

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA BOFF BARRETO

PESQUISA DE *LEISHMANIA* POR MEIO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA SUB-FAMÍLIA *PHLEBOTOMINAE* (DIPTERA: PSYCHODIDADE) EM ÁREAS DE OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO DISTRITO FEDERAL

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Brasília
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 990023.

B273p Barreto, Mariana Boff.
Pesquisa de *Leishmania* por meio de reação em cadeia da polimerase e identificação de espécies da sub-família Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal / Mariana Boff Barreto. -- 2011.
71 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2011.
Orientação: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

1. Leishmaniose - Distrito Federal (Brasil).
2. Epidemiologia. I. Sampaio, Raimunda Nonata Ribeiro.
II. Título.

ODU 616.993.161

MARIANA BOFF BARRETO

PESQUISA DE *LEISHMANIA* POR MEIO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA SUB-FAMÍLIA *PHLEBOTOMINAE* (DIPTERA: PSYCHODIDADE) EM ÁREAS DE OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO DISTRITO FEDERAL

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 17 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Pedro Luiz Tauil
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara
Ministério da Saúde

Prof. Dr. David Duarte Lima
Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho à minha
família, meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas inúmeras graças.

Aos meus amados familiares, pelo crédito, incentivo e amor à distância.

À minha orientadora Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, pela oportunidade de exercer as minhas atividades no Laboratório de Dermatologicologia da Universidade de Brasília, por sua orientação e por propiciar as condições necessárias para o desenvolvimento do meu trabalho e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe Torres do Departamento de Biologia Celular, por colocar à disposição o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

A bolsista de desenvolvimento técnico - CNPq - Paula Fernandes Franco e a pós-graduanda da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Fernanda Craveiro Franco, por repassarem suas experiências laboratoriais para que as análises moleculares desta dissertação fossem executadas.

Ao Dr. Alfredo Carlos Rodrigues de Azevedo, da Fundação Oswaldo Cruz - Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, pelo auxílio nas identificações taxonômicas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Dermatologicologia da Universidade de Brasília, Viviane Medeiros, Killarney Soares, Deise Dalila de Oliveira, Ada Urdapileta, Ricardo Fontoura, Brúmmel Rodrigues e Juliana Saboia Fontenele e Silva. Obrigada pela cooperação, dedicação e carinho.

Meu agradecimento especial ao Técnico do Laboratório de Dermatologicologia da Universidade de Brasília, Tércio Rodrigues por seus ensinamentos sobre a técnica de dissecação de flebotomíneos.

Aos meus queridos amigos do Centro de Controle de Zoonoses e da Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal, Maria do Socorro Laurentino de Carvalho pelo ensinamento, Sr. José Maria de Queiroz e ao Sr. Divino Eternos dos Santos, bem como a toda equipe que tanto me ajudou com o aprendizado sobre flebotomíneos.

Ao técnico em saúde do Ministério da Saúde Mardones da Costa Flores Sobrinho pelo empréstimo das armadilhas utilizadas neste estudo.

A pós-graduanda e grande amiga Andréa Lisboa Carneiro sempre pronta a me auxiliar e aconselhar.

Ao amigo João Krebs que salvou a formatação da minha dissertação com sua mágica do “super gêmeos ativar”.

Aos amigos distantes que abriram mão de minha companhia para que eu pudesse trilhar esse caminho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.
Cora Coralina

RESUMO

As leishmanioses são protozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, as quais são transmitidas pela picada de insetos pertencentes à família *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae). A leishmaniose tegumentar americana é notificada no Distrito Federal, mas seus transmissores ainda são desconhecidos. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a infecção natural por *Leishmania* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em flebotomíneos capturados na Região Administrativa de Sobradinho, nas localidades de Boa Vista e Fercal. Foram capturadas as espécies *Lutzomyia whitmani* (89%), *Lutzomyia bacula* (7%), *Lutzomyia davisii* (3%) e *Lutzomyia termitophila* (1%). O maior percentual de flebotomíneos foi encontrado no peridomicílio (58%). A reação em cadeia da polimerase teve resultado negativo para a presença de *Leishmania* nos exemplares capturados. É provável que possa estar havendo transmissão peridomiciliar e que *Lutzomyia whitmani* seja o principal vetor.

Palavras-chave: *Lutzomyia*, epidemiologia, leishmaniose tegumentar americana, Distrito Federal.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoan of the genus *Leishmania* which are transmitted by the bite of insects belonging to the family *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae). Cutaneous leishmaniasis is reported in the Federal District, but their transmitters are still unknown. The objective of this study was to investigate the natural infections by *Leishmania* by polymerase chain reaction (PCR) in sand flies in the Sobradinho Administrative Region, in the localities of Boa Vista and Fercal. Species were captured *Lutzomyia whitmani* (89%), *Lutzomyia bacula* (7%), *Lutzomyia Davis* (3%) and *Lutzomyia termitophila* (1%). The highest percentage of sand flies were found in peridomicile habitats (58%). The polymerase chain reaction was negative for the presence of *Leishmania* in specimens captured. It is possible that there may be transmission and peridomicile *Lutzomyia whitmani* is the main vector.

Key - words: *Lutzomyia*, epidemiology, leishmaniasis, Federal District.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos e coeficientes de detecção da leishmaniose tegumentar americana por 100.000 habitantes, no Distrito Federal.

Figura 2: Regiões Administrativas do Distrito Federal.

Figura 3: Fêmea de flebotomíneo adulta, ingurgitada.

Figura 4: Mapa do Distrito Federal mostrando áreas de risco para leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral.

Figura 5: Mapa mostrando os locais de captura de flebotomíneos na Região Administrativa de Sobradinho, localidades de Boa Vista e Fercal, Distrito Federal.

Figura 6: Fotografia de armadilha luminosa tipo CDC utilizada para a captura de flebotomíneos na localidade de Boa Vista, Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal.

Figura 7: Distribuição percentual de flebotomíneos fêmeas e machos capturados no período de março de 2009 a março de 2010, na Região Administrativa de Sobradinho, localidades de Boa Vista (Sítio Copaíba) e Fercal (casa 1 e casa 2), Distrito Federal.

Figura 8: Espermateca dissecada da fêmea de *L. whitmani*, fotodocumentada em microscópio óptico com aumento de 400x.

Figura 9: Espermateca dissecada da fêmea de *L. bacula*, fotodocumentada em microscópio óptico com aumento de 400x.

Figura 10: Espermateca dissecada da fêmea de *L. davisii*, fotodocumentada em microscópio óptico com aumento de 400x.

Figura 11: Espermateca dissecada da fêmea de *L. termitophila*, fotodocumentada em microscópio óptico com aumento de 400x.

Figura 12: Distribuição percentual de flebotomos fêmeas identificadas por espécie. Coletas realizadas na Região Administrativa de Sobradinho: localidades de Boa Vista (Sítio Copaíba) e Fercal (casa 1 e casa 2), no período de março de 2009 a março de 2010.

Figura 13: Distribuição percentual de flebotomos machos identificados por espécie. Coletas realizadas na Região Administrativa de Sobradinho: localidades de Boa Vista (Sítio Copaíba) e Fercal (casa 1 e casa 2), no período de março de 2009 a março de 2010.

Figura 14: Percentuais de fêmeas de *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia bacula*, *Lutzomyia davisii* e *Lutzomyia termitophila* capturadas nos diferentes ecótipos no período de março de 2009 a março de 2010.

Figura 15: Dados da distribuição mensal de flebotomíneos coletados no período de março de 2009 a março de 2010, na Região Administrativa de Sobradinho, nas localidades da Boa Vista, Fercal 1 e Fercal 2, Brasília, Distrito Federal.

Figura 16: Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania braziliensis*). Linhas: 1 a 8 fêmeas de *Lutzomyia whitmani*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA)

Figura 17: Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania braziliensis*). Linhas: 9 a 23 fêmeas de *Lutzomyia whitmani*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA)

Figura 18: Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania braziliensis*). Linhas: 24 a 40 fêmeas de *Lutzomyia whitmani*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA).

Figura 19: Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania braziliensis*). Linhas: 41 e 42 fêmeas de *Lutzomyia whitmani*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos atuais da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal.

Tabela 2: Relação de vetores da leishmaniose tegumentar americana e as respectivas *Leishmanias* infectantes.

Tabela 3: Distribuição do número total e percentual de fêmeas flebotomíneos, separadas por local de coleta e espécies encontradas. Coletas realizadas na Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil.

Tabela 4: Distribuição percentual de fêmeas de flebotomíneos capturadas por ecótopos trabalhados no período de março de 2009 a março de 2010, nas localidades de Boa Vista e Fercal, na Região Administrativa de Sobradinho no Distrito Federal.

Tabela 5: Tubos numerados contendo *pool* de 5 a 10 fêmeas de flebotomíneos da mesma espécie e suas respectivas concentrações medidas no espectrofotômetro NanoDrop. Coletas realizadas nas localidades de Boa Vista e Fercal, Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

DF - Distrito Federal

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético

G - Gramas

LC - Leishmaniose Cutânea

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

LV - Leishmaniose Visceral

mM - Milimolar

ml - Mililitro

M - Molar

NaCl - Cloreto de Sódio

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pb - Pares de bases

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

RA - Região Administrativa

RNA - Ácido Ribonucléico

RPM - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TAE - Tris-acetato

Taq - *Thermus aquaticus*

Tris-HCl - Tampão ácido acético

UF - Unidades Federadas

UV - Ultravioleta

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3	A LEISHMANIOSE NO DISTRITO FEDERAL	19
	3.1 GEOGRAFIA DO DISTRITO FEDERAL.....	20
	3.2 CARACTERÍSTICAS DO CICLO DE <i>LEISHMANIA</i>	21
	3.3 BIOLOGIA GERAL DOS FLEBÓTOMOS.....	23
4	OBJETIVOS	26
	4.1 OBJETIVO GERAL	26
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	MÉTODOS	27
	5.1 LOCAIS DE CAPTURA	27
	5.2 MÉTODO DE CAPTURA.....	28
	5.3 DISSECÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS E EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>LEISHMANIA</i>	29
	5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	30
	5.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	31
6	RESULTADOS	33
	6.1 ESTUDO ENTOMOLÓGICO.....	33
	6.2 CONCENTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	39
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÃO.....	48
9	BIBLIOGRAFIA.....	49
10	APÊNDICES.....	59
11	ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

As ocorrências dos casos humanos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) crescem devido a diversos fatores, e na maioria das situações, a ação antrópica está diretamente relacionada a esse aumento.

Os desmatamentos com fins de assentamentos populacionais, garimpos, abertura de novas rodovias, e expansão agropecuária, favorece a degradação ambiental e também a exploração dos recursos naturais, que por sua vez, acaba por impactar a vida da população (1), onde o homem acaba inserido no ciclo silvestre da leishmaniose.

No início, a doença era comum em indivíduos que trabalhavam na exploração florestal, mas com o aumento do fluxo migratório da população houve alteração no equilíbrio bioecológico da doença, levando à expansão da endemia para regiões periurbanas. Assim, a leishmaniose tegumentar americana apresenta diferentes padrões epidemiológicos, caracterizados conforme a transmissão: silvestre com ocorrência em áreas de vegetação primária, constituindo uma zoonose de animais silvestres; ocupacional com transmissão associada à exploração das florestas; e periurbana que ocorre em centros urbanos associada às matas secundárias com adaptação do vetor ao peridomicílio e intradomicílio (2).

Nesse contexto social importante, a leishmaniose tegumentar americana inicialmente costumava acometer pessoas simples e de poder aquisitivo baixo, residentes em zona rural.

Ainda hoje, os indivíduos do sexo masculino em idade produtiva são os mais susceptíveis, o que ocasiona sérios prejuízos à economia do país, pois muitos trabalhadores se afastam de seus serviços devido às limitações físicas, sendo vítimas do preconceito causado pelo aspecto mutilante e desfigurante das suas lesões, além do envolvimento psicológico com a doença (2, 3, 4, 5).

A LTA é uma doença crônica de infecção não contagiosa, que tem como agentes etiológicos diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem pele e mucosas (5).

Esta é uma doença zoonótica, que pode atingir secundariamente ao homem (6). A transmissão dos parasitos entre seus reservatórios primários e, acidentalmente, para o homem, é feita durante a hematofagia das espécies de

flebotomíneos vetores (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (7,8). A fauna de flebotomíneos de uma determinada área sofre a influência de algumas variáveis, entre as quais se destacam o índice pluviométrico e a relativa disponibilidade de alimentos que podem servir de atrativo (9). A LTA é uma enfermidade de alta incidência em muitas áreas tropicais e subtropicais do mundo, constituindo em vários países da América Latina um grave problema de saúde pública (10).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as leishmanioses como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, devido seu alto coeficiente de infecção e capacidade de produzir deformidades. Atualmente estima-se que mais de 350 milhões de pessoas em 88 países ao redor do mundo estejam em áreas de risco (11).

Ao analisar a evolução da doença no Brasil observa-se uma expansão geográfica. No início da década de 1980, foram registrados casos autóctones em 19 Unidades Federadas (UF), já em 2003 a autoctonia foi confirmada em todas as UFs do país; sendo que, no ano de 2008, foram registrados 19.542 casos, no qual, a região Norte contribuiu com o 86 casos por 100.000 habitantes, e o Centro-Oeste 37,5 casos por 100.000 habitantes (12).

Como já foram encontradas evidências de transmissão autóctone da doença no Distrito Federal (DF) (14, 15, 16, 17), este estudo propõe a identificação dos insetos vetores da LTA e também a constatação se os mesmos estão infectados pelo protozoário *Leishmania*.

Tradicionalmente, os estudos acerca das taxas de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* são realizados a partir da visualização microscópica do tubo digestivo do inseto dissecado ou pelo isolamento do parasito *in vivo* ou *in vitro*. No entanto, estes procedimentos possuem uma baixa precisão de dados, já que possuem pouca eficácia e sensibilidade, além de gastar muito tempo.

Portanto, o desenvolvimento de métodos diferenciados para a identificação dos parasitos nos vetores é relevante tanto para estudos epidemiológicos como entomológicos. Recentes trabalhos apontam a reação em cadeia da polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como um método molecular de grande importância para estas pesquisas (18).

A base desta reação é a replicação *in vitro*, onde se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação

de modo exponencial. Esta técnica é tão sensível que uma única molécula de DNA pode, teoricamente, servir de molde para a amplificação, podendo posteriormente ser visualizada, por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (18).

Esta técnica vem sendo utilizada por vários estudiosos tanto na detecção do RNA ou DNA do parasito (19) para diagnósticos em humanos (20, 21), caninos (22), e em flebotomíneos (23, 24, 25, 26).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A leishmaniose tegumentar americana acompanha o homem desde a antiguidade. Índios do Peru pré-colombiano que trabalhavam com cerâmica representaram em seus *huacos* lesões muito semelhantes às encontradas nessa moléstia. Em 1908, Tamayo, parece ter sido o primeiro a identificar as lesões dos *huacos* como a doença conhecida no Peru com o nome de *uta*, isto é, leishmaniose cutâneo-mucosa.

Posteriormente, por meio de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (27). Já no Brasil, às primeiras descrições datam de 1917, onde Rabello relata ter encontrado referências de uma viagem feita pelo Frei Don Hipolito Sanchez Rangel de Fayos y Quirós, desde Tabatinga-AM até o Pará, verificando menção à presença da doença nas regiões da Amazônia desde o ano de 1827 (28).

Em 1895, Breda descreveu-a com a observação de italianos que haviam retornado de São Paulo (29). No mesmo ano, Moreira, identifica no Brasil a existência do botão endêmico dos países quentes, sendo denominado botão da Bahia (30).

No início do século, por volta de 1905, com o início da construção da estrada de ferro Noroeste, surge no Estado de São Paulo, na região de Bauru, uma epidemia de úlceras cutâneas, que posteriormente davam lugar a localizações mucosas, sendo principalmente encontradas entre os operários que trabalhavam na estrada de ferro.

Foi Lindenberg, em 1909, que identificou os corpúsculos de *Leishman Wright*, sendo esse achado confirmado também por Carini e Paranhos (31). Miranda, em 1910, descreve o primeiro caso da forma mucosa em São Paulo, e, no mesmo ano, Splendore encontra o parasito em lesões mucosas. Em 1911, Pedroso e Silva obtêm culturas de *Leishmanias* (6).

Na atualidade a leishmaniose cutânea é encontrada nas Américas, Europa, África e Ásia, constituindo um problema de saúde pública (32).

O Brasil apresenta nos últimos anos um processo de expansão da doença em todas as regiões, tanto em áreas notoriamente endêmicas, como incidência em novas áreas, caracterizada não só pelo aumento expressivo no número de casos, mas também por apresentar uma importante difusão espacial (33). O

número de casos confirmados chegou a 490.606, no período de 1980 a 2001, número provavelmente subestimado devido às dificuldades e falhas relativas à notificação compulsória no Brasil (34). Com esses valores o país está entre os cinco com a maior incidência de casos, destacando-se as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (35).

3 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO DISTRITO FEDERAL

Esta zoonose tem apresentado nos últimos 20 anos um largo crescimento e dentre as cinco regiões brasileiras, a Região Centro-Oeste figura como a terceira em incidência e a primeira em crescimento da doença (36).

No ano de 1980, estudos relataram o primeiro caso autóctone de LTA em uma criança de dois anos procedente da Região Administrativa Núcleo Bandeirante e que nunca havia saído do DF (37). Após isso, em 1999 foram notificados 11 novos casos (38).

Em 2003 ocorreu um surto da doença com 31 casos autóctones, sendo 27 notificados na Região Administrativa de São Sebastião. Nos anos de 2003, 2004 e 2005 o número de casos notificados de acordo com os dados do Ministério da Saúde foram respectivamente de 31, 57 e 26. Já nos anos de 2006, 2007 os números foram de 50 e 35, respectivamente ocupando o 3º e 4º lugares na série histórica, período cuja ocorrência da doença esteve mais amplamente distribuída.

Em 2008 foram registrados 37 casos. No período de 2009, o número de casos notificados foi 44 e em 2010 um total de 69 notificações, ressaltando a provável autoctonia da LTA no Distrito Federal (39).

O número de casos e dados dos coeficientes de detecção da leishmaniose tegumentar americana (Figura 1) e indicadores epidemiológicos (Tabela 1) por número de habitantes nos anos de 2007 a 2010 são mostrados abaixo.

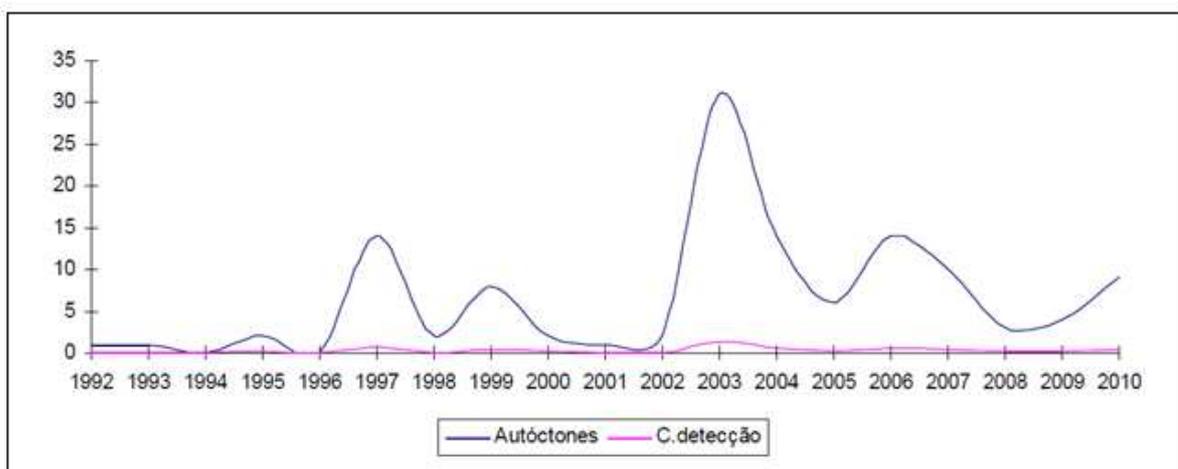


Figura 1 Número de casos e coeficientes de detecção da leishmaniose tegumentar americana por 100.000 habitantes, no Distrito Federal, Brasil. Fonte: Sistema de informação de agravos e notificação/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde - SINAN/SVS/MS

Tabela 1 - Dados epidemiológicos atuais da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil. Fonte: Sistema de informação de agravos de notificação - SINAN

Informações sobre a LTA no Distrito Federal	Ano			
	2007	2008	2009	2010
Nº total de casos confirmados <u>notificados</u> ao ano.	71	37	44	69
% de casos residentes em outros estados.	43%	40,5%	25%	27,5%
Nº casos novos residentes no DF, <u>diagnosticados</u> no ano.	35	20	30	36
Nº casos autóctones	10	3	3	13
Coeficiente de detecção 100.000hab.	0,42	0,15	0,11	0,5

3.1 GEOGRAFIA DO DISTRITO FEDERAL

O Distrito Federal está localizado na latitude 15°47'27" Sul e longitude 47° 52'55" Oeste e possui uma área de 5.801,937 km² com altitude média de 1.100 metros. Seu relevo é caracterizado pela presença de todos os tipos de vegetação que o cerrado normalmente engloba: matas ciliares; cerrado propriamente dito com pequenos arbustos e árvores retorcidas; cerradão, vegetação de transição entre o cerrado e a mata, e os campos, onde predominam as gramíneas (40).

A fauna existente é asseguradamente muito rica. Dos vertebrados, os mais conhecidos são as espécies comuns do cerrado, como lobo-guará, o tucano e raramente, a onça. Dentre as suas características, é reconhecida como a savana mais rica do mundo em biodiversidade, possuindo várias espécies exclusivas e um grupo de insetos muito abundante (40).

O clima predominante é do tipo tropical de savana e temperado chuvoso, com duas estações do ano bem definidas, verão e inverno, sendo o primeiro chuvoso e o segundo seco e a temperatura média é de 20,5°C (69° F). O período chuvoso tem duração de seis meses (de outubro a março) sendo que os meses de maior pluviosidade são novembro, dezembro e janeiro. A precipitação média anual é de 1.578,5 mm e a umidade relativa do ar é baixa, variando entre 25% durante o inverno e 68% no verão (40).

O solo da região é pobre em nutrientes, mas rico em ferro e alumínio. A fertilidade natural é baixa e a cor predominante é vermelha amarelada. De antiga

formação, a superfície do solo tem pouca capacidade de absorver água, porém, abaixo dele há uma grande reserva da mesma.

O Distrito Federal é dividido em 30 Regiões Administrativas (RA) oficiais: Plano Piloto, Gama, Taguatinga, Brazlândia, Sobradinho, Sobradinho II, Planaltina, Paranoá, Núcleo Bandeirante, Ceilândia, Guará, Cruzeiro, Samambaia, Santa Maria, Agrovila São Sebastião, Recanto das Emas, Lago Sul, Lago Norte, Riacho Fundo, Riacho Fundo II, Candangolândia, Águas Claras, Varjão, Jardim Botânico, Sudoeste/Octogonal, Park Way, Setor Complementar de Indústria e Abastecimento (Estrutural), Setor de Indústria e Abastecimento (SIA), Itapoá e Vicente Pires (Figura 2).



Figura 2 Regiões Administrativas do Distrito Federal. Fonte: Secretaria de Turismo do Distrito Federal - SETUR

3.2 CARACTERÍSTICAS DO CICLO DE *LEISHMANIA*

A leishmaniose tegumentar americana é caracterizada como uma doença infecto-parasitária que tem como agentes etiológicos diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem pele e mucosa podendo apresentar diferentes formas clínicas (41). Seus reservatórios primários são animais silvestres e ocasionalmente esta doença afeta o homem (42).

Estes parasitos possuem a seguinte posição taxonômica (43):

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866

Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: MASTIGOPHORA Desing, 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, Vickerman, 1976

Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, Grobben, 1905

Gênero: LEISHMANIA Ross, 1903

O gênero *Leishmania* compreende parasitos protozoários, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro.

Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, incluindo marsupiais, roedores, desdentados, carnívoros e primatas, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos.

Nos flebotomíneos a *Leishmania* vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sangüíneo, diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas (44).

Atualmente aceita-se classificar as *Leishmanias* que infectam o homem em complexos fenotípicos, agrupados em dois subgêneros, cada um englobando várias espécies (45). O subgênero *Viannia* que inclui o complexo *braziliensis*, *guyanensis*, *lainsoni* e *naiffi* e o subgênero *Leishmania* que inclui o complexo *mexicana mexicana*, *infantum*, *amazonensis*, *enrieti*, *hertigi* (7).

No Brasil, os agentes etiológicos da LTA de importância médica e entomológica pertencem a 6 diferentes espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*: *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) shawi*, *L.(V.) naiffi* e *L.(V.) lainsoni*, e frequentemente produz lesões em áreas expostas do corpo, como membros, pescoço e face (46).

3.3 BIOLOGIA GERAL DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebótomos encontram-se distribuídos por todas as regiões faunísticas do globo. Mas, como ocorre com muitos outros insetos, as diferentes partes da superfície da terra são habitadas por diversas espécies. Isto pode se dar, dentre vários fatores e não exclusivamente, pela diversidade climática.

Os flebotomíneos são raros em regiões muito frias e ocorrem em regiões temperadas durante os meses quentes. Mas é nas regiões tropicais que são encontrados em maior número de espécies e em abundância durante o ano todo (47).

Algumas espécies de flebótomos vivem em associação íntima com o homem e animais domésticos, nas proximidades ou, mesmo no interior de suas habitações. Alguns outros são encontrados em pequenas matas ou capoeiras, podendo, contudo, freqüentar as habitações humanas casualmente. Geralmente não se afastam muito de seus criadouros, mesmo podendo se deslocar por até 1 km a maioria não vai além de 250 m (48).

Os flebotomíneos existentes no Novo Mundo pertencem à Classe *Insecta*, Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gêneros *Lutzomyia* (França, 1924), *Brumptomyia* (França e Parrot, 1921) e *Warileia* (Herting, 1940). Enquanto no Velho Mundo são conhecidos os Gêneros *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840), *Sergentomyia* (França e Parrot, 1920) e *Chinius* (Leng, 1987). As espécies de importância médica pertencem aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.

São conhecidos pela sua atividade crepuscular, e, geralmente, começam a abandonar seus abrigos ao entardecer, mas a atividade se torna máxima após o pôr do sol, assim permanecendo durante algumas horas. À medida que a noite avança a atividade diminui. Entretanto, conforme observações realizadas (49, 50, 51), esses insetos também podem ser vistos em atividade durante o dia.

Nos ambientes naturais podem ser encontrados em lugares como estábulos, galinheiros, chiqueiros, canis, tocas de animais silvestres, e também no interior de habitações humanas. Popularmente são conhecidos como mosquito palha, asa branca, birigui, cangalha, dependendo da região (52).

São insetos que medem de 1,5 a 3 milímetros de comprimento, possuindo o corpo revestido por pêlos de coloração clara, como cor de palha ou castanho

claro. Seus vôos são curtos e baixos, caracterizando-se por um aspecto saltitante (53).

Tanto as fêmeas (Figura 3) como os machos podem alimentar-se de seiva e sucos vegetais, porém somente as fêmeas são hematófagas obrigatórias. Estas apresentam uma cabeça pequena e alongada, fortemente fletida para baixo, o que o confere um aspecto giboso (corcunda). Seu aparelho bucal é do tipo picador-sugador, composto por um par de mandíbulas, um par de maxilas e lábio inferior, cuja goteira dorsal serve de estojo para as peças bucais (54).



Figura 3 Fêmea de flebotomíneo adulta, ingurgitada. Fonte: Brasil, 2007

Seus palpos maxilares são compostos por cinco segmentos. No assoalho da cavidade bucal têm estruturas quitinizadas providas de dentes e denticulos quitinosos.

O sangue ingerido serve de fonte de proteínas e aminoácidos para estimular o desenvolvimento ovariano. O número de ovos produzidos está diretamente relacionado à quantidade de sangue ingerido (54), sendo que a postura varia de 40 a 70 ovos depositados em lugares úmidos e com matéria orgânica (55, 56).

O inseto pode completar um ciclo de ovo até a forma adulta em cerca de 30 a 40 dias e seu período de vida na forma adulto pode chegar a 30 dias.

No momento da postura os ovos são brancos, alongados e medem cerca de 0,3 mm, passando depois a uma coloração castanha ou negra. As larvas

vermiformes alimentam-se de matéria orgânica do solo e após 15 a 70 dias formam-se as pupas que atingirão a maturidade em 1 a 2 semanas (57).

Cerca de 900 espécies estão distribuídas pelos continentes. Nas Américas, das 470 espécies conhecidas, 60 são reconhecidas como vetoras em potencial.

As vetoras reconhecidas apresentam distribuição geográfica que coincide com a doença, são antropofílicas, existem em alta densidade, têm contato com reservatórios, infectando-se e transmitindo o parasito. Já as vetoras em potencial são capturadas em áreas endêmicas, geralmente em simpatria com as demais, porém até o momento, não foram encontradas infectadas naturalmente.

Existem evidências de que as interações entre os flebotomíneos e as *Leishmanias* (58, 59) possuam um caráter espécie-específico (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação de vetores da leishmaniose tegumentar americana e as respectivas *Leishmanias* infectantes, distribuídas no Brasil

Vetor	<i>Leishmania</i>
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942)	<i>L. (L.) amazonensis</i>
	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>Lutzomyia whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	<i>L. (V.) guyanensis</i>
	<i>L.(V.) shawi</i>
<i>Lutzomyia umbratilis</i> (Ward e Frahia, 1977)	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<i>Lutzomyia intermedia</i> (Lutz & Neiva, 1912)	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>Lutzomyia wellcomei</i> (Shaw e Lainson, 1971)	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>Lutzomyia migonei</i> (França, 1920)	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i> (Mangabeira, 1942)	<i>L.(V.) lainsoni</i>

Embora não comprovadas como vetoras, *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926) e *Lutzomyia fischeri* (Pinto, 1926), têm sido encontradas com certa frequência no peridomicílio de áreas com transmissão da doença (60).

Vale ressaltar que o papel vetorial de cada espécie dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino, e que cada espécie de *Leishmania* apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, padrões epidemiológicos, distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (61).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as espécies de flebotomíneos incidentes em área do Distrito Federal e sua eventual infecção natural por *Leishmania*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar a presença dos vetores da leishmaniose tegumentar americana em três pontos de coleta na Região Administrativa de Sobradinho no Distrito Federal, onde ocorreram casos de LTA;
2. Identificar a diversidade da fauna flebotomínica coletada na Região Administrativa de Sobradinho no Distrito Federal, com ocorrência da doença;
3. Determinar a distribuição mensal das espécies capturadas na região Administrativa de Sobradinho no Distrito Federal
4. Verificar os ecótopos de maior ocorrência de flebotomíneos nas áreas estudadas.

5 MÉTODOS

5.1 LOCAIS DE CAPTURA

Os insetos utilizados neste trabalho foram capturados pela executora do projeto que obteve informações sobre os locais de coleta com o auxílio da equipe da Diretoria de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde do Distrito Federal.

Os pontos de coleta disponibilizados pela equipe são baseados em relatórios fornecidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), onde o critério utilizado é a presença de residências em locais prováveis de infecção (LPI). O Distrito Federal possui áreas de risco, com vetores específicos para cada localidade (Figura 4).

As coletas dos flebotomíneos foram realizadas com periodicidade mensal, durante três noites consecutivas no período de março de 2009 a março de 2010 nas localidades de Boa Vista e Fercal, pertencentes à Região Administrativa de Sobradinho (Figura 5).

O Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Ciências Médicas e o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília foram parceiros na triagem e análise dos insetos.

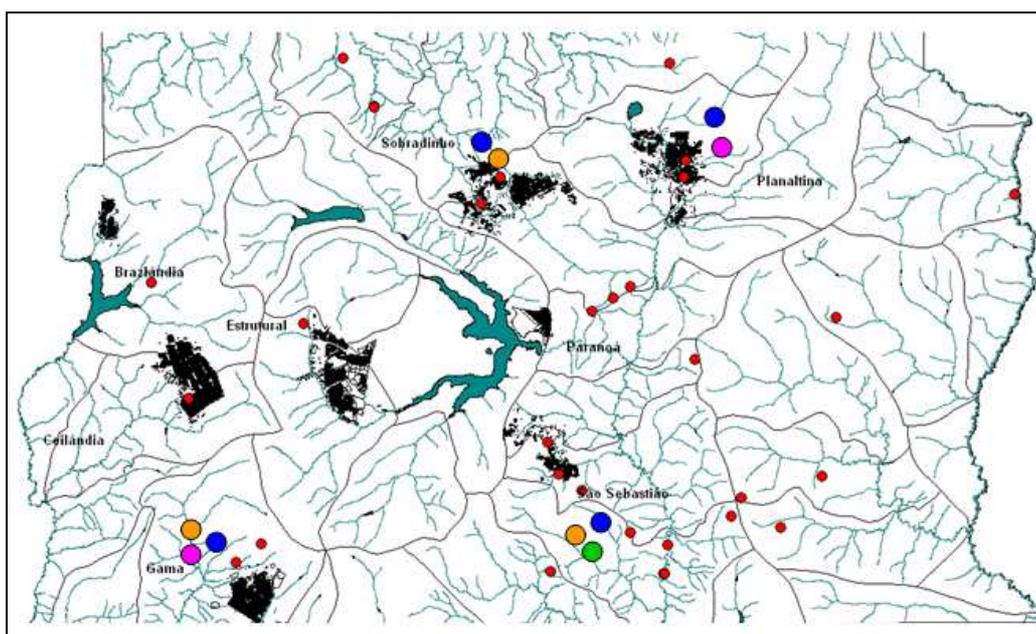


Figura 4 Mapa do Distrito Federal mostrando áreas de risco para leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral. Pontos em azul caracterizam

áreas de captura do flebótomo *L. whitmani*; em laranja do flebótomo *L. longipalpis*; em verde do flebótomo *L. intermedia*; em rosa do flebótomo *L. flaviscutelata*. Os pontos menores em vermelho são casos registrados e confirmados de LTA. Fonte: Sistema de Informação Territorial e Urbana do Distrito Federal - SITURB com adaptações

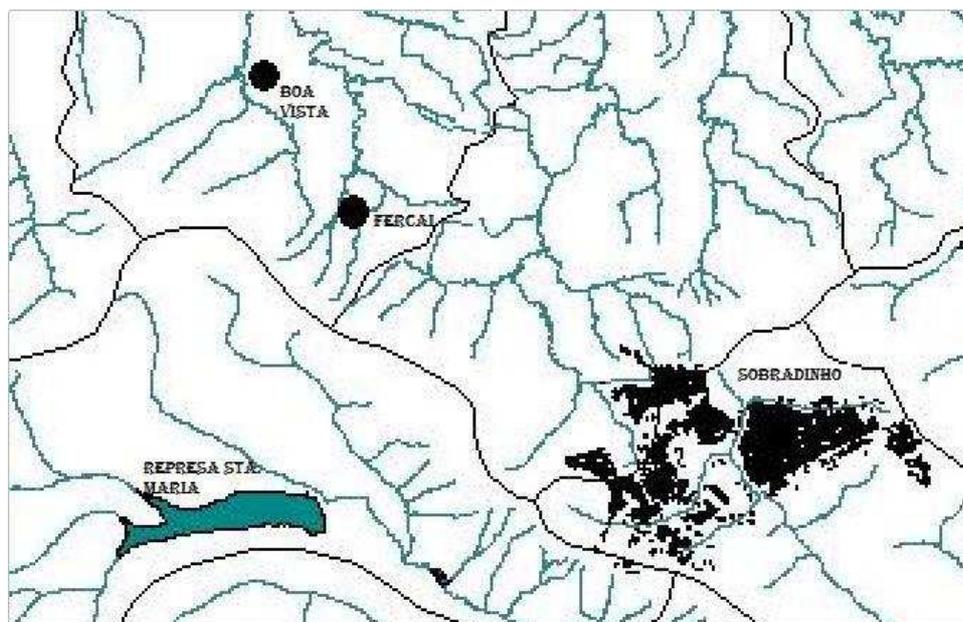


Figura 5 Mapa mostrando os locais de captura de flebotomíneos na Região Administrativa de Sobradinho, localidades de Boa Vista e Fercal, Distrito Federal, Brasil. Fonte: Companhia de Planejamento do Distrito Federal - CODEPLAN com adaptações

5.2 TÉCNICA DE CAPTURA

Para capturar os flebótomos, foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC (Center for Disease Control) (1, 62, 63) alimentadas com baterias de 12 volts cada (Figura 6).

As armadilhas luminosas automáticas CDC foram instaladas ao entardecer e permaneceram ligadas ininterruptamente das 18 às 8 horas da manhã seguinte, a uma distância de até 1,5 metros do solo. Em todos os pontos de coleta foram colocadas de três a cinco armadilhas, distribuídas no peridomicílio (galinheiro, aprisco e chiqueiro), cerrado e intradomicílio (dormitório e sala); o número de

armadilhas por estação de coleta foi variável concernente ao número de ecótopos existentes em cada local de captura.

Neste tipo de armadilha utilizada os insetos são atraídos pela luz e pousam no tecido da mesma, neste momento ocorre à captura por meio de aspiração, que é feita através de um pequeno ventilador para dentro do tecido do capturador.

O material coletado foi transportado ao Laboratório de Dermatômica da Universidade de Brasília, devidamente acondicionado em isopor preenchido com gelo para a conservação do mesmo.



Figura 6 Fotografia de armadilha luminosa tipo CDC utilizada para a captura de flebotomíneos na localidade de Boa Vista, Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil. Fonte: acervo particular

5.3 DISSECÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS E EXTRAÇÃO DO DNA DE *LEISHMANIA*

Primeiramente, os flebotomíneos foram separados de outros insetos, e em seguida separados em grupos de fêmeas e machos.

As fêmeas, alvo desta pesquisa, foram submetidas à dissecção das espermatecas (64) em Lupa Forty Spencer modelo 591714 e a identificação das espécies foi concluída em Microscópio Óptico Zeiss Axiolab com aumento de 400x.

Com a identificação das espécies finalizada, os insetos foram separados em grupos contendo de 5 até 10 exemplares fêmeas pertencentes a mesma espécie, totalizando 42 tubos.

Os flebótomos ficaram acondicionados em tubos eppendorf, preservados em salina e congelados a -20 °C em freezer exclusivo até a sua utilização.

Para a extração do DNA de *Leishmania*, os flebotomíneos foram colocados inteiros em tampão de lise (200 mM NaCl, 100 mM TrisHCL, pH) 8,5, 5mM EDTA, 0,2% dodecil sulfato de sódio - SDS e água miliQ) e incubados a 56 C° overnight com 12.5 mg/ml de proteinase K.

No dia seguinte, os flebótomos permaneceram no calor de 95C° por 10 minutos para inativar a proteinase K, passando por um breve resfriamento em banho de gelo. Para a precipitação do SDS, foi adicionado acetato de potássio na concentração final de 1molar (M).

Em seguida foram incubados em gelo por 1 hora, centrifugados a 13.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi removido para novos tubos, onde 650ul de isopropanol foram acrescentados e os tubos foram invertidos por 20x.

Novamente foram centrifugados a 13.000 RPM, por 10 minutos. Nesta etapa o sobrenadante foi descartado e os tubos submetidos à centrifugação por 30 segundos. O restante do líquido foi mais uma vez descartado com muito cuidado para que os “pellets” contidos no fundo dos tubos não fossem movimentados.

Ao material restante foi adicionado 150ul de etanol 70% com nova etapa de centrifugação a 13.000 RPM, por tempo de 10 minutos.

O sobrenadante foi removido e os “pellets” foram acondicionados no fluxo da capela por aproximadamente 10 minutos para aceleração no processo de secagem. Os sedimentos foram ressuspensos em 50 ul de água miliQ e incubados a 37°C por 30 minutos com agitação ocasional. A concentração de DNA de cada amostra foi medida no Nano Drop e as amostras foram conservadas novamente a -20°C (24).

5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Trata-se de uma técnica descrita por Kary Mullis nos anos 80, que revolucionou a genética molecular por permitir a rápida clonagem e a análise do

DNA. É um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de seqüências - alvo de DNA definidas, presentes em uma preparação de DNA. Geralmente, o método é programado para permitir a amplificação seletiva de uma seqüência-alvo de DNA específica a partir de DNA total previamente extraído (65).

Para a detecção da infecção de flebotomíneos por *Leishmania*, foram utilizados os seguintes iniciadores para a realização da PCR: 150 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT (C/G)CGAA-3' e 152 5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT (A/T)TTACACCAACCCC-3' dirigidos para a região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania* gerando um produto de 120 pb (66).

A reação foi realizada em um volume final de 20µl, sendo composta por 4ml de DNA genômico, Tampão para PCR 1X (Invitrogen); 1mM de cada primer; 1,5mM MgCl₂; 200mM de cada dNTPs e 1U de Taq DNA polimerase. A amplificação das amostras aconteceu nas seguintes condições térmicas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto, ligação dos iniciadores a 61°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo foi utilizado DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* extraído de cultura de formas promastigotas em meio Schneider, identificada por PCR na presença de enzima de restrição BSR I. Como controle negativo utilizou-se água ultrapura sem a adição de DNA.

5.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose é um método simples e eficiente que permite separação, identificação e purificação de moléculas de DNA. As moléculas são separadas pela da migração de partículas no gel, com a aplicação de uma diferença de potencial elétrico, onde as moléculas de menor massa migram mais rápido. A adição de corante fluorescente, que se intercala entre as bases do DNA, e o uso de radiação ultravioleta permitem a visualização e a fotografia (67).

A concentração do gel utilizado neste trabalho foi de 1,5%. Na preparação foi utilizado 1,35g de agarose (Uniscence) em 90 ml de Tris-acetato (TAE 01X pH 8,0), aquecido em microondas até dissolução da agarose, após esta etapa houve

a adição de 5 gotas de brometo de etídio, corante fluorescente que se intercala entre as bases do DNA.

A solução foi despejada no suporte e levou em média 15 minutos para solidificar. Em seguida o suporte com o gel foi colocado na cuba de eletroforese, adicionado tampão TAE 1X até cobrir a superfície do gel, a voltagem aplicada foi de 60V por um tempo aproximado de 50 minutos.

A visualização foi realizada em aparelho específico sob luz ultravioleta (UV), transluminador (Vilber Lourmat) e fotodocumentada.

6 RESULTADOS

6.1 ESTUDO ENTOMOLÓGICO

Durante as excursões realizadas no período de março de 2009 a março de 2010 foram capturados, nas três áreas trabalhadas Boa Vista (Sítio Copaíba) e Fercal (casa 1 e casa 2), 513 exemplares de flebotomíneos, sendo 426 fêmeas (83%) e 87 machos (17%), conforme mostra a Figura 7.

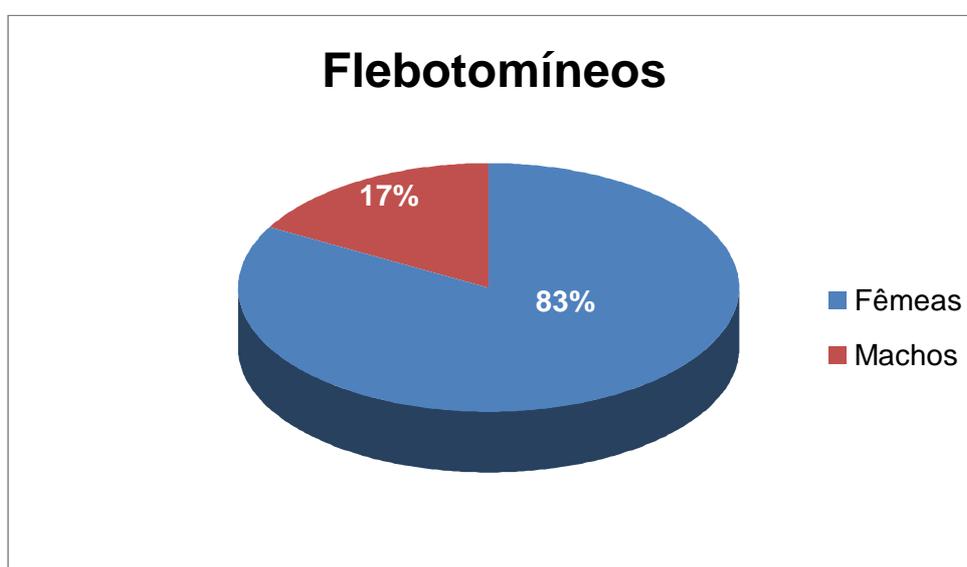


Figura 7 Distribuição percentual de flebotomíneos fêmeas e machos capturados no período de março de 2009 a março de 2010, na Região Administrativa de Sobradinho, localidades de Boa Vista (Sítio Copaíba) e Fercal (casa 1 e casa 2), Distrito Federal, Brasil

Desse total (513 exemplares), foram identificadas 04 espécies: *Lutzomyia whitmani* (Figura 8), *Lutzomyia bacula* (Martins, Falcão & Silva, 1965) (Figura 9), *Lutzomyia davisii* (Root, 1934) (Figura 10), e *Lutzomyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964) (Figura 11) (62). As espermatecas estão representadas abaixo com as respectivas identificações.



Figura 8 Espermateca dissecada da fêmea de *Lutzomyia whitmani*, fotodocumentada em Microscópio Óptico Zeizz Axiolab com aumento de 400x. Coleta realizada na localidade da Fercal (casa 1) na Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil Acervo particular



Figura 9 Espermateca dissecada da fêmea de *Lutzomyia bacula*, fotodocumentada em Microscópio Óptico Zeizz Axiolab com aumento de 400x. Coleta realizada na localidade de Boa Vista na Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil. Acervo particular



Figura 10 Espermateca dissecada da fêmea de *Lutzomyia davisii*, fotodocumentada em Microscópio Óptico Zeiss Axiolab com aumento de 400x. Coleta realizada na localidade da Fercal (casa 2) na Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil. Acervo particular



Figura 11 Espermateca dissecada da fêmea de *Lutzomyia termitophila*, fotodocumentada em Microscópio Óptico Zeiss Axiolab com aumento de 400x. Coleta realizada na localidade de Boa Vista na Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil. Acervo particular.

Do total de fêmeas capturadas (426), 379 (89%) foram da espécie *Lutzomyia whitmani*, 29 (7%) *Lutzomyia bacula*, 13 (3%) *Lutzomyia davisii* e 05 (1%) *Lutzomyia termitophila* (Figura 12).

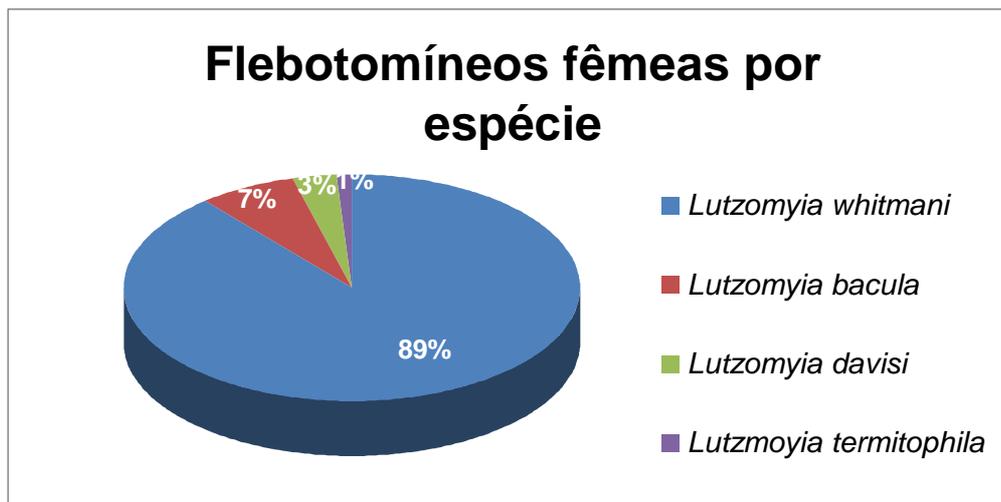


Figura 12 Distribuição percentual de flebotomos fêmeas identificadas por espécie. Coletas realizadas na Região Administrativa de Sobradinho: localidades de Boa Vista (Sítio Copaíba) e Fercal (casa 1 e casa 2), no período de março de 2009 a março de 2010, Distrito Federal, Brasil

Do total de machos coletados 87 (17%), 62 (71%) foram da espécie *Lutzomyia whitmani*, 22 (25%) *Lutzomyia bacula*, 02 (3%) *Lutzomyia davisii* e 01 (1%) *Lutzomyia termitophila* (Figura 13).

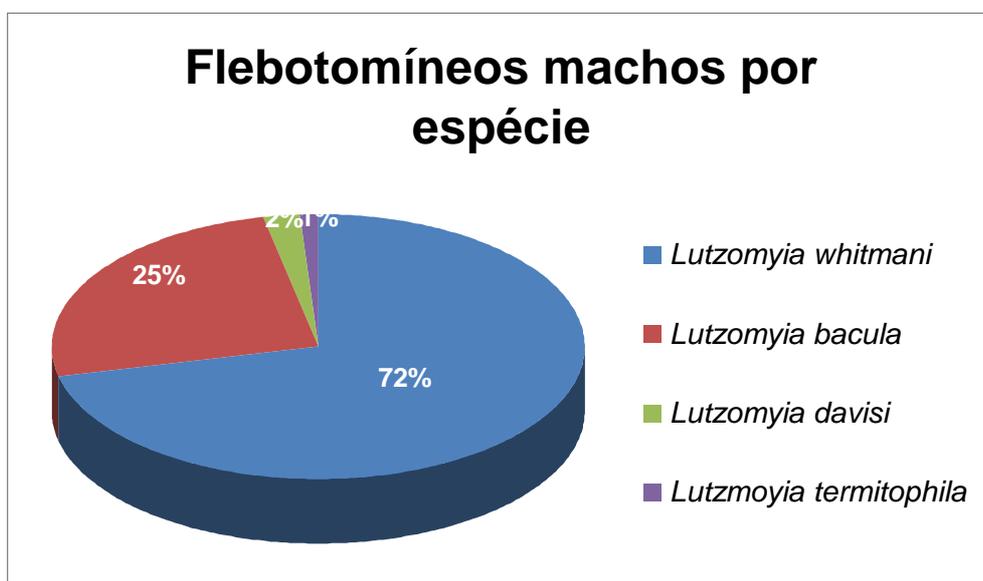


Figura 13 Distribuição percentual de flebotomos machos identificados por espécie. Coletas realizadas na Região Administrativa de Sobradinho: localidades de Boa Vista (Sítio Copaíba) e Fercal (casa 1 e casa 2), no período de março de 2009 a março de 2010, Distrito Federal, Brasil

Durante o período das coletas, foram capturadas 04 espécies de flebotomíneos em três locais diferentes. Na localidade de Boa Vista (Sítio Copaíba), foram capturadas as espécies *Lutzomyia whitmani* em número total de 342, *Lutzomyia termitophila* representada por 05 insetos, *Lutzomyia bacula* em número de 28 e *Lutzomyia davisii* com 13 indivíduos. Na localidade Fercal casa 1 foram capturadas as espécies *Lutzomyia whitmani* com 16 representantes e *Lutzomyia bacula* com apenas 01 flebotomíneo. Fercal foi capturada uma única espécie, *Lutzomyia whitmani* representada por 21 exemplares, na casa 2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição do número total e percentual de fêmeas de flebotomíneos, separadas por local de coleta e espécies encontradas. Foram utilizados três pontos de coleta (Boa Vista, Fercal casa 1 e Fercal casa 2) na Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil

Espécies	Localidades							
	Boa Vista		Fercal				Total	
	Boa Vista	%	Casa 1	%	Casa 2	%	Total	%
<i>L. whitmani</i>	342	90,2	16	4,2	21	5,6	379	100
<i>L. termitophila</i>	5	100	-	-	-	-	5	100
<i>L. bacula</i>	28	96,6	1	3,4	-	-	29	100
<i>L. davisii</i>	13	100	-	-	-	-	13	100

O percentual de flebotomíneos coletados na localidade de Boa Vista (Sítio Copaíba) foi o maior de todos os locais de captura, onde todas as espécies foram representadas. A espécie *Lutzomyia whitmani* representou 90,2%, *Lutzomyia termitophila* 100%, *Lutzomyia bacula* 96,6% e *Lutzomyia (Psycodopigus) davisii* 100%. No ponto de coleta Fercal casa 1, duas espécies foram encontradas, a espécie mais freqüente foi *Lutzomyia whitmani* 4,2%, seguida por *Lutzomyia bacula* 3,4%. E no terceiro local de captura na Fercal casa 2, a espécie *Lutzomyia whitmani* 5,6% foi a única encontrada.

As coletas realizadas no peridomicílio, intradomicílio e cerrado estão expostas na Figura 14. Abaixo a percentagem de flebotomíneos capturados em cada ecótopo (Tabela 4).

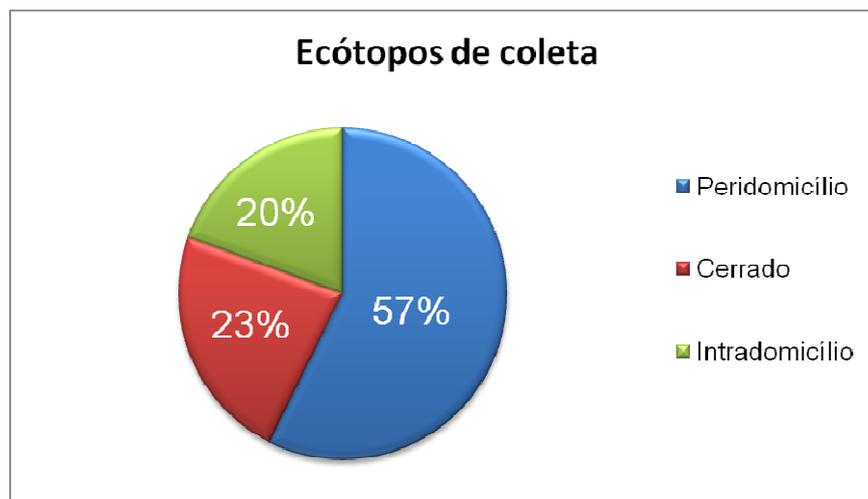


Figura 14 Percentuais de fêmeas de *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia bacula*, *Lutzomyia davisii* e *Lutzomyia termitophila* capturadas nos diferentes ecótopos no período de março de 2009 a março de 2010. Coletas realizadas na Região Administrativa de Sobradinho, nas localidades de Boa Vista e Fercal no Distrito Federal, Brasil

Tabela 4 – Distribuição percentual de fêmeas de flebotomíneos capturadas por ecótopos trabalhados no período de março de 2009 a março de 2010, nas localidades de Boa Vista e Fercal, na Região Administrativa de Sobradinho no Distrito Federal, Brasil

Espécie	Galinheiro	Cerrado	Aprisco	Chiqueiro	Domicílio	Total
<i>L. whitmani</i>	26,0%	25,0%	17,0%	13,2%	18,8%	100%
<i>L. termitophila</i>	80,0%	20,0%	0%	0%	0%	100%
<i>L. bacula</i>	24,1%	0%	34,5%	13,8%	27,6%	100%
<i>L. davisii</i>	23,1%	15,4%	23,1%	7,6%	30,8%	100%

A distribuição mensal das capturas foi variada, havendo uma prevalência muito alta no mês de setembro, fato atípico para esta época do ano, já que no Distrito Federal figura como mês de seca (Figura 15).

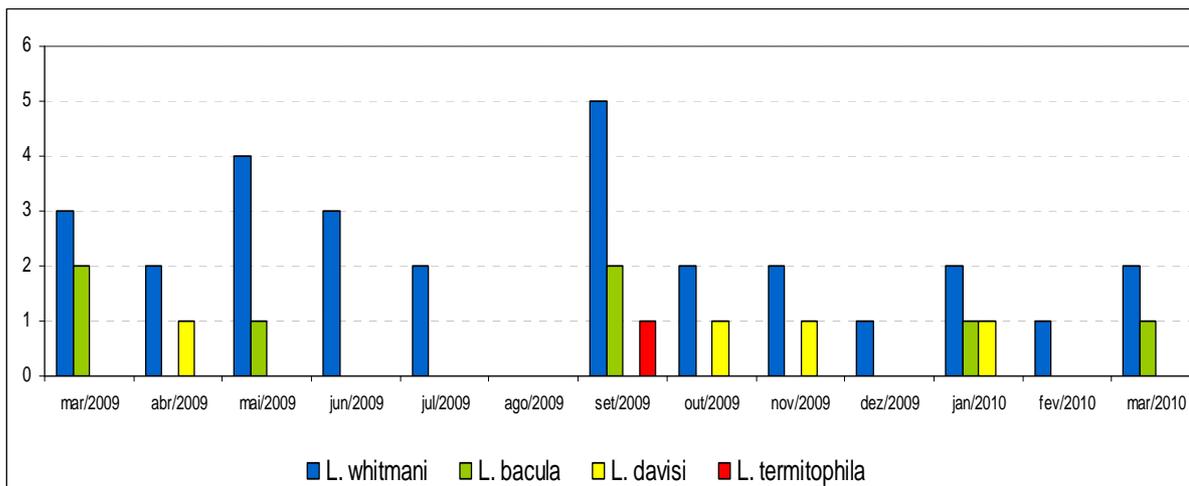


Figura 15 Dados da distribuição mensal dos flebotomíneos coletados no período de março de 2009 a março de 2010, na Região Administrativa de Sobradinho, nas localidades da Boa Vista (Sítio Copaíba), Fercal (casa 1 e casa 2), Brasília, Distrito Federal, Brasil

6.2 CONCENTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A concentração do DNA de *Leishmania* extraído dos flebotomíneos capturados foi mensurada pelo espectrofotômetro Nano Drop com comprimento de onda entre 220 a 750nm. Abaixo a representação das concentrações por tudo de insetos (Tabela 5).

Tabela 5 - Tubos numerados contendo *pool* de 5 a 10 fêmeas de flebotomíneos da mesma espécie e suas respectivas concentrações medidas no espectrofotômetro NanoDrop. Coletas realizadas nas localidades de Boa Vista e Fercal, Região Administrativa de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil

Tubo	Concentração	Tubo	Concentração
1	8,2 ng	22	4,0 ng
2	9,5 ng	23	9,2 ng
3	5, ng	24	3,1 ng
4	3,7 ng	25	2,9 ng
5	10,4 ng	26	9,9 ng
6	12,6 ng	27	5,6 ng

7	9,8 ng	28	2,0 ng
8	4,0 ng	29	9,3 ng
9	2,2 ng	30	9,9 ng
10	11,9 ng	31	5,8 ng
11	13,1 ng	32	17,8 ng
12	2,4 ng	33	15,3 ng
13	9,1 ng	34	7,8 ng
14	5,2 ng	35	10,8 ng
15	2,8 ng	36	7,0 ng
16	10,3 ng	37	7,3 ng
17	2,0 ng	38	4,2 ng
18	6,6 ng	39	5,6 ng
19	10,5 ng	40	3,0 ng
20	6,0 ng	41	18,7 ng
21	13,7 ng	42	7,2 ng

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em todas as fêmeas de flebotomíneos capturadas, as quais foram separadas em *pool* contendo de 5 a 10 indivíduos separados por data e local de coleta, totalizando 42 tubos de flebotomíneos.

As reações foram repetidas duas vezes para aumentar a fidedignidade dos testes.

Todos os resultados foram negativos para a presença do protozoário *Leishmania* nos insetos vetores analisados (Figuras 16, 17, 18, 19).

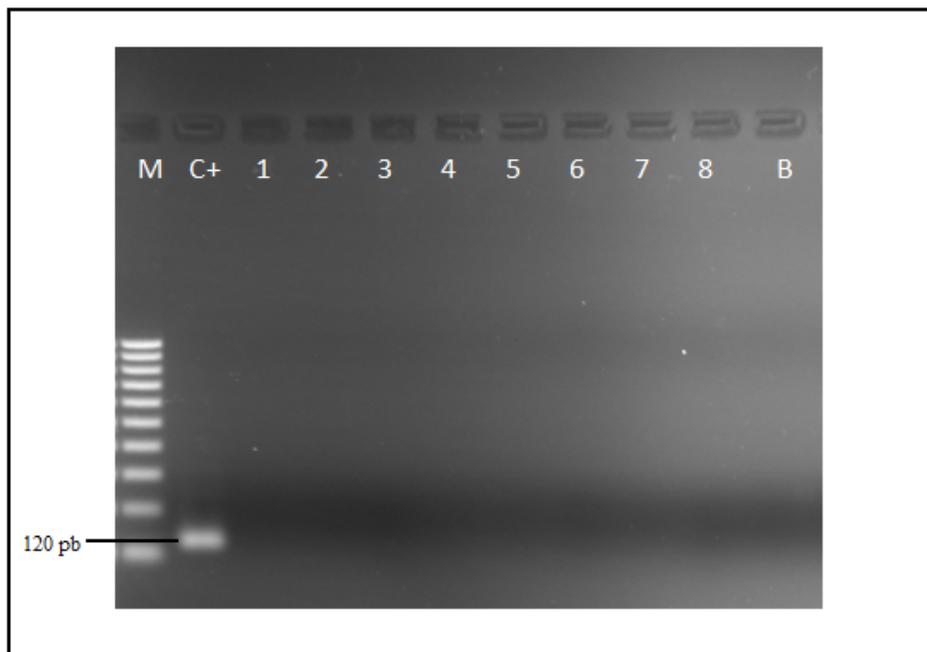


Figura 16 Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos, capturadas na localidade de Boa Vista na Região Administrativa de Sobradinho. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*). Linhas: 1 a 8 fêmeas de *Lutzomyia whitmani*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA)

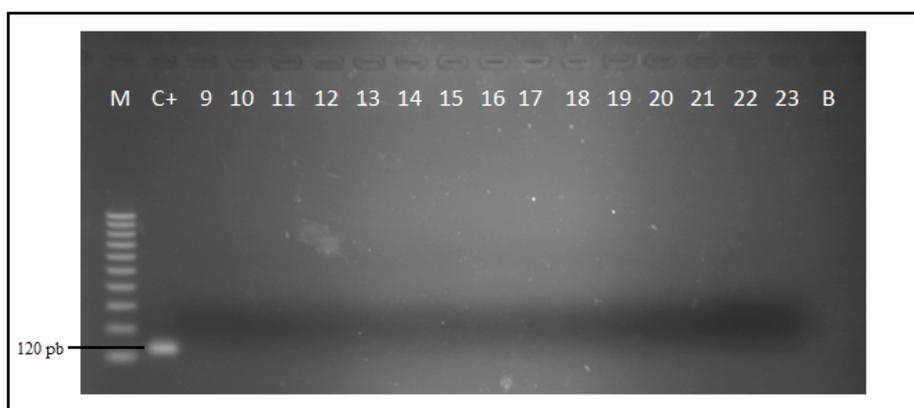


Figura 17 Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos capturadas na localidade de Boa Vista e Fercal casa 2 na Região Administrativa de Sobradinho. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*). Linhas: 9 a 23 fêmeas de *Lutzomyia whitmani*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA)

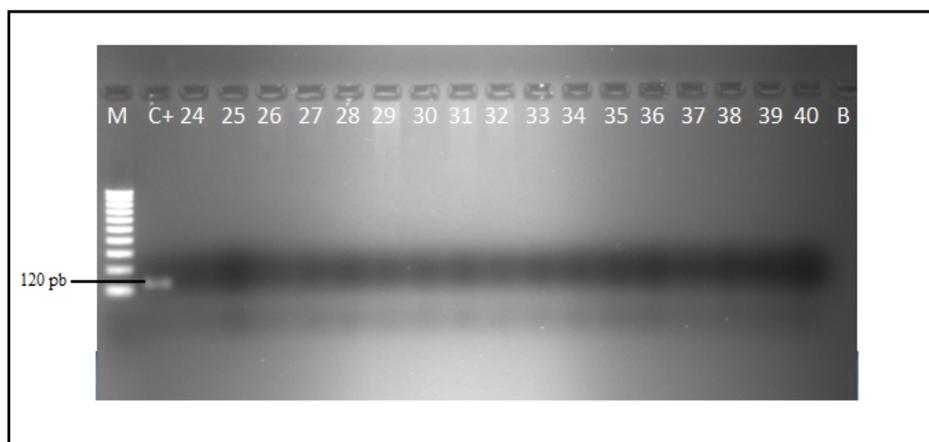


Figura 18 Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos, capturadas na localidade de Boa Vista e Fercal casa 1 na Região Administrativa de Sobradinho. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*). Linhas: 24 a 26 fêmeas de *Lutzomyia davisi*, linhas 27 a 33 fêmeas de *Lutzomyia bacula*, linhas 34 a 40 fêmeas de *Lutzomyia whitmani*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA)

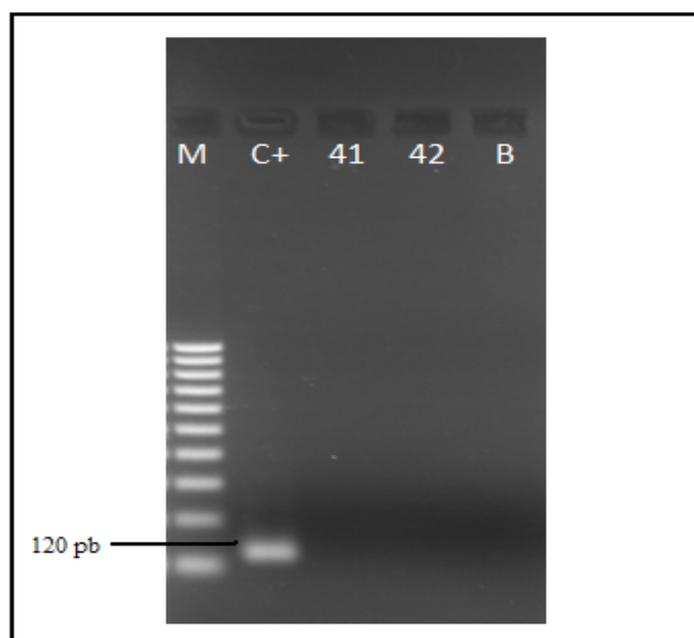


Figura 19 Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos, capturadas na localidade de Boa Vista na Região Administrativa de Sobradinho. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*). Linhas: 41 fêmeas de *Lutzomyia termitophila* e 42 fêmeas de *Lutzomyia bacula*. Letra “B” controle negativo (tubo sem adição de DNA)

7 DISCUSSÃO

Com o passar dos anos, a cobertura vegetal vem sendo devastada, impugnando ao desequilíbrio ecológico; e o crescente desaparecimento das florestas deu lugar ao aparecimento do fenômeno chamado de “urbanização de vetores”. Com isso houve uma alteração na condição de exposição do homem a determinadas doenças, a exemplo da leishmaniose tegumentar americana, levando à expansão dessa endemia para regiões periurbanas e urbanas (1).

Na década de 50, houve registro na diminuição do número de casos notificados de LTA, que suspeita-se tenha sido devido à falta de fornecimento do antimonial pentavalente e o vínculo do fornecimento deste à notificação dos casos; entretanto nos últimos vinte anos constatou-se um significativo crescimento na expansão geográfica e magnitude da doença, antigamente associada quase exclusivamente ao contato dos indivíduos com a mata.

Ao final da década de 80, verificou-se adaptações dos vetores aos ambientes urbanos e a periferias de grandes centros, hoje podendo ser encontrados em peridomicílio, e até mesmo no intradomicílio (68).

Quanto à distribuição mensal, tem-se conhecimento que a maioria das espécies de flebotomíneos tende a aumentar a densidade nos meses mais quentes e úmidos, apesar da existência de espécies que se mostraram mais numerosas nas épocas secas e frias, a exemplo de *Lutzomyia whitmani* que foi a mais capturada neste estudo e *Lutzomyia termitophila*, encontrada apenas nessa época (8).

Sabe-se que as mudanças no microclima, como o aumento da umidade relativa do ar, aumento das temperaturas, a possível alteração nas taxas de evaporação e de evapotranspiração podem favorecer a proliferação de insetos (69). Este fator pode ter contribuído para a diferença apresentada nas coletas realizadas entre os meses de agosto e setembro, onde no primeiro não houve capturas e no segundo existiu um aumento significativo de insetos coletados.

No mês de agosto de 2009 a soma da precipitação foi de 72,5 milímetros e a do mês de setembro foi de 50,5 milímetros, o que leva a crer, pelo conhecimento do ciclo de vida dos flebotomíneos, que estes não foram coletados

no mês de agosto, pois estavam em fase de reprodução, levando no mês de setembro, a esse aumento de exemplares capturados.

As capturas foram realizadas na Região Administrativa de Sobradinho em três pontos de coleta, abrangendo as localidades de Boa Vista e Fercal. Estas áreas foram escolhidas para o desenvolvimento deste estudo, pois são consideradas locais prováveis de infecção (LPI) em relatórios baseados nas informações fornecidas pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Distrito Federal (SINAN), dados estes disponibilizados para este trabalho pela equipe da Diretoria de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde do Distrito Federal.

Dos 513 exemplares de flebotomíneos capturados, 426 eram fêmeas e 87 eram machos. Esses dados corroboram aos encontrados por outros estudos, onde a maioria das coletas referencia um número maior de fêmeas que machos (70). Isto pode ocorrer devido a vários fatores, a exemplo dos ecótopos de coleta, onde existe a disponibilidade de repasto sanguíneo.

Lutzomyia whitmani, espécie mais encontrada neste estudo, é considerada vetor da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país, sendo também um vetor de *Leishmania (Viannia) shawi* no Norte (6, 71) e de *Leishmania (Viannia) guyanensis* na Amazônia (71).

Pesquisa recente vem corroborar com o achado do presente estudo, onde esta espécie foi predominante em todas as localidades e ambientes trabalhados, ressaltando assim, sua importância como transmissor da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no DF (72).

Esta é uma espécie de flebotomíneo com vasta distribuição na América do Sul (64) e na região Centro-Oeste sua antropofilia já foi demonstrada por estudos realizados (73). Pesquisas entomológicas realizadas no Estado de Mato Grosso apresentaram várias listas de flebotomíneos entre as quais, *Lutzomyia whitmani* foi considerada em processo de domiciliação, particularmente pela sua adaptação a habitats mais diversificados ou menos especializados (74).

A alta frequência desta espécie encontrada neste estudo, tanto em abrigos animais (56,2%) como também no intradomicílio (18,8%), sugere um processo de domiciliação (75) fato este também encontrado por Loiola (76). Como é uma espécie oportunista e possui ecletismo alimentar, acaba ajustando seus hábitos à disponibilidade de hospedeiros nos ambientes antrópicos (74).

A distribuição de *Lutzomyia whitmani* nos diferentes ecótopos estudados reflete que o entendimento sobre a cadeia de transmissão e seus diferentes perfis eco-epidemiológicos são de suma importância para direcionar as ações de controle da doença que mais se adaptem à situação local (77).

Restrito às regiões Norte, Centro-Oeste e Sul, *Lutzomyia bacula*, até o momento parece não ter sido incriminada como transmissora da doença (78). Porém, seu achado em dois dos três pontos de coleta (Boa Vista e Fercal casa 1), e sua distribuição em praticamente todos os ecótopos vem a sugerir que deva ser dada uma atenção especial a esta espécie.

O único ponto de coleta onde não encontrada foi em área de cerrado, que supostamente, possui menor proporção de atrativos para repasto sanguíneo do que em relação aos outros locais, que possuem animais e até mesmo o homem como fonte alimentar.

Diferentemente, *Lutzomyia davisii* possui um provável potencial vetorial (79), conforme achados da ocorrência de infecção natural por *Leishmania* em localidades com ocorrência da LTA, tais como Paragominas (Pará), Monte Dourado (Pará) e Serra do Navio (Amapá). Corroborando com estes estudos, outro trabalho sem dúvida chama a atenção onde foram encontrados quatro exemplares com flagelados no tubo digestivo, e em dois deles foi possível confirmar, pela identificação por anticorpos monoclonais, a infecção natural por *L. (Viannia) braziliensis* (9).

Estes dados vêm consubstanciar a suspeita de que este flebotomíneo possa estar envolvido na transmissão da LTA determinada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e também, por *Leishmania (Viannia) naiffii*, nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, onde esta espécie é encontrada com certa frequência (9, 80).

Apesar de ser uma espécie eclética, chama atenção a sua frequência no ambiente intradomiciliar (30,8%), fato relatado neste trabalho, dado este que difere dos resultados encontrados por Carvalho e colaboradores (72), onde sua presença foi relatada em ambientes naturais.

O *Lutzomyia termitophila* foi encontrado até o momento, nas regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, porém no DF seu registro é recente (72).

Neste estudo sua presença foi relatada no galinheiro (80%) e no cerrado (20%), informações que se apóiam em outro estudo realizado no DF, onde em

um total de 186 flebotomíneos coletados, 56 foram no galinheiro e 38 no cerrado (72).

Os estudos sobre sua ecologia e biologia são muito escassos em todo o país, provavelmente porque até o presente momento não existe conhecimento sobre o seu papel na manutenção do ciclo da LTA. Mesmo sendo sugerido o desconhecimento de registros de sua infecção por *Leishmania*, a sua presença em locais de áreas de transmissão, sobretudo próxima às residências e junto a vetores conhecidos da LTA, conduz à necessidade de pesquisar seu potencial papel como transmissor da leishmaniose.

Na região de Sobradinho, local escolhido para as coletas deste trabalho, as espécies mais freqüentes de flebotomíneos com importância entomológica relevante são *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia longipalpis*, sendo a primeira relatada e discutida neste estudo. A segunda espécie, contudo, não foi encontrada no presente trabalho, mas sua importância deve ser referida por se tratar do principal vetor da Leishmaniose Visceral (LV) no DF, diagnosticada como autóctone no ano de 2004 (72).

O Distrito Federal, entretanto, apresenta outros flebotomos de importância médica, a exemplo da espécie *Lutzomyia flaviscutellata*, não observada neste estudo, porque esta espécie é encontrada nas Regiões Administrativas de Planaltina e Gama. Pesquisas realizadas no DF indicam que este inseto é coletado em ambientes de cerrado, realizando seu repasto sanguíneo em pequenos roedores, o que indica sua manutenção no ciclo da LTA na transmissão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (81).

As características ecológicas e climáticas de cada região influenciam no ciclo biológico e nos hábitos dos flebotomíneos, com isso as ações antrópicas que norteiam as alterações do meio ambiente podem contribuir no processo de urbanização da LTA.

Apesar da técnica de reação em cadeia da polimerase ser sensível ao ponto de detectar a presença de 0,6 parasitos por tubo de reação (82), neste estudo, todos os resultados dos 42 tubos com *pool* de fêmeas de flebotomíneos foram negativos. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Neitzke e colaboradores (24) em pesquisa no estado do Paraná.

Porém, outras pesquisas realizadas usando a mesma metodologia que a estabelecida para o desenvolvimento deste trabalho, demonstraram positividade

para infecção natural dos insetos vetores da leishmaniose tegumentar americana (83,84).

Fatores como contaminações no material de laboratório empregado na técnica de PCR podem ser descartadas pelo cuidado do manuseio de reagentes e pela repetição de todas as reações, subsídios estes que oferecem a segurança de que possivelmente não houve contaminação no procedimento, pela inexistência de bandas inespecíficas no gel de agarose e também pela clareza do controle positivo.

As concentrações de DNA encontradas foram muito variáveis e algumas delas ficaram abaixo do valor estipulado (10 ng) e isto pode ter interferido no resultado da técnica de PCR. A extração foi feita segundo protocolo preconizado por Paiva e colaboradores (24), que realizam estudos de padronização da conservação dos espécimes de flebotomíneos, extração do DNA da *Leishmania* e infecção natural dos mesmos.

Não se pode descartar também a hipótese de que realmente nenhum dos exemplares estivesse de fato infectado, pois nos últimos dois anos não houve relato de casos humanos nas localidades escolhidas para a realização das capturas deste estudo.

8 CONCLUSÃO

Na Região Administrativa de Sobradinho, nas localidades Boa Vista e Fercal, foram capturadas as espécies *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia bacula*, *Lutzomyia davisii* e *Lutzomyia termitophila*.

Lutzomyia whitmani foi a espécie mais capturada, sendo encontrada em ambiente peridomiciliar e intradomiciliar, diferentemente da espécie *Lutzomyia termitophila* que predominou no peridomicílio, particularmente em galinheiros.

A espécie que ocorreu em praticamente todos os meses do ano, apresentando uma distribuição sazonal praticamente equilibrada foi *Lutzomyia whitmani*.

O emprego de apenas um método de coleta e o número restrito de pontos para as capturas evidenciou que o número de exemplares coletados precisa ser expandido para contemplar em uma pesquisa futura outras localidades do Distrito Federal.

Apesar de não ter havido relato de infecção natural em nenhum dos flebotomíneos coletados e ainda que os requisitos de incriminação vetorial não tenham sido atendidos, a elevada densidade populacional de *Lutzomyia whitmani* em áreas de transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal e sua frequência no peridomicílio e intradomicílio, são fatores que evidenciam a potencialidade vetorial desta espécie.

9 BIBLIOGRAFIA

- 1- Lemos JC, Lima SC. American cutaneous leishmaniasis: phlebotomine transmission area in the Municipality of Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2005 Feb; 38 (1): 22-26.
- 2- Medeiros ACR, Roselino AMF. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. An Bras Dermatol. 1999 Sep; 74 (4): 329- 336.
- 3- Costa JML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. Gaz Méd. 2005 Jan; 75 (1): 03-17.
- 4- Rodrigues AM, Hueb M, Santos TARR dos, et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Mar; 39 (2): 139-145.
- 5- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.
- 6- Costa S, Cechinel M, Bandeira V, et al. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Mar; 102 (2):149-153.
- 7- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. p. 12-120.
- 8-Lainson R. Leishmania e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. Rev Para Med.1997 Mai; 11 (1): 29-40.
- 9- Souza AAA de, Silveira FT, Lainson R, et al . Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. Rev Pan-Amaz Saúde. 2010 Mar; 1(1): 45-51.

- 10- Ampuero J, Macedo V, Marsden P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Jan; 39 (1): 22-26.
- 11- Fiocruz. Fundação Oswaldo Cruz. Monitoramento e vigilância da leishmaniose tegumentar no Brasil. 2009. Disponível em: <http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose/situacao-da-lt-no-brasil/> Acessado em 17 de out de 2009.
- 12- Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/ MS). Casos de Leishmaniose tegumentar americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2008*. Disponível em: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS_CONF_LTA.pdf. Acesso em: 29 dez 2009.
- 13- Monteiro WM, Neitzke HC, Lonardoni MVC, et al. Geographic distribution and epidemiological features of American tegumentary leishmaniasis in old rural settlements in Paraná State, Southern Brazil. Cad Saúde Pública. 2008 Jun; 24 (6): 1291-1303.
- 14- Sampaio RNR, de Paula CDR. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. Rev Soc Bras Med Trop. 1999 Sep; 32 (5): 523 - 528.
- 15- Rosa ELS, Veloso MP, Cintra JB. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac. 2005 Jan; 5 (1):27-32.
- 16- Silva TAV, John FP, Sampaio RNR, et al, editores. Autoctonia da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil: estudo de vetores. Anais do 9º Congresso de iniciação científica da Universidade de Brasília; Brasília: Universidade de Brasília; 2003.
- 17- Gonçalves MC, Tauil PL, Sampaio RNR. Leishmaniose tegumentar americana: Diagnóstico imunológico em comunidades do Distrito Federal. Anais do 4º Congresso de Iniciação Científica do DF; Brasília. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.

18- Sambrook J, Russel DW. Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J and Russel DW, editores. Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001. p. 631-632.

19- Singh S, Sivakumar R. Recent Advances in the Diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med. 2003 Jan; 49 (1): 55-60.

20- Oliveira JP, Fernandes F, Cruz AK, et al. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. Kinetoplastid Biol Dis. 2007 Jun; 21(1): 1-8.

21- Lima MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, et al. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Jun; 42(3):303 - 308.

22- Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. Trop Med Int Health. 2002 Aug; 7(8):641-651.

23- Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, et al. Assessment of PCR in the detection of leishmania spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med Trop São Paulo. 2002 Oct; 44(5): 255 - 259.

24- Paiva, BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Eunice AB, Andrade JHF, Malafronte RS. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sand flies (Diptera, Psychodidae). Cad Saúde Pública. 2007 Jan; 23 (1): 87-94.

25- Neitzke HC, Scodro RB de L, Castro KRRde, Sversutti A de CD, Silveira TGV, Teodoro U. Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná. Rev Soc Bras Med Trop. 2008 Feb; 41(1):17-22.

26- Felipe IMA, Aquino Dorlene MC, Kuppinger O, et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Mar; 106(2): 207-211.

27- Santos RV, Coimbra CEAJ. Saúde e Povos Indígenas. 1ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.

28 - Pessoa SB, Barreto MP. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro: Serviço de documentação do Ministério da Educação e Saúde; 1948.

29- Markell DK, John DT, Krotoski WA. Parasitologia Médica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1981.

30- Costa JML. Leishmaniose tegumentar americana: origens e histórico no Brasil. Acta amaz.1992 Mar; 22 (1):71 - 77.

31 – Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. Hist Cienc Saude Manguinhos. 2003 Dec; 10(3): 853-882.

32- Organização Mundial da Saúde (OMS). Controle das doenças transmissíveis no homem. Relatório oficial da Associação Americana de Saúde Pública. Washington: Organização Panamericana da Saúde (OPAS), 1983.

33- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. The neotropical Leishmania species. In Collier L. Balows A & Sussman M, editores. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases.London: Arnold; 1998.

34- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 1994.

35- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

36- Cechinel MP. Factors associated with unfavorable treatment of cutaneous leishmaniasis: an analysis of the situation in the Southeast, from 2002 to 2006 [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2009.

- 37- Sampaio RNR, Rocha RAA, Marsden PD, et al. Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do Hospital Escola da UnB. An Bras Dermatol. 1980 Mar; 55 (1): 69-76.
- 38- Sampaio RNR, Paula CDR. Mucocutaneous leishmaniasis in the Federal District. Rev Soc Bras Med Trop. 1999 Oct; 32 (5): 523 – 528.
- 39- Ministério da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana: distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980-2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniose_2006.pdf.
- 40- Portal do Cidadão [homepage na Internet]. Brasília: Governo do Distrito Federal; [atualizada em 2009; acesso em abril de 2010]. Disponível em: http://www.gdf.df.gov.br/045/04501009.asp?ttCD_CHAVE=14365.
- 41- Andrade MS, Valença HF, Silva AL, et al. Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. Cad Saúde Pública. 2005 Dec; 21(6): 1761-1767.
- 42- Miranda C, Marques CC A, Massa JL. Sensoriamento remoto orbital como recurso para análise da ocorrência da leishmaniose tegumentar americana em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. Rev. Saúde Pública. 1998 Oct; 32(5): 455-463.
- 43- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Ronigberg BM, et al. A newly revised classification of the PROTOZOA. J Protozool. 1980 Feb; 27 (1):37-58.
- 44- Walters LL. Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. J Eukaryot Microbiol. 1993 Apr; 40 (2):196-206.
- 45- Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet. 1999 Oct; 354 (9185):1191 - 1199.
- 46 - Paiva, BR. PCR-basead leishmania species and blood meal identification in sand flies (Diptera: Psychodidae) from Mato Grosso do Sul, Brazil [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas; 2009.

- 47 - Herting GM. Phlebotomus and Carrion's disease. Am J Trop Med Hyg. 1942; 22 Suppl 4: 23 - 60.
- 48 - Casanova C, Costa AIP, Natal D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Nov; 100 (7): 719 - 724.
- 49 - Pinto C. *Phlebotomus neivai* e *Phlebotomus fischeri* n. sp. - sobre o aparelho espicular dos phlebotomos e seu valor específico. Sciencia Med. 1926 Apr; 4 (1):370 – 375.
- 50- Fonseca F. Flebotomus das cercanias da cidade de São Paulo, com a descrição de *Flebotomus arthuri* e *alphabeticus*. Rev Bras Entomol. 1936 Sep; 6 (1):323 – 327.
- 51- Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-Andrade RM, et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province - 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. Rev Bras Entomol. 2010 Jun; 54 (2): 311 – 321.
- 52- Feitosa MAC, Castellón EG. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na periferia de Santarém (PA). Estratificação horizontal e fatores agravantes para transmissão domiciliar de leishmanioses. Rev Colombiana Cien Anim. 2009 Jan; 1(2): 222 – 239.
- 53- Marzochi MCA, Schubach AO, Marzochi KBF. Leishmaniose tegumentar americana. In: Cimerman B, Cimerman S, editores. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 39 – 64.
- 54- Ready PD. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1979 Nov; 16 (5): 413 – 423.
- 55- Rebêlo JMM. Flebotomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de Saúde). São Luís: Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde; 1999.

56- Fonteles RS, Vasconcelos GC e, Azevêdo PCB, et al. Blood feeding preference of *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) in a transmission area for American cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Dec; 42 (6): 647 – 650.

57- Souza NRB de. Leishmaniose: levantamento de casos no período de 2002 a 2007 no município de Nova Xavantina – MT [dissertação]. Nova Xavantina: Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Nova Xavantina, Departamento de Ciências Biológicas; 2008.

58- Rey L. Bases da Parasitologia Médica 2 ed. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2001. 349p.

59 Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their phlebotomine vectors. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1985 Mar; 78 (2): 747 – 755.

60- Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves RM, et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. Rev. Bras. entomol. [serial on the Internet]. 2010 [cited 2011 May 17]; 54(3): 477-487.

61- Vale ECS, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. An bras dermatol. 2005 Aug; 80(4): 421 - 428.

62- Sudia WD, Chamberlain RW. Battery operated light trap, an improved model. J Am Mosq News. 1962 Dec; 22 (4): 126 – 129.

63- Marinho RM, Fonteles RS, Vasconcelos GC, et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in forest reserves in the metropolitan area of São Luís, Maranhão, Brazil. Rev Bras Entomol. 2008 Sep; 52 (1):112 - 126.

64- Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Ent Inst. 1994 Mar; 54 (1):814 – 881.

- 65- Koch A, Andrade FM. The use of molecular biology techniques in forensic genetics: a review. *Rev Bras Anal Clín.* 2008 Jan; 40 (1): 17 - 23.
- 66- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004 Mar; 90 (1): 31 – 37.
- 67- Roselino AM. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. *An Bras Dermatol.* 2008; 83 (3): 187-203.
- 68- Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Aug; 35 (4): 299 - 306.
- 69- FORATTINI OP. Entomologia Médica. Universidade de São Paulo. São Paulo: Edgard Blucher; 1973.
- 70- Almeida LDGA, Vasco AR, Vales VF, et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Distrito de Luzimangues Porto Nacional/ TO. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Oct; 41(1): 323 – 324.
- 71- Rangel EF, Lainson R. Ecologia das leishmanioses. In: Rangel EF, Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003. p. 291 – 309.
- 72- Carvalho MSL, Bredt A, Meneguim ERS, Oliveira C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiol Serv Saúde.* 2010 Sep; 19(3): 227-337.
- 73- Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, et al. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in área of cutaneous leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. *J Public Health.* 1996 Apr; 30(2): 115 -128.

74 - Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição e Habitats. In: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003. p. 207-255.

75- Oliveira AG, Andrade JD, Falcão AL, et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. Cad Saúde Pública. 2003 Aug; 19 (4): 933 – 944.

76- Loiola CF, Silva DA, Galati AB. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in the endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 apr; 102(5): 581-585.

77 - Muniz LHG, Rossi RM, Nietzsche HC, et al. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. Rev Saúde Pública. 2006 Dec; 40 (6): 1087-1093.

78 - Missawa NA, Maciel GBML, Rodrigues H. Geographical distribution of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) in the State of Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2008 Aug; 41 (4):369 – 373.

79- Andrade AJ de, Torres-Dantas, F. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) of the State of Minas Gerais, Brazil. Neotrop Entomol. 2010 Feb; 39 (1): 115 -123.

80- Lainson R. & J.J. Shaw. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n. a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. Ann Parasitol Hum Comp. 1989 Mar; 64 (1): 3 – 9.

81- Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, et al. Study on the transmission of American cutaneous leishmaniasis in the Federal District. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009 Dec; 42(6): 686 – 690.

82- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*)

braziliensis in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. . Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005 Dec; 99 (12): 905 – 913.

83- Cardoso PG, Souza MB, Sanavria A, et al. Flebótomos de áreas com ocorrências de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. Rev. Soc Bras Méd Trop. 2009 Apr; 42(2): 146 -150.

84- Bittencourt IA. Infecção natural por Leishmania sp. em flebotomíneos capturados no foco de transmissão de Leishmaniose tegumentar americana no município de Piçarras, litoral norte do Estado de Santa Catarina e identificação específica do parasito em amostras clínicas e em cepas isoladas de pacientes [trabalho de conclusão de curso]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas; 2008.

APÊNDICE A – QUADRO COM DADOS DAS COLETAS

Local: Boa Vista 1; Fercal Casa 1 - 2 ;Fercal Casa 2 – 3.

Ecótopo: Galinheiro – 4; Cerrado – 5; Aprisco – 6; Chiqueiro – 7; Domicílio 8.

Espécie: *L. whitmani* – 8; *L. termitophila* – 9; *L. bacula* – 10; *L. davisii* – 11.

LOCAL	ECÓTOPO	ESPÉCIE	DATA
1	4-5-7-8	8	09/03/09
1	4-6-8	8	23/03/09
1	4-5-6-7	8	13/04/09
1	4-5-6-7	8	04/05/09
1	4-5-6-8	8	18/05/09
1	4-5-8	8	15/06/09
1	4-5-7	8	22/06/09
1	4-7	8	06/07/09
1	4-5-6	8	08/09/09
1	4-5-6	8	15/09/09
1	4-5-6-7	8	21/09/09
1	4-5-6	8	05/10/09
1	4-5-8	8	19/10/09
1	4-6-8	8	09/11/09
1	4-5-7	8	23/11/09
1	4-7	8	07/12/09
1	4-5	8	11/01/10
1	4-5-6-7	8	18/01/10
1	4-5-8	8	08/02/10
1	4-5-6	8	22/03/10
1	4-5-6-8	8	29/03/10
2	5-4	8	13/04/09

2	4	8	04/05/09
2	4-8	8	22/06/09
2	4-8	8	08/09/09
3	4-8	8	23/03/09
3	4-5-8	8	18/05/09
3	4	8	06/07/09
3	8	8	08/09/09
1	5-7	9	15/09/09
1	4-6-7	10	09/03/09
1	4-8	10	23/03/09
1	5-6	10	08/09/09
1	4-5-7-8	10	15/09/09
1	7-8	10	18/01/10
1	4-7	10	29/03/10
2	8	10	18/05/09
1	4-7-8	11	13/04/09
1	4-6-7	11	05/10/09
1	4-5-7	11	09/11/09
1	8	11	11/01/10

APÊNDICE B – ARTIGO

Artigo científico submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Identificação e estudo da infecção por *Leishmania* de flebotomíneos no Distrito Federal

Identification and study of *Leishmania* infection of sandflies in the Federal District

Mariana Boff Barreto¹, Andrea Lisboa Carneiro², Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio³.

1-Acadêmica de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Universidade de Brasília

e-mail: mabiotec@yahoo.com.br, marianabarreto@unb.br

2-Acadêmica de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas.
Universidade de Brasília

e-mail: andreacarneiro10@yahoo.com.br

3-Doutora em Medicina, Chefe do Serviço de Dermatologia do Hospital
Universitário de Brasília
Coordenadora do Laboratório de Dermatômico da Universidade de Brasília
Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, 70.910-900

e-mail: rsampaio@unb.br; raimunda.sampaio@gmail.com

Apoio Financeiro: Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (Finatec) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana é notificada no Distrito Federal, mas sua forma de transmissão ainda é desconhecida. Foram capturadas em Sobradinho-

DF fêmeas de *L. whitmani* (89%), *L. bacula* (7%) *L. davisii* (3%) e *L. termitophila* (1%). O maior percentual de flebotomíneos foi encontrado no peri-intradomicílio (77%). A reação em cadeia da polimerase teve resultado negativo para a presença de *Leishmania* nos exemplares capturados. Conclui-se que possa estar havendo transmissão peri-intradomiciliar e que *L. whitmani* seja o principal vetor.

Palavras – chaves: Flebotomíneos, transmissão, Leishmaniose Tegumentar Americana.

Abstract

Cutaneous leishmaniasis is reported in the District Federal, but its transmission is still unknown. Were captured at Sobradinho DF female *L. whitmani* (89%), *L. bacula* (7%), *L. davisii* (3%) and *L. termitophila* (1%). The highest percentage of sandflies were found in peri-home (77%). The polymerase chain reaction was negative for the presence of *Leishmania* in the specimens captured. Concludes that there may be peri-home and *L. whitmani* is the main vector.

Key - Words: Lutzomyia, transmission, American Tegumentary Leishmaniasis

Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa um grave problema de saúde pública no Brasil pela sua incidência em todos os estados, morbidade, mutilações e, algumas vezes, letalidade para o doente.

Os padrões epidemiológicos de transmissão são: silvestre com ocorrência da doença em áreas de vegetação primária constituindo uma zoonose de animais

silvestres; ocupacional, associada à exploração das florestas, e outros ecoturismo; e periurbana que ocorre em centros urbanos e está associada às matas secundárias com adaptação do vetor ao peri e intradomicílio.

A transmissão da LTA ao homem ocorre durante a hematofagia dos flebotomíneos vetores (Diptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*)¹, sendo o controle destes uma das medidas de prevenção da doença.

Há mais de 20 anos existem relatos de casos de LTA procedentes do Distrito Federal (DF) ^{2,3}, mas pouco se sabe sobre os elementos da cadeia de transmissão da doença. Este estudo visa confirmar a presença das espécies de flebotomíneos no DF, e verificar sua infecção por *Leishmania*.

Métodos

Este estudo foi desenvolvido na Região Administrativa de Sobradinho, nas comunidades da Fercal (casa 01 e casa 02) e Boa Vista (Sítio Copaíba), no período de março de 2009 a abril de 2010. Em todos os pontos de coleta foram colocadas de três a cinco armadilhas luminosas do tipo CDC (*Center on Disease Control*), distribuídas no cerrado, peridomicílio (galinheiro, chiqueiro e aprisco) e intradomicílio (dormitório e sala) durante três noites a cada mês.

Os flebótomos capturados foram transportados ao Laboratório de Dermatocologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, onde foi realizada seleção para posterior dissecação das espermatecas das fêmeas para classificação e identificação, conforme critérios estabelecidos por Young e Duncan (1994)⁴.

Nesta pesquisa, foram analisadas 426 fêmeas de flebótomos distribuídas nas espécies *L. whitmani*, *L. bacula*, *L. davis* e *L. termitophila*. As mesmas foram

separadas em *pools* de 5 a 10 exemplares da mesma espécie para a extração de DNA que foi realizada segundo protocolo desenvolvido por Paiva e colaboradores⁵.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados os *primers* 5'GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA3'e5'(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTAC CAACCCC3'. O volume final da reação foi de 20 ml, composto por 4 ml de DNA, Tampão para PCR 1X ; 1mM de cada primer; 1,5mM MgCl₂; 200mM de cada dNTPs e 1U de Taq DNA polimerase. A reação iniciou com uma desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,5%.

Como controle positivo foi utilizado DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa (MHOM/BR/1975/M2903), proveniente do Instituto Evandro Chagas. Como controle negativo utilizou-se água ultrapura sem a adição de DNA.

Resultados

Capturas: Foram capturados 513 exemplares de flebotomíneos, representados por 426 (83%) fêmeas. Foram coletadas quatro espécies, *L. whitmani* que esteve presente em todas as comunidades, *L. bacula* que ocorreu nas localidades de Boa Vista e Fercal casa 01, já *L. termitophila* e *L. davisii* foram encontradas apenas na comunidade de Boa Vista (Tabela 1). O ecótopo de maior representatividade dos espécimes coletados foi o peridomicílio (Figura 1).

Espécie	Boa Vista	Fercal 1	Fercal 2	Flebótomos
	Fêmeas	Fêmeas	Fêmeas	Número
<i>L. whitmani</i>	90,2%	4,2%	5,6%	379
<i>L. termitophila</i>	100%	0%	0%	05
<i>L. bacula</i>	96,6%	3,4%	0%	29
<i>L. davisii</i>	100%	0%	0%	13

Tabela 1: Número total e percentuais de fêmeas de *Lutzomyia* capturadas no Distrito Federal nas comunidades de Boa Vista, Fercal 1 e Fercal 2, no período de março de 2009 a abril de 2010.

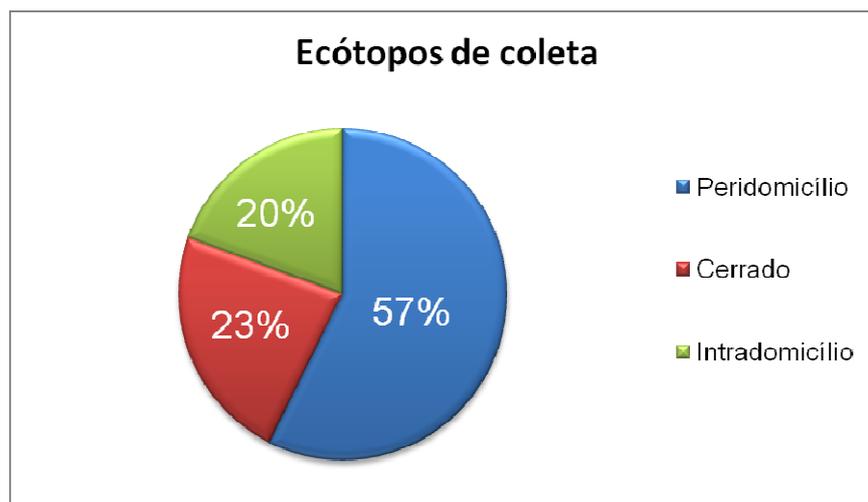


Figura1: Percentuais de fêmeas de *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia bacula*, *Lutzomyia Davisii* e *Lutzomyia termitophila* capturadas nos diferentes ecótopos no período de março de 2009 a abril de 2010, capturadas realizadas na Região Administrativa de Sobradinho, nas localidades de Boa Vista e Fercal no Distrito Federal, Brasil.

Todos os resultados para a pesquisa de *Leishmania* foram negativos (Figura 2).

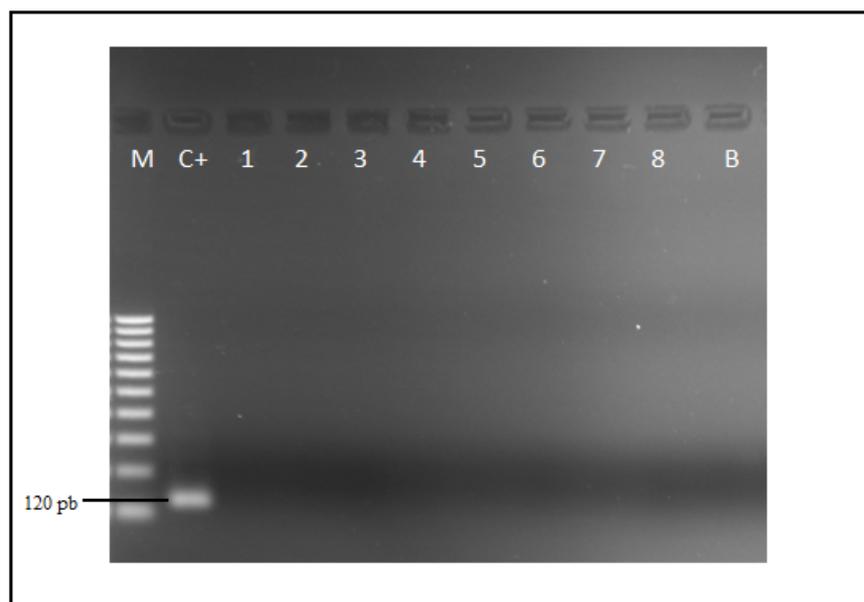


Figura 2: Reação em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos. Letra “M” marcador de peso molecular. Letra “C+” controle positivo (DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*). Linhas: 1 a 8 fêmeas de *Lutzomyia whitmani* procedentes da Região Administrativa de Sobradinho, localidades de Boa Vista e Fercal, Distrito Federal, Brasil. Letra “B” controle negativo (água ultrapura).

Discussão

O primeiro relato de caso autóctone de LTA no DF foi no ano de 1980 em uma criança de 2 anos procedente da Região Administrativa Núcleo Bandeirante⁶. No ano de 1999 foram notificados 11 novos casos² e em 2003, a Universidade de Brasília estudou um surto de LTA na Região Administrativa São Sebastião.

Entre os flebotomos encontrados neste estudo, destacaram-se *L. whitmani* e *L. davisii* que são reconhecidamente vetores da leishmaniose tegumentar americana em suas várias formas⁷.

L. whitmani pode ser encontrado nas cinco regiões do Brasil associado a uma grande variedade de vegetação e fontes de repasto sanguíneo⁸. Neste

estudo, esta espécie foi encontrada em ambiente peri e intradomiciliar, corroborando com estudos já realizados, sugerindo que possa estar ocorrendo transmissão intra e peridomicilar no DF,^{3,9}. Por ser a espécie de maior incidência neste estudo, dado que corrobora com pesquisas anteriores¹¹ no DF, sugere-se que *L. whitmani* possa estar envolvido no ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis*, espécie de *Leishmania* predominante no DF, conforme estudo já realizado¹².

Restrito as regiões Norte, Centro-Oeste e Sul, o *Lutzomyia bacula*, até o momento parece não ter sido incriminado como transmissor da doença¹³.

O *Lutzomyia (Psycodopigus) davisi* parece ser um provável vetor^{7,14}, sendo encontrado nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. O *Lutzomyia termitophila* (Martins, Falcão e Silva, 1964) foi encontrado até o momento, nas regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, e recentemente foi relatado no DF. Apesar do desconhecimento de registro de sua infecção por *Leishmania*, a sua presença em áreas de transmissão, próximas às residências e junto a vetores conhecidos da LTA, torna necessário pesquisar seu potencial como vetor da doença.

Embora os resultados das pesquisas de DNA para *Leishmania* através de PCR tenham sido negativos, há relato na literatura de casos humanos da doença próximos aos locais de coleta, conforme dados disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação do DF (SINAN). Há também a possibilidade de outros vetores em potencial, a exemplo de carrapatos¹⁴ ou ainda, como comprovado em estudo recente realizado na Austrália, espécies de insetos que não os flebotomíneos¹⁵.

Conclusão

L. whitmani foi a espécie capturada com maior frequência, inclusive no peridomicílio. Isto sugere que deva estar ocorrendo transmissão da LTA no intra e peridomicílio. Não foi possível confirmar a infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania*. Sugere-se ampliar o estudo para um maior número de flebotomíneos e expandir a pesquisa a outras localidades do DF.

Referências

1. Lainson R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. Rev Para Med 1997; 11: 29-40.
2. Sampaio RNR, de Paula CDR. Leishmaniose Tegumentar Americana no Distrito Federal. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32: 523-528.
3. Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Tauil PL. Study on the transmission of American cutaneous leishmaniasis in the Federal District. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42: 686-690.
4. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). Mem Am Entomol Inst 1994; 54: 1- 881.
5. Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior IC, Malafronte RS. Detecção e identificação de espécies de *Leishmania* em flebotomíneos capturados em campo flebotomíneos com base em mini-exon PCR do gene Acta Trop 2006; 99: 252- 259.

6. Sampaio RNR, Rocha RAA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do Hospital Escola da UnB. An Bras Dermatol 1980; 55: 69-76.
7. Souza AAA de, Silveira FT, Lainson R, Barata IR, Silva MGS, Lima JAN et al. Flebótomos de la Serra dos Carajás (Estado de Pará, Brasil) y su posible implicación en la transmisión de la leishmaniasis cutánea americana. Rev Pan-Amaz Saude 2010; 1: 45-51
8. Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *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 2007; 102: 149-153.
9. Fonteles RS, Vasconcelos GC, Azevêdo Patrícia CB, Lopes GN, Moraes JLP, Lorosa ES et al. Blood feeding preference of *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) in a transmission area for American cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42: 647-650.
10. Carvalho MSL, Bredt A, Meneguim ERS, Oliveira C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. Epidemiol Serv Saúde. 2010; 19: 227-337.
11. Santos GM. Identificação das espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal [tese]. [Vancouver (BC)]: Universidade de Brasília; 2010. 110p.
12. Andrade AJ de, Torres-Dantas, F. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) of the State of Minas Gerais, Brazil. Neotrop Entomol 2010; 39: 115-123.

13. Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MD, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of, *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans Rev Soc Trop Med Hyg* 1981;75:530-536.
14. Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 64-67.
15. Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, et al. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol* 2011; 41: 571-579.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 28 de abril de 2009.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**Pesquisa e identificação de Leishmânia através de reação em cadeia da polimerase e identificação de espécies de Lutzomyia ssp no DF.**", UnBDOC n.º 32944/2009, sob responsabilidade da Profa. Dra. Raimunda N. R. Sampaio, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA