. **Hospital (Rio J).** v. 45, n. 6, p. 703-707, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 4, n., p. 198-212, 1962.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol.** v. 2, n. 9, p. 692, 2004.

DIAS FDE, O.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. [Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae)]. **Cad Saude Publica.** v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

DOUGHERTY, M. J.; HAMILTON, J. G.; WARD, R. D. Semiochemical mediation of oviposition by the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Med Vet Entomol.** v. 7, n. 3, p. 219-224, 1993.

EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I.; VASCONCELOS, A. W.; SOUSA ADE, A.; LIMA, J. W.; PEARSON, R. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J Infect Dis.** v. 166, n. 5, p. 1124-1132, 1992.

FORATTINI, O. P.; RABELLO, E. X.; SERRA, O. P.; CONTRIM, M. D.; GALATI, E. A.; BARATA, J. M. [Transmission of cutaneous leishmaniasis in the State of Sao Paulo, Brazil]. **Rev Saude Publica.** v. 10, n. 1, p. 31-43, 1976.

FRANKE, C. R.; ZILLER, M.; STAUBACH, C.; LATIF, M. Impact of the El Nino/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 9, p. 914-917, 2002.

FUNASA. RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DO PROJETO DE CONTROLE DE DOENÇAS ENDÊMICAS NO NORDESTE. v., n., p. 203, 1994.

FUNASA, M. D. S. F. N. D. S.-. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. **Boletim Epidemiológico 2001.** v. 6, n., p. 1-11, 2001.

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunol.** v. 22, n. 7, p. 319-331, 2000.

GONTIJO, C. M. F. M., M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg.** v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

GRIMBERG, J.; NAWOSCHIK, S.; BELLUSCIO, L.; MCKEE, R.; TURCK, A.; EISENBERG, A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. **Nucleic Acids Res.** v. 17, n. 20, p. 8390, 1989.

IBGE. CENSO DEMOGRÁFICO 2000. v., n., p. 520, 2000.

---

IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **J Mol Evol.** v. 32, n. 2, p. 128-144, 1991.

JERONIMO, S. M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; CHENG, C.; MONTEIRO, G. R.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R.; KARPLUS, T. M.; XIMENES, M. F.; OLIVEIRA, C. C.; PINHEIRO, V. G.; PEREIRA, W.; PERALTA, J. M.; SOUSA, J.; MEDEIROS, I. M.; PEARSONI, R. D.; BURNS, T. L.; PUGH, E. W.; WILSON, M. E. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand J Infect Dis.** v. 36, n. 6-7, p. 443-449, 2004.

JERONIMO, S. M.; OLIVEIRA, R. M.; MACKAY, S.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T.; LUZ, K. G.; FERNANDES, M. Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 88, n. 4, p. 386-388, 1994.

KENT, R. J.; NORRIS, D. E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. **Am J Trop Med Hyg.** v. 73, n. 2, p. 336-342, 2005.

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

KING, W. V. B., C. G. The blood feeding habits of malaria-carrying mosquitoes. **American Journal of Hygiene.** v. 3, n., p. 491-496, 1923.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 86, n. 16, p. 6196-6200, 1989.

KOVATS, R. S. El Nino and human health. **Bull World Health Organ.** v. 78, n. 9, p. 1127-1135, 2000.

KOVATS, R. S.; CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; MCMICHAEL, A. J.; WOODWARD, A.; COX, J. S. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v. 356, n. 1411, p. 1057-1068, 2001.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

---

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.** v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature.** v. 273, n. 5664, p. 595-600, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 63, n. 6, p. 741-745, 1969.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature.** v. 266, n. 5603, p. 628-630, 1977.

LANZARO, G. C.; OSTROVSKA, K.; HERRERO, M. V.; LAWYER, P. G.; WARBURG, A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. **Am J Trop Med Hyg.** v. 48, n. 6, p. 839-847, 1993.

LE PONT, F. [Attraction of the armadillo (*Dasypus novemcinctus*, L.) and guinea pigs for phlebotomines in French Guiana]. **Bull Soc Pathol Exot.** v. 83, n. 5, p. 671-676, 1990.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. **Natl Med J India.** v. 7, n. 4, p. 196-200, 1994.

LEONARDO, F. S.; REBELO, J. M. [*Lutzomyia whitmani* periurbanization in a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhao, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 37, n. 3, p. 282-284, 2004.

MAROLI, M.; KHOURY, C. [Prevention and control of leishmaniasis vectors: current approaches]. **Parassitologia.** v. 46, n. 1-2, p. 211-215, 2004.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Vet Parasitol.** v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.

MATSUNAGA, T. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Sci.** v. 51, n., p. 143-148 1998.

---

MENDES WDA, S.; SILVA, A. A.; TROVAO JDE, R.; SILVA, A. R.; COSTA, J. M. [Space expansion of the American visceral leishmaniasis in Sao Luis, Maranhao, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. Leishmaniose visceral (calazar) - Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980 - 2005 **Secretaria de Vigilância Sanitária.** v., n., p., 2006.

MOMEN, H. Emerging infectious diseases--Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 4, n. 1, p. 1-3, 1998.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.

MORTON, I. E.; WARD, R. D. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. **Med Vet Entomol.** v. 3, n. 3, p. 219-223, 1989.

MUKABANA, W. R.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. **Trends Parasitol.** v. 18, n. 11, p. 505-509, 2002.

NGO, K. A.; KRAMER, L. D. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. **J Med Entomol.** v. 40, n. 2, p. 215-222, 2003.

NICHOLLS, N. El nino-southern oscillation and vector-borne disease. **Lancet.** v. 342, n. 8882, p. 1284-1285, 1993.

PANT, C. P. Bloodmeal identification in vectors. **Parasitology Today.** v. 3, n., p. 324 - 326, 1987.

PATZ, J. A.; GRACZYK, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **Int J Parasitol.** v. 30, n. 12-13, p. 1395-1405, 2000.

PINHEIRO, M. J. P., ANDRADE, S.A, CUNHA, J.N. Preservação e exploração de animais silvestres nativos: preás, cutias e mocó. **Caatinga.** v. 6, n., p. 28 - 49, 1989.

PONCE, C.; PONCE, E.; MORRISON, A.; CRUZ, A.; KREUTZER, R.; MCMAHON-PRATT, D.; NEVA, F. *Leishmania donovani* chagasi: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. **Lancet.** v. 337, n. 8733, p. 67-70, 1991.

- QUINNELL, R. J.; DYE, C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. **Med Vet Entomol.** v. 8, n. 3, p. 219-224, 1994.
- QUINNELL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Med Vet Entomol.** v. 6, n. 3, p. 195-200, 1992.
- READY, P. D. The feeding habits of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol.** v. 14, n. 5, p. 545-552, 1978.
- READY, P. D. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol.** v. 16, n. 5, p. 413-423, 1979.
- RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu Rev Entomol.** v. 32, n., p. 463-478, 1987.
- ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathog.** v. 3, n. 6, p. e91, 2007.
- RURANGIRWA, F. R.; MINJA, S. H.; MUSOKE, A. J.; NANTULYA, V. M.; GROOTENHUIS, J.; MOLOO, S. K. Production and evaluation of specific antisera against sera of various vertebrate species for identification of bloodmeals of *Glossina morsitans centralis*. **Acta Trop.** v. 43, n. 4, p. 379-389, 1986.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp Parasitol.** v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am J Trop Med Hyg.** v. 34, n. 3, p. 456-459, 1985.
- SALOMON, O.; SINAGRA, A.; NEVOT, M.; BARBERIAN, G.; PAULIN, P.; ESTEVEZ, J.; RIARTE, A.; ESTEVEZ, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 103, n. 1, p. 109-111, 2008.
- SALOTRA, P.; SINGH, R. Rapid & reliable diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Indian J Med Res.** v. 122, n. 6, p. 464-467, 2005.
- SCHUBACH, T. M.; FIGUEIREDO, F. B.; PEREIRA, S. A.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, I. B.; ANDRADE, M. V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M. C.; SCHUBACH, A. American

cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 98, n. 3, p. 165-167, 2004.

SESAP. DOENÇAS DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA DO RN. v., n., p. 128, 1997.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M. R.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA-LIMA, J. W.; BEVILAQUA, C. M.; PRATA-JUNIOR, R. C.; HOLANDA, C. M.; RONDON, F. C.; BASTOS, K. M.; COELHO, Z. C.; COELHO, I. C.; BARRAL, A.; POMPEU, M. M. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Vet Parasitol.** v. 127, n. 3-4, p. 199-208, 2005.

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

STAAK, C.; ALLMANG, B.; KAMPE, U.; MEHLITZ, D. The complement fixation test for the species identification of blood meals from tsetse flies. **Tropenmed Parasitol.** v. 32, n. 2, p. 97-98, 1981.

TEODORO, U.; LA SALVIA FILHO, V.; DE LIMA, E. M.; SPINOSA, R. P.; BARBOSA, O. C.; FERREIRA, M. E.; LONARDONI, M. V. [Phlebotomine behavior in forest and extraforest environments, in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in northern Parana State, southern Brazil]. **Rev Saude Publica.** v. 27, n. 4, p. 242-249, 1993.

TESH, R. B.; CHANIOTIS, B. N.; ARONSON, M. D.; JOHNSON, K. M. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. **Am J Trop Med Hyg.** v. 20, n. 1, p. 150-156, 1971.

TOBOLEWSKI, J.; KALISZEWSKI, M. J.; COLWELL, R. K.; OLIVER, J. H., JR. Detection and identification of mammalian DNA from the gut of museum specimens of ticks. **J Med Entomol.** v. 29, n. 6, p. 1049-1051, 1992.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONCALVES, A.; VELEZ, I. D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

- VIANNA-MARTINS, A. W., P.; E FALCÃO, A.L. American sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Academia Brasileira de Ciências**. v., n., p., 1978.
- VIEIRA, J. B.; LACERDA, M. M.; MARSDEN, P. D. National reporting of leishmaniasis: the Brazilian experience. **Parasitol Today**. v. 6, n. 10, p. 339-340, 1990.
- WALSH, J. F.; MOLYNEUX, D. H.; BIRLEY, M. H. Deforestation: effects on vector-borne disease. **Parasitology**. v. 106 Suppl, n., p. S55-75, 1993.
- WALTERS, L. L.; CHAPLIN, G. L.; MODI, G. B.; TESH, R. B. Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. **Am J Trop Med Hyg**. v. 40, n. 1, p. 19-39, 1989a.
- WALTERS, L. L.; MODI, G. B.; CHAPLIN, G. L.; TESH, R. B. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Am J Trop Med Hyg**. v. 41, n. 3, p. 295-317, 1989b.
- WHO, W. H. O.-. The world health report 2001. v., n., p., 2001.
- XIMENES MDE, F.; CASTELLON, E. G.; DE SOUZA MDE, F.; MENEZES, A. A.; QUEIROZ, J. W.; MACEDO E SILVA, V. P.; JERONIMO, S. M. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. **J Med Entomol**. v. 43, n. 5, p. 990-995, 2006.
- XIMENES MDE, F.; SILVA, V. P.; QUEIROZ, P. V.; REGO, M. M.; CORTEZ, A. M.; BATISTA, L. M.; MEDEIROS, A. S.; JERONIMIO, S. M. [Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses]. **Neotrop Entomol**. v. 36, n. 1, p. 128-137, 2007.
- XIMENES, M. F.; CASTELLON, E. G.; DE SOUZA, M. F.; FREITAS, R. A.; PEARSON, R. D.; WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **J Med Entomol**. v. 37, n. 1, p. 162-169, 2000.
- XIMENES, M. F.; SOUZA, M. F.; CASTELLON, E. G. Density of sand flies (Diptera: psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral Leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 94, n. 4, p. 427-432, 1999.

YOUNG, D. G. D., M. A. . Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Amer. Entomol Inst.** v. 54, n., p., 1994.

# 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](#)