

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses
na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.**

por

Felipe Dutra Rêgo

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2013

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses
na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.**

por

Felipe Dutra Rêgo

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.**

**Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira
Gontijo**

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2013

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R343f 2012	<p>Rêgo, Felipe Dutra.</p> <p>Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil / Felipe Dutra Rêgo. – Belo Horizonte, 2013.</p> <p>XVIII, 133 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: f.: 123 - 151</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.</p> <p>1. Leishmaniose/transmissão 2. <i>Leishmania</i>/parasitologia 3. Saúde de Populações Indígenas 4. Psychodidae/patogenicidade III. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação).</p> <p>CDD – 22. ed. – 616.936 4</p>
---------------	--

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses
na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.**

por

Felipe Dutra Rêgo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho

Prof. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati

Prof. Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em: 28/02/2013.

"(...) a natureza não é cruel, apenas implacavelmente indiferente. Esta é uma das lições mais duras que os humanos têm de aprender." (Richard Dawkins).

Este trabalho é dedicado aos meus pais e a todos que
contribuíram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria Elisa e José Felício, pelo apoio incondicional, sabedoria, amor e carinho sempre transmitidos mesmo à distância. Amo vocês!

A minha orientadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo por me aceitar com carinho e competência como seu aluno. Muito obrigado pelo apoio, incentivo, ensinamentos, dedicação e atenção mais que especial nas revisões e sugestões para a realização deste trabalho. Foi um prazer tê-la como orientadora!

A Dra. Patrícia Flávia Quaresma pela orientação neste trabalho. Muito obrigado Paty por todo conhecimento transmitido, pela ajuda incessante, amizade, paciência, incentivo e carinho que sempre teve comigo. Além das revisões e sugestões sempre oportunas. Muito obrigado por tudo!

A Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro cujo conhecimento transmitido foi de fundamental importância para a realização deste trabalho. Sua ajuda e incentivo na identificação dos flebotomíneos, nas análises de sequenciamento e revisão foram realmente imprescindíveis!

Agradeço ao Dr. Edelberto Santos Dias pela infraestrutura concedida.

Ao Dr. Ronaldo Guilherme Carvalho Scholte pela colaboração na confecção dos mapas e análises espaciais.

Ao Helbert Antônio Botelho que me incentivou e se dispôs a ajudar com os trabalhos de campo, montagem e extração de flebotomíneos. Muito obrigado!

Ao Gabriel Barbosa Tonelli pela parceria nos trabalhos de campo na Terra Indígena e pela ajuda na montagem e extração de DNA das amostras.

Aos amigos Jerônimo Marteleto Nunes Rugani, Livia Cestaro Santiago e Agnes Sampaio pela ajuda constante na realização das extrações de DNA e técnicas moleculares. Só vocês sabem o quanto foi trabalhoso!

A Kelly Medrado Scofield Silva pela ajuda na montagem dos flebotomíneos, mas acima de tudo por acreditar nos meus sonhos e por estar sempre ao meu lado me apoiando com muito carinho e amor. Sua companhia foi fundamental para que eu conseguisse chegar até o final. Amo você!

Ao Igor Rismo Coelho pela fundamental contribuição nas análises estatísticas deste projeto.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, CPqRR-FIOCRUZ pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo conhecimento transmitido.

Aos moradores da Terra Indígena Xakriabá, por disponibilizarem suas casas e demais espaços particulares para a realização deste trabalho. Agradeço imensamente o carinho e espero que estes resultados possam beneficiá-los.

Agradeço ao Fabiano, Agostinho, Luiz e Róbson por me conduzirem com segurança nas viagens e pela agradável companhia e convivência.

Aos amigos do Laboratório de Leishmanioses (LALEI) pelo convívio harmonioso, repleto de conhecimento e aprendizado. Em especial: Tina, Luciana Moura, Raquel e Lara Saraiva.

Aos amigos do CRNIF, em especial ao Dr. José Dilermando Andrade Filho e Gustavo Mayr de Lima Carvalho pelo conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

À biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Agradeço aos meus irmãos Tiago e Daniel pela cumplicidade, carinho, confiança e união.

A todas as pessoas que torceram por mim e me incentivaram durante este período, em especial: André Rocha Franco, Gustavo Cardoso de Moraes, Marcelo Xavier de Oliveira e Vítor Souza Borges.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses.....	19
1.2 Biologia e Ecologia dos Flebotomíneos.....	23
1.3 Detecção de <i>Leishmania</i> spp. em Flebotomíneos	25
1.4 As Leishmanioses e a Terra Indígena Xakriabá	29
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Área de Estudo.....	34
4.2 Delineamento do estudo.....	36
4.2.1 Capturas no peridomicílio	36
4.2.2 Capturas nas trilhas.....	37
4.3 Caracterização das trilhas	38
4.4 Processamento dos flebotomíneos coletados	42
4.4.1 <i>Preparação, Montagem e Identificação dos flebotomíneos</i>	42
4.5 Dados climáticos e geoespaciais.....	42
4.6 Detecção da infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	43
4.6.1 <i>Extração de DNA das fêmeas capturadas</i>	43
4.6.2 <i>Nested PCR dirigida ao gene SSUrRNA</i>	44
4.6.3 <i>PCR dirigida ao Internal Transcribed Spacer I (ITS I) do rDNA</i>	46
4.6.4 <i>Reação de Sequenciamento</i>	47
4.7 Correlação dos dados entomológicos com dados epidemiológicos da área de estudos	48
4.8 Análise estatística	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Coletas Sistematizadas de Flebotomíneos no Peridomicílio.....	50
5.2 Coletas Sistematizadas de Flebotomíneos nas Trilhas.....	59
5.3 Análise descritiva das principais espécies de flebotomíneos coletadas nos diferentes ecótopos	79
5.4 Estudo de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio	82
5.5 Estudo de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos capturadas nas trilhas	89

5.6 Correlação da infecção por <i>Leishmania</i> em flebotomíneos e nos hospedeiros vertebrados na Terra Indígena Xakriabá	96
6 DISCUSSÃO	99
6.1 Fauna Flebotomínica.....	99
6.2 Infecção natural de flebotomíneos.....	108
6.3 A infecção por <i>Leishmania</i> em flebotomíneos e nos hospedeiros vertebrados na Terra Indígena Xakriabá	116
7 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localização do município de São João das Missões, onde está situada a Terra Indígena Xakriabá. 34
- Figura 2:** Delimitação da aldeia Imbaúbas, local de estudos na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil..... 35
- Figura 3:** Mapa representativo das casas localizadas na aldeia Imbaúbas selecionadas para o estudo de flebotomíneos na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. 36
- Figura 4:** Aspecto do peridomicílio de uma das casas na aldeia Imbaúbas, Terra indígena Xakriabá. B - Armadilha luminosa tipo HP exposta no peridomicílio de uma das casas. 37
- Figura 5:** Esquema das trilhas localizadas na aldeia Imbaúbas para o estudo de flebotomíneos na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil..... 38
- Figura 6:** Aspecto da trilha 1 para coleta de flebotomíneos. Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. 39
- Figura 7:** Aspecto da trilha 2 para coleta de flebotomíneos. Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. 39
- Figura 8:** Armadilha localizada na Trilha 1 para coleta de flebotomíneos em diferentes épocas do ano. A - estação chuvosa, mês de dezembro/2011; B - estação seca, mês de junho/2012..... 40
- Figura 9:** Aspecto da trilha 3 para coleta de flebotomíneos. A - vista panorâmica da área de coleta com afloramentos rochosos; B - local de coleta de flebotomíneos na trilha 3. 41
- Figura 10:** Armadilha luminosa HP situada ao longo da trilha 4. Nota-se a área de transição entre mata e afloramento rochoso. 41
- Figura 11:** Porcentagem de flebotomíneos por espécie coletados no peridomicílio das casas situadas na aldeia Imbaúbas, localizada na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, no período de Julho de 2008 a Julho de 2009. 52
- Figura 12:** Relação entre abundância e sexo de flebotomíneos capturados no peridomicílio das casas situadas na Aldeia Imbaúbas, durante o período entre Julho/08 a Julho/09 ($H_{1,198} = 26,62$; $p=0,000$). 53
- Figura 13:** Relação entre riqueza de espécies e sexo dos flebotomíneos coletados no peridomicílio das casas durante o período entre Julho/08 a Julho/09. 55
- Figura 14:** Relação entre abundância de flebotomíneos e os meses de coleta ($H_{5,99} = 18,44$; $p=0,002$) durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG. 56
- Figura 15:** Relação entre riqueza de espécies de flebotomíneos e os meses de coleta ($H_{5,99} = 29,58$; $p=0,000$) durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG..... 57

Figura 16: Percentagem das espécies vetoras de <i>Leishmania</i> coletadas no período de julho de 2008 a julho de 2009, no peridomicílio das casas na aldeia Imbaúbas, localizada na Terra Indígena Xakriabá, MG.	58
Figura 17: Relação entre a média do número de espécies capturadas e as estações climáticas ($H_{1,99} = 4,57$; $p=0,0325$) durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.	59
Figura 18: Porcentagem de flebotomíneos por espécie coletados nas trilhas selecionadas para o estudo de reservatórios silvestres e sinantrópicos de <i>Leishmania</i> , situadas na aldeia Imbaúbas da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, no período de Outubro de 2011 a Agosto de 2012.....	62
Figura 19: Relação entre abundância e sexo de flebotomíneos capturados na aldeia Imbaúba da Terra Indígena Xakriabá no período de outubro de 2011 a agosto de 2012 ($F_{1,36}=28,239$; $p=0,000$).....	63
Figura 20: Relação entre riqueza de espécies e sexo de flebotomíneos capturados na aldeia Imbaúba da Terra Indígena Xakriabá no período de outubro de 2011 a agosto de 2012 ($F_{1,36}=5,9671$; $p=0,01961$).....	63
Figura 21: Distribuição das principais espécies de flebotomíneos coletadas nas trilhas demarcadas, durante o período de Outubro de 2011 a Agosto de 2012.....	66
Figura 22: Relação entre abundância de flebotomíneos e meses de coleta nas trilhas situadas na Aldeia Imbaúbas. ($F_{5,12}=48,257$; $P=0,000$).....	67
Figura 23: Relação entre riqueza de espécies de flebotomíneos e meses de coleta nas trilhas situadas na Aldeia Imbaúbas ($F_{5,12}=1,5990$; $p=0,23381$).....	67
Figura 24: Distribuição dos flebotomíneos capturados em cada trilha de coleta localizada na aldeia Imbaúbas, situada na Terra Indígena Xakriabá, MG, durante o período entre outubro de 2011 a agosto de 2012.	70
Figura 25: Relação entre riqueza de espécies e ambientes de coleta de flebotomíneos na Aldeia Imbaúbas durante o período de estudos ($F_{2,36} = 11,882$; $p=0,00011$).....	71
Figura 26: Relação entre abundância de flebotomíneos e ambientes de coleta na Aldeia Imbaúbas, durante o período de estudos ($F_{2,21} = 7,0678$; $p<0,05$).	72
Figura 27: Relação entre riqueza de espécies e estações climáticas durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas ($F_{1,36}=0,04932$; $p=0,82551$).	73
Figura 28: Relação entre abundância de flebotomíneos e estações chuvosas durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas ($F_{1,36}=4,7571$; $p=0,03579$).	73
Figura 29: Relação entre estações climáticas e abundância de flebotomíneos por sexo na aldeia Imbaúbas durante o período de estudos ($F_{1,36}=8,7494$; $p=0,00544$).....	74
Figura 30: Relação entre estações climáticas e riqueza de flebotomíneos por sexo na aldeia Imbaúbas durante o período de estudos ($F_{1,36}=2,6521$; $p=0,11214$).	75
Figura 31: Análise multivariada comparando a composição da fauna de flebotomíneos entre os ambientes amostrados (mata, ambiente rochoso e mata de transição) e as estações climáticas (chuvosa e seca). Destaque para a separação dos ambientes.	77

Figura 32: Análise multivariada comparando a composição da fauna de flebotomíneos entre os ambientes amostrados (mata, ambiente rochoso e mata de transição) e as estações climáticas (chuvosa e seca). Destaque para a separação das estações.....	78
Figura 33: Porcentagem de flebotomíneos capturados por sexo, nos diferentes ecótopos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.....	81
Figura 34: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados da reação de <i>Nested</i> PCR realizada com fêmeas de flebotomíneos coletadas no peridomicílio das casas da aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, MG. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb; CP1 - controle positivo de <i>Le. amazonensis</i> ; CP2 - controle positivo de <i>Le. braziliensis</i> ; CP3 - controle positivo de <i>Le. infantum</i> ; CP4 - controle positivo de <i>Le. guyanensis</i> ; 01 a 11 - amostras de flebotomíneos; CN - controle negativo.....	85
Figura 35: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais onde foi possível encontrar flebotomíneos positivos no peridomicílio das casas localizadas na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.....	88
Figura 36: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando produtos amplificados pela PCR <i>its1</i> de amostras de fêmeas capturadas nas trilhas de coleta na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG. Canaletas: PM 100pb - peso molecular de 100pb; CP1 - controle positivo de <i>Le. amazonensis</i> (IFLA/BR/67/PH8); CP2 - controle positivo de <i>Le. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903), CP3 - controle positivo de <i>Le. infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75), CP4 - controle positivos de <i>Le. guyanensis</i> (MHOM/BR/75/M4147); 1 a 10 - fêmeas de flebotomíneos e CN - controle negativo....	92
Figura 37: Gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica de PCR-RFLP utilizando <i>HaeIII</i> em amostras de fêmeas capturadas nas trilhas da aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG. Canaletas: PM 100pb - peso molecular de 100pb; CP1 - controle positivo de <i>Le. amazonensis</i> (IFLA/BR/67/PH8); CP2 - controle positivo de <i>Le. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903), CP3 - controle positivo de <i>Le. infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75), CP4 - controle positivos de <i>Le. guyanensis</i> (MHOM/BR/75/M4147); 1 a 10 - fêmeas de flebotomíneos.....	93
Figura 38: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais de registro de flebotomíneos positivos nas trilhas de coleta na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.....	95
Figura 39: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais de registro de flebotomíneos positivos nas trilhas e no peridomicílio das casas da aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.....	96
Figura 40: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais onde foram registrados cães, pequenos mamíferos, casos humanos de LTA e flebotomíneos positivos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.....	98
Figura 41: Ciclo da Leishmaniose Tegumentar Americana por <i>Leishmania braziliensis</i> na Aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.....	119
Figura 42: Ciclo da Leishmaniose Visceral por <i>Leishmania infantum</i> na Aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de flebotomíneos capturadas no peridomicílio das casas da aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, no período de julho 2008 a julho 2009.....	51
Tabela 2: Flebotomíneos coletados, por sexo e por mês de captura no peridomicílio das casas localizadas na aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, MG, no período de julho de 2008 a julho de 2009.....	54
Tabela 3: Espécies de flebotomíneos capturadas nas trilhas de coleta localizadas na aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, no período de outubro de 2011 a agosto de 2012.....	61
Tabela 4: Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados nas trilhas de acordo com os meses de coleta na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.....	65
Tabela 5: Total de flebotomíneos por sexo coletados nas trilhas demarcadas para o estudo, na aldeia Imbaúbas localizada na Terra Indígena Xakriabá, MG, durante o período entre outubro de 2011 a Agosto de 2012.....	69
Tabela 6: Número total e porcentagem representativa de cada espécie capturada nas trilhas de coleta durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas.....	76
Tabela 7: Distribuição das espécies de flebotomíneos por sexo, capturadas durante o período de estudos, na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.....	80
Tabela 8: Fêmeas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio das casas, referente ao segundo e terceiro dia, utilizadas no estudo de infecção natural por <i>Leishmania</i> , durante o período de estudos.....	83
Tabela 9: Número de fêmeas de flebotomíneos analisadas, por espécie, de acordo com o número de espécimes presente em cada amostra processada.....	84
Tabela 10: Resultado da infecção natural de fêmeas de flebotomíneos coletados no peridomicílio das casas, durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.....	87

Tabela 11: Fêmeas de flebotomíneos capturadas nas trilhas de coleta utilizadas no estudo de infecção natural por Leishmania durante o período de estudos.....	90
Tabela 12: Número de fêmeas de flebotomíneos analisadas, por espécie, de acordo com o número de espécimes presente em cada amostra processada.....	91
Tabela 13: Resultado de infecção natural de fêmeas de flebotomíneos capturadas das trilhas de coleta, durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µL: microlitro

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato

Ev. Evandromyia

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

ITS1: Internal Transcribed Spacer 1

Km²: Quilômetro quadrado

Le: Leishmania

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu: Lutzomyia

LV: Leishmaniose Visceral

MG: Minas Gerais

Mg: Migonemyia

Mi: Micropygomyia

mM: milimolar

MS: Ministério da Saúde

Mt. Martinsmyia

ng: nanogramas

nm: nanômetros

Ny: Nyssomyia

OMS: Organização Mundial de Saúde

Pb: pares de bases

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PCR-RFLP: *Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*

PM: Peso molecular

pmol: pico mols

SSUrRNA: *Small subunit Ribossomal RNA*

U: unidades

WHO: World Health Organization

RESUMO

As leishmanioses são protozooses de alta prevalência em regiões tropicais como o Brasil e são transmitidas por vetores flebotomíneos, cujos hospedeiros são compostos por diferentes espécies animais vertebrados. O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos entomológicos relacionados à epidemiologia das leishmanioses na aldeia Imbaúbas da Terra Indígena Xakriabá, Município de São João das Missões, Minas Gerais. Durante o período de julho de 2008 a julho de 2009 foram realizadas seis coletas de flebotomíneos sendo dispostas 40 armadilhas luminosas no peridomicílio de 20 casas sorteadas aleatoriamente. Entre outubro de 2011 a agosto de 2012 foram realizadas seis campanhas de captura de flebotomíneos e 20 armadilhas luminosas foram distribuídas em 4 trilhas (cinco armadilhas por trilha) previamente demarcadas para estudo de hospedeiros silvestres e sinantrópicos de *Leishmania*. Foram utilizados testes estatísticos para avaliar diferenças no padrão de distribuição de espécies, riqueza e abundância de flebotomíneos nos diferentes ecótopos. Um total de 8.046 flebotomíneos pertencentes a 28 espécies e 11 gêneros foram coletados e identificados. As espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia intermedia* foram as mais abundantes no peridomicílio enquanto *Martinsmyia minasensis* e *Lutzomyia cavernicola* as mais abundantes nas trilhas de coleta. As fêmeas foram dispostas em "pools" contendo no máximo dez espécimes da mesma localidade, espécie e data de coleta para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. por métodos moleculares. A identificação da espécie de *Leishmania* foi feita a partir da técnica de *ITS1* PCR-RFLP utilizando a enzima *HaeIII* e o sequenciamento genético para um alvo do gene SSUrRNA. Foi possível detectar a presença de DNA de *Leishmania* em 11 amostras provenientes do peridomicílio: *Lu. longipalpis* (2), *Ny. intermedia* (4); *Lu. renei* (2); *Lu. ischnacantha*; *Micropygomyia goiana* e *Evandromyia lenti*. Com relação às trilhas, foi possível verificar a presença de DNA de *Leishmania* em 12 amostras: *Mt. minasensis* (5); *Ny. intermedia* (3); *Mi. peresi* (2); *Mi. capixaba* e *Ev. lenti*. Os resultados obtidos reforçam a importância epidemiológica das espécies *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* na transmissão da leishmaniose visceral e tegumentar respectivamente, além do encontro de outras espécies com DNA de *Leishmania* como *Mt. minasensis* e *Ev. lenti* que podem participar de um ciclo silvestre e/ou sinantrópico de *Leishmania* na área de estudos.

ABSTRACT

Leishmaniasis are protozooses highly prevalent in tropical regions such as Brazil and are transmitted by sand flies vectors, whose hosts are different vertebrate species. The objective of this study was to survey the entomological aspects related to the epidemiology of this disease in Imbaúbas village of the Xacriabá Indian Reserve, São João das Missões municipality, Minas Gerais state. Between July 2008 and July 2009, six sand fly collections were carried out using 40 light traps placed in the peridomicile of 20 randomly selected houses. Between October 2011 and August 2012, another six collections to capture sand flies were carried out with 20 light traps distributed in 4 tracks (five traps per track) selected for a previous study of wild and synanthropic hosts of *Leishmania*. Statistical tests were used to evaluate differences in the distribution patterns, richness and abundance of sand flies in different ecotopes. A total of 8,046 sand flies belonging to 28 species and 11 genera were collected and identified. The species *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia intermedia* were the most abundant in peridomicile, while *Martinsmyia minasensis* and *Lutzomyia cavernicola* were the most abundant on the tracks. Females were organized in pools with a maximum of ten specimens from the same locality, species and date for detection of *Leishmania* spp. by molecular methods. *Leishmania* species identification was made with *ITS1* PCR-RFLP using the enzyme *HaeIII* and genetic sequencing was used for *SSUrRNA* target. The presence of *Leishmania* DNA was detected in 11 samples from peridomicile: *Lu. longipalpis* (2), *Ny. intermedia* (4), *Lu. renei* (2), *Lu. ischnacantha*, *Micropygomyia goiana* and *Evandromyia lenti*. On the tracks, it was possible to verify the presence of *Leishmania* DNA in 12 samples: *Mt. minasensis* (5), *Ny. intermedia* (3), *Mi. peresi* (2), *Mi. capixaba* and *Ev. lenti*. The results support the epidemiological importance of *Lu. longipalpis* and *Ny. intermedia* in the transmission of visceral and cutaneous leishmaniasis respectively, in addition to the finding of other species associated with *Leishmania* DNA, such as *Mt. minasensis* and *Ev. lenti* which may participate in a wild and/or synanthropic cycle of *Leishmania* in the studied area.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças infecciosas, de caráter crônico, consideradas zoonoses, podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito (Ministério da Saúde, 2007; Rotureau, 2006; Medeiros & Roselino, 1999).

Os agentes etiológicos das leishmanioses apresentam duas formas básicas: promastigotas (flagelada) encontrada no intestino dos flebotomíneos vetores e amastigota, intracelular obrigatória de células do sistema monocítico fagocitário. Os protozoários pertencem ao gênero *Leishmania* Ross 1903, à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, todos com grau variável de especificidade pelo hospedeiro (Chance, 1985).

O gênero *Leishmania* compreende aproximadamente 30 espécies, das quais cerca de 20 são patogênicas para a espécie humana (Ashford, 2000; Shaw, 2002; Desjeux, 2004). Entre as parasitoses humanas, as leishmanioses ocupam um lugar de destaque, devido à sua importância médica e econômica e também por representar um dos maiores problemas de saúde pública (WHO, 1990; Barral *et al.*, 1991).

Atualmente, este agravo encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, sendo reportada em 98 países e territórios, acometendo 12 milhões de pessoas, sendo que 350 milhões estão expostas à infecção (WHO, 2010). Brasil, Índia, Bangladesh e Sudão são responsáveis por 90% dos casos notificados de leishmaniose visceral. Brasil, Peru e Bolívia respondem por 90% dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa enquanto que Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose cutânea. As infecções humanas são encontradas também em 16 países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal. Sua incidência vem aumentando para cerca de dois milhões de casos mundiais ao ano (WHO, 2011). Como outras doenças tropicais, as leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas (Lima *et al.*, 1997).

A transmissão da infecção para os hospedeiros vertebrados ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), pertencentes a diversos gêneros da subfamília Phlebotominae (Galati, 2003). As fêmeas participam diretamente do processo de infecção, uma vez que são hematófagas e, portanto possuem importância epidemiológica. Estes insetos estão amplamente distribuídos na natureza e encontrados nos mais diferentes nichos ecológicos (Shaw, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral. A leishmaniose cutânea é uma doença de baixa gravidade; já a forma mucocutânea pode causar lesões extremamente mutilantes na face, enquanto a forma cutâneo-difusa apresenta um aspecto hanseniforme, além de ser um grande desafio terapêutico. As formas cutâneas da doença resultam da multiplicação do parasito em células do Sistema Fagocitário Mononuclear da pele (Garnham, 1987). As diferentes manifestações clínicas dependem de vários fatores, dentre eles, a espécie e virulência da *Leishmania* envolvida, e aspectos relacionados ao hospedeiro, como “status” imunológico e nutricional, dentre outros.

Atualmente as espécies de leishmânias que infectam o homem são classificadas em complexos e agrupadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com o tipo de desenvolvimento dos flagelados no trato digestório dos flebotomíneos, dentre outros aspectos (Lainson & Shaw, 1987).

- *Leishmania (Leishmania)*: desenvolvimento predominante nos intestinos médio e anterior – desenvolvimento suprapilário;
- *Leishmania (Viannia)*: processo de desenvolvimento apresenta uma fase que se passa no intestino posterior – desenvolvimento peripilário.

São representantes do subgênero *Leishmania (Viannia)* as leishmânias do complexo *braziliensis*, sendo representadas no Brasil pelas espécies: *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (Viannia) guyanensis* e, mais recentemente, as espécies *Le. (Viannia) lainsoni*, *Le. (Viannia) naiffi*, *Le. (Viannia) lindenbergi* e *Le. (Viannia) shawi* foram identificadas em estados da região Norte (Grimaldi & Tesh, 1993; Cunningham, 2002; Ashford, 2000). Por sua vez, o subgênero *Leishmania (Leishmania)* é formado pelos complexos *mexicana* e *donovani*, sendo

representadas no Brasil pelas espécies *Le. (Leishmania) amazonensis* e *Le. (Leishmania) infantum* (Magill, 2000).

A leishmaniose visceral (LV) possui uma grande importância em saúde pública devido à sua ampla distribuição e alta letalidade, principalmente em crianças desnutridas, idosos, pacientes portadores de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em pacientes não tratados (Hommel *et al.*, 1995, Guerin *et al.*, 2002, WHO, 2010). É uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (Gontijo & Melo, 2004).

A LV é causada por duas espécies do complexo *donovani*: o agente etiológico *Le. donovani* Laveran & Mesnil, 1903 é responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia. Nestas regiões, o homem atua como reservatório do parasito e a doença apresenta um perfil antroponótico (Tavares *et al.*, 2003). Já a espécie *Le. infantum* Nicolle, 1908 é o agente etiológico da LV zoonótica presente nas regiões sudoeste e central da Ásia, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea. No Novo Mundo, a espécie *Le. infantum* (sin: *Le. chagasi* Cunha & Chagas, 1937) é o agente da LV que também apresenta um caráter zoonótico (Killick-Kendrick, 1985; Rioux *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 2000, Dantas-Torres, 2006).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil, geralmente é causada por *Le. (Leishmania) amazonensis* além de diferentes espécies do subgênero *Viannia* como: *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. shawi*, *Le. naiffi*, *Le. lainsoni* e *Le. lindenbergi*, de modo que a espécie mais comum em infecções humanas é *Le. braziliensis*. As infecções por LTA se manifestam frequentemente em áreas expostas do corpo como face, membros e pescoço. No local da picada surgem lesões cutâneas que podem evoluir para diversas formas: cutânea localizada, disseminada, difusa e mucosa (Nadim Faghieh, 1968; Amato, 2003).

No Brasil, é provável que a distribuição das espécies de *Leishmania* seja mais ampla que a conhecida, pois em geral esta é baseada apenas em dados de registro de casos humanos (Lainson & Shaw, 1987; Grimaldi *et al.*, 1989; Kawa e Sabroza, 2002). Porém, uma grande variedade de mamíferos silvestres e domésticos que vão desde roedores, edentatos, carnívoros, marsupiais, ungulados e primatas já foram encontrados naturalmente infectados por diferentes espécies de *Leishmania* (Deane

& Deane, 1954, Lainson & Shaw, 1998, Quaresma *et al.*, 2011, Marcelino *et al.*, 2011, Freitas *et al.*, 2012; Carreira *et al.*, 2012).

A LTA apresenta nos últimos anos um processo de expansão em todas as regiões do Brasil, tanto em áreas notoriamente endêmicas, como incidência em novas áreas. Caracteriza-se não só pelo aumento expressivo no número de casos, mas também por apresentar uma importante difusão espacial (Grimaldi Jr & Tesh, 1993; Brandão-Filho & Shaw, 1994; Lainson & Shaw, 1998; Brandão-Filho *et al.*, 1999), chamando atenção para o crescente registro de casos em áreas de ocupação antiga, inclusive em áreas peri-urbanas. Neste contexto, a LTA apresenta importante heterogeneidade, relacionada às diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia, às formas clínicas associadas e ao padrão de transmissão envolvido, impondo novas questões e desafios para o planejamento de programas e estratégias de controle (Marzochi, 1989).

De todos os Estados do Brasil, as populações rurais do Norte, Nordeste e Centro Oeste têm sido as mais afetadas, muitas delas ainda com áreas em processo de colonização e florestas abundantes. Nas regiões Norte e Nordeste encontram-se cerca de 75% dos casos registrados no país (Gomes, 1992; Marzochi, 1992). No Nordeste, a doença é encontrada em áreas de colonização antiga, especialmente nas zonas serranas dos Estados do Ceará, Paraíba e Bahia (Cuba *et al.*, 1985; Vexenat *et al.*, 1986; Azevedo & Rangel, 1990; Vasconcelos *et al.*, 1994).

Na região Sudeste, a ação do homem sobre o meio ambiente modificou profundamente as características epidemiológicas da doença. Em Minas Gerais, podem ser vistos focos no Vale do Rio Doce, e também focos recentes na periferia de Belo Horizonte (Passos *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 1999; Luz *et al.*, 2001).

Deve ser destacado que no ciclo de transmissão zoonótico são agregadas áreas com características ecológicas distintas, que parecem configurar situações particulares na transmissão e manutenção da endemia: aquelas associadas à derrubada das matas para a construção de estradas e instalações de povoados em regiões pioneiras, a exploração desordenada da floresta, como a derrubada de matas para extração de madeira, agricultura, pecuária, entre outras; áreas com preservação de pequenos trechos de cobertura vegetal conservada, com possibilidade de exposição eventual do indivíduo ao vetor e parasito neste ambiente restrito e, finalmente, áreas nas quais o processo de urbanização acarretou a

criação das condições favoráveis à produção de surtos endêmicos na periferia de cidades e povoados (MS/FUNASA, 2000; Kawa & Sabroza, 2002).

O padrão epidemiológico das leishmanioses predominante nas primeiras décadas do século XX foi o de uma zoonose de transmissão silvestre, que atingia o homem quando da sua presença nos ambientes florestais. O crescente desaparecimento das florestas deu lugar ao aparecimento do fenômeno da domiciliação de vetores, alterando a condição de exposição do homem ao parasito. A circulação dos agentes causais em ambientes fora dos limites geográficos dos focos naturais é crescente e induz ao aparecimento de mudanças dos perfis clássicos da doença. Outro fator determinante da exposição do homem é a expansão demográfica, no qual o processo de urbanização vem ocorrendo próximo das áreas dos focos naturais (Gomes, 1992).

1.2 Biologia e Ecologia dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. O gênero *Lutzomyia*, segundo as classificações de Martins *et al.* (1978) e Young & Duncan (1994) é o responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas. Todavia, de acordo com Galati (1995, 2003), que propôs a classificação de Phlebotominae, com abordagem filogenética, os flebotomíneos vetores são incluídos em duas subtribos: Lutzomyiina e Psychodopygina, com vários gêneros em cada uma. Em Lutzomyiina destacam-se os gêneros *Lutzomyia*, *Migonemyia* e *Pintomyia* e em Psychodopygina: *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Trichophoromyia* e *Viannamyia*.

Os flebotomíneos, assim como a generalidade dos dípteros, são insetos holometabólicos (passam pelas fases de ovo, quatro estádios larvários, pupa e adulto). As formas imaturas têm habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Os adultos são amarelados ou castanhos, com cerca de 2,5 mm de comprimento, possuem vôo saltado e quando em repouso mantêm as asas eretas. (Aguiar & Medeiros, 2003). A superfície corporal é bastante permeável apresentando um revestimento quitinoso delgado, necessitando assim, abrigar-se em locais onde

possam proteger-se das mudanças bruscas que ocorrem no meio ambiente (Aguiar *et al.*, 1987; Medeiros, 2003).

Os flebotomíneos têm sido bem estudados e registrados na literatura científica em todo o mundo. No Brasil são relatados vários estudos (Arias *et al.*, 1977; Ryan, 1986; Castellón *et al.*, 1989; Barrett *et al.*, 1996; Fé *et al.*, 1998; Dias-Lima *et al.*, 2000, 2003; Brandão-Filho, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Feitosa *et al.*, 2004), principalmente para esclarecer aspectos relacionados a epidemiologia das leishmanioses. O estudo ecoepidemiológico dos flebotomíneos tem como importância o interesse médico já que estes são vetores de doenças. Além das leishmânias, são hospedeiros de bactérias, fungos, determinadas espécies de plasmódios, hemogregarinas, tripanosomas e endotripanos (Forattini, 1973; Christensen & Herrer, 1979; Warburg, 1991; Shaw, 1992; Dujardin *et al.*, 1999). Distribuem-se por quase todas as regiões do mundo, sendo mais abundantes na Região Neotropical, com maior número de espécies e densidade que flutuam de acordo com a estação climática (Sherlock, 2003).

Em todo o mundo são conhecidas, aproximadamente, 900 espécies de flebotomíneos, das quais, mais de 500 estão presentes na região Neotropical e destas, mais de 229 já foram registradas no Brasil, representando 25,44% do total e 45,8% das que ocorrem na Região Neotropical (Galati, 2003; Ready, 2013).

Nas Américas as primeiras espécies registradas de flebotomíneos foram descritas em 1907, e até 1940, somente 33 espécies eram conhecidas. A partir da descoberta de que algumas espécies de flebotomíneos estariam participando do ciclo de transmissão de agentes patogênicos ao homem e a outros animais, os estudos sobre esses insetos aumentaram consideravelmente, visando entre outras coisas conhecer o seu ciclo de vida e identificar qual espécie de flebotomíneo atuaria como vetora de agentes patogênicos em determinadas regiões (Aragão, 1922; Barretto, 1943; Forattini, 1973).

Os flebotomíneos iniciam suas atividades no crepúsculo vespertino. Quanto à alimentação, ambos os sexos sugam sucos vegetais, néctar de flores, frutos e soluções açucaradas (Smith; Halder; Ahmed, 1940,1941; Pessoa & Barreto, 1948; Deane; Deane; Alencar, 1955; Sherlock & Sherlock, 1961, 1972; Alexander & Usma, 1994). Os carboidratos são utilizados como fonte de energia e amadurecimento dos ovários da maioria das espécies, e podem afetar o desenvolvimento e o

estabelecimento das promastigotas no tubo digestório das fêmeas (Sherlock, 2003). Quando os flebotomíneos ingerem o açúcar, este é estocado no divertículo, onde é levado ao trato digestório e então absorvido (Brazil & Brazil, 2003). As fêmeas, além da alimentação de açúcares, também são hematófagas, exceto raríssimas espécies autógenas, pois necessitam de sangue humano ou animal para a maturação de seus ovários, daí a importância para a transmissão de agentes patógenos (Forattini *et al.*, 1976; Sherlock, 2003).

A distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos é influenciada por barreiras físicas, precipitação pluviométrica, vegetação, luminosidade e abundância de hospedeiros vertebrados (Arias, *et al.*, 1985). Sabe-se ainda que a presença de animais influencia na densidade dos flebotomíneos dentro ou próximo à habitações humanas e, conseqüentemente, aumenta os riscos de transmissão de espécies de *Leishmania* para humanos (Ximenes; Souza; Castellón, 1999). Alguns estudos têm mostrado que a agregação de flebotomíneos em ambiente peridomiciliar está relacionada com a liberação de feromônios pelos insetos e cairomônios pelos hospedeiros (Dougherty; Hamilton; Ward, 1993; Quinnell & Dye, 1994).

Diante da complexidade da relação parasito/vetor/hospedeiro é necessário realizar estudos sobre a fauna flebotomínica e seus aspectos ecológicos em cada área de interesse na tentativa de empregar medidas de controle direcionadas a minimizar a expansão desta doença (Almeida *et al.*, 2010).

1.3 Detecção de *Leishmania* spp. em Flebotomíneos

Várias espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas vetoras de *Leishmania* e normalmente esta associação é feita de acordo com a espécie dominante em uma determinada área endêmica. Os estudos de transmissão em laboratório permanecem difíceis, assim como o entendimento sobre os locais de procriação. Sem estas informações torna-se difícil determinar os fatores que definem a distribuição ecológica e geográfica de vários vetores e, conseqüentemente, da doença. Rossi *et al.* (2008) afirmam que estudos sobre a prevalência de infecção por *Leishmania* em flebotomíneos são importantes indicadores sobre a intensidade da transmissão do parasito.

Atualmente a incriminação de um flebotomíneo como vetor é baseada numa série de critérios sugeridos por Killick-Kendrick (Killick-Kendrick & Ward, 1981; Killick-Kendrick, 1990) e de acordo com Maroli *et al.*, (2012) nas Américas um total de 56 espécies de flebotomíneos estão envolvidas na transmissão de 15 espécies de *Leishmania*. Somente no Brasil, aproximadamente 40 espécies, pertencentes a oito gêneros, são consideradas suspeitas ou já foram incriminadas como vetora das leishmanioses (Rangel & Lainson, 2009), e destas, cerca de 19 espécies estão relacionadas com a infecção humana por *Leishmania* sp. (Rangel & Lainson 2003, Shimabukuro, 2007).

Para que o completo desenvolvimento da *Leishmania* e conseqüentemente o estabelecimento da infecção ocorra no vetor, esta tem que transpor diversas barreiras tais como: susceptibilidade às enzimas digestivas do inseto, incapacidade de escape da matriz peritrófica, ineficiência na ligação da forma promastigota as células epiteliais do intestino e diferenciação defeituosa prejudicando a migração das formas metacíclicas infectantes. O inseto vetor, por sua vez, não sairá ileso visto que as leishmânias, ao romper estas barreiras, acabam por inibir a ação de suas enzimas digestivas e as formas metacíclicas acabam por danificar sua válvula esofágica, prejudicando funções como, digestão, oviposição, alimentação entre outros (Sacks & Kamhawi, 2001; Kamhawi, 2006).

A detecção do parasito no inseto geralmente é feita a partir do encontro das formas promastigotas (flageladas) no intestino médio do vetor, associado ou não ao cultivo *in vitro* ou *in vivo* do protozoário. A pesquisa de flagelados no tubo digestório do vetor e a identificação da espécie do parasito, normalmente são realizadas por observação microscópica após dissecação ou tentativa de isolamento do agente proveniente de insetos em meios de cultura. Porém, fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que podem comprometer o diagnóstico microscópico e o isolamento em cultura (Paiva *et al.*, 2007).

Uma dificuldade encontrada nos estudos epidemiológicos é a necessidade de se examinar grande quantidade de exemplares, o que torna o custo elevado, pois há necessidade de se contar com técnicos especializados, submetidos a constantes ciclos de capacitação e reciclagem; além disso, é preciso lembrar as limitações da técnica de dissecação empregada na pesquisa de formas flageladas da *Leishmania*

sp., que é extremamente demorada e pouco específica, já que a presença de flagelados de outras espécies parasitárias pode dar origem a resultados não conclusivos na microscopia (Rodas, 2006).

Michalsky *et al.* (2002), destacam que a taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e identificação correta da *Leishmania* infectante em uma determinada espécie de flebotomíneo é de primordial importância nos estudos de capacidade vetorial e epidemiológico das leishmanioses e, que os métodos moleculares têm se mostrado eficientes para detecção de *Leishmania* em flebotomíneos independentemente da carga parasitária.

De acordo com Savani *et al.* (2009) através da utilização do método convencional (dissecção) para investigar a infecção natural por flagelados, têm sido frequentemente encontrada baixa taxa de fêmeas de flebotomíneos parasitadas. No Brasil e outros países sul-americanos nas áreas endêmicas das leishmanioses, quando utilizado o método convencional os valores variam de 0,06% a 0,47% enquanto, quando são utilizadas técnicas de biologia molecular, as taxas são de 0,8 a 6,0%.

Rossi *et al.* (2008) utilizando o método de dissecção, encontrou 1,4% de fêmeas de *Phlebotomus perniciosus* infectados com promastigotas. No entanto, quando utilizou a PCR, a taxa global de detecção do DNA de *Leishmania* foi de 47,2%, evidenciado que a positividade foi surpreendentemente alta quando comparada com os resultados de microscopia, mostrando que a técnica molecular pode ser mais sensível.

A identificação correta das espécies de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas é importante para confirmar o papel destas na transmissão do parasito em dada região (Paiva *et al.*, 2007). A observação de que pequenos setores dentro de áreas maiores, consideradas endêmicas, podem ter uma frequência de flebotomíneos maior e sua associação com a doença humana podem ser indicativos da distribuição espacial da doença e deve ser considerada no planejamento das estratégias de controle (Miranda *et al.*, 2002).

Estudos recentes utilizando técnicas baseadas na PCR, têm sido realizados para pesquisa de DNA de *Leishmania* sp. (Carvalho *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2008, 2010; Quaresma *et al.*, 2011; Dougall *et al.*, 2011; Marcelino *et al.*, 2011; Michalsky

et al., 2011; Pita-Pereira *et al.*, 2011; Vasconcelos *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2011; Bacha *et al.*, 2011). Segundo esses autores os resultados utilizando a PCR independem da carga parasitária das amostras, sendo um instrumento de grande sensibilidade na detecção de *Leishmania*.

As técnicas baseadas na PCR, devidamente padronizadas e aplicadas de forma correta, constituem uma ferramenta importante nos estudos epidemiológicos para identificação de flebotomíneos infectados e determinação das taxas de infecção dos mesmos nas áreas endêmicas para as leishmanioses.

A principal espécie de flebotomíneo vetora de LTA no Brasil é *Nyssomyia intermedia sensu lato* Lutz & Neiva, 1912 cuja distribuição geográfica no Brasil abrange os Estados Piauí, Ceará, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás (Galati, 2003; Andrade Filho *et al.*, 2007). Já em 1943, Barretto sugeria a preferência desta espécie de flebotomíneo por matas de formação secundária e regiões que vinham sofrendo ação do homem por algum tempo (Galati, 2003). Porém, deve-se ressaltar o papel de outras espécies, como *Ny. neivai*, *Ny whitmani*, e *Migonemyia migonei* na veiculação de espécies dermatrópicas de *Leishmania* (Pita Pereira *et al.*, 2005, 2009; Paiva *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2010).

No Brasil, a literatura científica incrimina *Lutzomyia longipalpis* como a principal vetora da LV, pois esta tem sido frequentemente encontrada infectada naturalmente por *Le. (Leishmania) infantum*, possuindo um altíssimo grau de antropofilia (Deane 1956, Lainson & Shaw 1979, 1998) e ampla distribuição geográfica. É encontrada desde o México até o sul da América do Sul (Lainson & Shaw, 1978; Lanzaro *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 2008; Salomón *et al.*, 2011), embora seu padrão de distribuição e abundância varie de região para região dependendo das características ambientais e sazonalidade.

A suposição de que *Lu. longipalpis* fosse o único flebotomíneo vetor de *Le. (Leishmania) infantum* no Brasil perdurou até recentemente quando um surto de LV ocorrido em Corumbá e Ladário, Estado do Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia cruzi* foi encontrada em alta densidade e infectada naturalmente, e não foram encontrados exemplares de *Lu. longipalpis*. Estes achados levaram os pesquisadores a considerar essa espécie como o vetor na região (Galati *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1998). Pouco se sabe sobre a distribuição de *Lu. cruzi*, e segundo Young e Duncan

(1994), ela é restrita ao estado do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Missawa & Lima, 2006; Missawa *et al.*, 2011)

Em Minas Gerais, dezesseis espécies de flebotomíneos já foram associadas com diferentes espécies de *Leishmania*. Entre elas, podemos citar a presença de importantes vetores, como: *Ny. intermedia* (Saraiva *et al.* 2010); *Lu. longipalpis* (Michalsky *et al.* 2011, Saraiva *et al.* 2010), *Ny. whitmani* (Saraiva *et al.* 2010) além de *Ny. neivai* (Saraiva *et al.* 2008), *Pintomyia fischeri*, *Pi. pessoai*, *Psychodopygus lloydi* e *Ps. hirsutus* (Margonari *et al.* 2010; Quaresma *et al.* 2012 e Rangel *et al.* 1985).

Além destes relatos, outras espécies com importância vetorial até então desconhecida, foram encontradas naturalmente infectadas ou associadas ao DNA de *Leishmania* através de métodos moleculares no referido estado: espécies do gênero *Evandromyia*, como *Ev. cortellezzi* (Carvalho *et al.* em 2008), *Ev. sallesi*, *Ev. termitophila* (Saraiva *et al.* 2008, 2010) e *Ev. lenti* (Margonari *et al.* 2010). No trabalho deste último autor, espécies como *Pintomyia christensenii*, *Pi. monticola*, *Pi. pessoai*, *Pi. fischeri*, *Psathyromyia aragaoi* e *Ps. lutziana* também foram encontradas associadas ao DNA de *Leishmania*.

1.4 As Leishmanioses e a Terra Indígena Xakriabá

Em Minas Gerais, à semelhança dos demais estados brasileiros, os povos indígenas foram drasticamente dizimados ou integrados à sociedade nacional. Hoje, no Estado de Minas Gerais, vivem somente oito etnias, sendo que nem todas são originárias desta região. De acordo com Campos *et al.* (2006), o Censo Demográfico do IBGE mostrou que a população indígena em Minas Gerais passou de 6.112, em 1991, para 48.720 pessoas em 2000.

Coimbra Jr. & Santos (2001) destacam o papel de diversas doenças infecto-parasitárias no perfil de morbimortalidade indígena, incluindo endemias como tuberculose, malária e leishmaniose.

Dentre as principais metas dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas/FUNASA/MS ressaltam-se: redução da mortalidade de crianças menores de cinco anos, maior cobertura vacinal, redução das doenças carenciais e infecto-

parasitárias, eliminação do tétano neonatal e desnutrição entre os índios; redução da tuberculose, malária, doenças sexualmente transmissíveis (DST-Aids) e leishmaniose visceral humana e canina.

Ainda que pouco estudado, o perfil epidemiológico das doenças enteroparasitárias apresenta variações em função da localidade, de fatores climáticos, sócio-econômicos, educacionais, hábitos culturais e de saneamento. Embora esse tipo de estudo esteja limitado a algumas etnias, o fator predisponente ao elevado parasitismo nas comunidades indígenas pode estar associado à falta de condições de infra-estrutura sanitária das aldeias e aos hábitos culturais dessas populações. (Kobayashi *et al.*, 1995). Além disto, a densidade de flebotomíneos pode estar associada às precárias condições de higiene encontradas em ambiente peridomiciliar e também à presença de abrigos de animais domésticos, como galinhas, cães, porcos e cavalos (Ximenes, Souza & Castellon, 1999).

Desde 2001 têm sido registrados casos autóctones de LTA na reserva indígena Xakriabá. Somente em 2006 foram diagnosticados 48 casos entre os habitantes da reserva (MS/FUNASA, 2007). Desde então, o número de casos continua alto: no período de 2001 a 2008 foram registrados 224 casos. Existe uma carência de conhecimento relacionado a este foco de transmissão, o que dificulta as ações de controle e, de fato, as únicas medidas adotadas são o diagnóstico e tratamento dos casos humanos, que freqüentemente são realizados tardia e inadequadamente.

Recentemente, Quaresma *et al.* (2011) identificaram hospedeiros naturalmente infectados por *Leishmania* na Terra Xakriabá e, em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa (dados não publicados), cerca de 87 pacientes foram diagnosticados com LTA no período de 2008 a 2010.

Fica evidente, portanto, a necessidade de promover meios para esclarecer a situação epidemiológica das Leishmanioses nesta região, como o conhecimento da fauna flebotomínea, a fonte alimentar dos flebotomíneos capturados e a identificação das espécies vetoras de *Leishmania*.

2 JUSTIFICATIVA

A região norte do Estado de Minas Gerais, onde está localizada a Terra Indígena Xakriabá, apresenta relatos de casos de Leishmaniose Tegumentar e Visceral, em várias cidades como Montes Claros, Januária, Janaúba e Varzelândia, ilustrando o processo de expansão e urbanização do agravo (Monteiro *et al.*, 2005; Michalsky *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2007).

Fatores sócio-econômicos, tais como crescimento populacional e a colonização de áreas rurais causam desequilíbrio ecológico e proporcionam condições favoráveis ao estabelecimento da doença (Ávila-Pires, 1989).

A importância das leishmanioses como problema de saúde pública entre os índios da Terra Xakriabá reside não apenas na sua elevada incidência, como também nos transtornos que ela vem ocasionando à vida dos indivíduos afetados, principalmente pela falta de acesso ao tratamento rápido e eficiente, merecendo maior atenção no campo de estudos das doenças endêmicas que acometem os indígenas mencionados.

Em 2008 foi realizado por nosso grupo inquérito populacional na aldeia Imbaúba com o objetivo de estimar a prevalência da LTA. Na época, a população da aldeia era de 438 moradores e foram detectados 13 casos clínicos sendo estimada uma prevalência da infecção de 8,6% (IC 95% = 4,9- 13,9). Esta alta prevalência demonstrou um quadro preocupante de transmissão ativa e levou a ampliação do estudo para os outros elos que compõem a cadeia epidemiológica da LTA. Em estudo que realizamos na mesma localidade observamos a presença de cães soros reativos e naturalmente infectados (RIFI e ELISA positivos e PCR positivos) por *Le. infantum*, além de cães que apresentaram infecção mista (*Le. infantum* e *Le. braziliensis*). Neste mesmo estudo, identificamos através de técnicas moleculares diferentes hospedeiros sinantrópicos e silvestres naturalmente infectados por *Leishmania* (Quaresma *et al.*, 2011).

As leishmanioses têm sua epidemiologia condicionada aos seus vetores, os flebotomíneos; a seu agente etiológico, *Leishmania* spp. e aos reservatórios silvestres e sinantrópicos, os mamíferos. E apesar da existência de estudos anteriores que abordaram aspectos epidemiológicos do agravo na área de estudo (Quaresma *et al.*, 2011), pouco se sabe sobre a fauna flebotomínica existente na

região. Em um estudo realizado em área próxima à Terra Indígena, Barata *et al.*, (2008) relataram a presença de *Nyssomyia intermedia*. Esta espécie é comprovadamente vetora de LTA em diversas regiões brasileiras, incluindo Minas Gerais e, segundo o próprio autor sua presença pode sugerir participação na transmissão da LT nos municípios limítrofes à região estudada.

A identificação das espécies vetoras de *Leishmania* que circulam entre os diferentes hospedeiros, e humanos e a identificação da fonte alimentar das espécies de flebotomíneos são de extrema importância para medidas de controle adequadas na Terra Indígena Xakriabá, fazendo-se necessário um estudo que aborde todos os aspectos citados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os aspectos entomológicos relacionados à epidemiologia das leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Identificar as espécies de flebotomíneos presentes na aldeia Imbaúbas localizada na Terra Indígena Xakriabá;
- 2- Correlacionar aspectos ecológicos e climáticos com os achados entomológicos na área de estudos;
- 3- Analisar descritivamente a distribuição das principais espécies de flebotomíneos de acordo com os diferentes ecótopos;
- 4- Detectar o DNA e identificar a espécie de *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos capturadas nos diferentes ecótopos;
- 5- Correlacionar os achados entomológicos com dados de ocorrência da doença humana e de reservatórios naturalmente infectados na área de estudos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

A reserva indígena Xakriabá, demarcada pela FUNAI em 1979, está localizada no município de São João das Missões (latitude -14.885133 e longitude -44.077379), na região norte do estado de Minas Gerais (Figura 1). Situado na zona do alto médio São Francisco, micro região do Vale do Peruaçu, limita-se com os municípios de Miravânia, Manga e Itacarambi. A região é banhada pelo rio Itacarambi e está sujeita a um clima tropical úmido de savanas com inverno seco, em transição para um clima quente e seco, com chuvas de verão. A região constitui uma zona de transição entre o cerrado (vegetação típica do planalto central brasileiro) e a caatinga (vegetação típica do semi-árido nordestino), contendo espécies nativas dos dois biomas. (IBGE, 2006; Quaresma *et al.*, 2011).

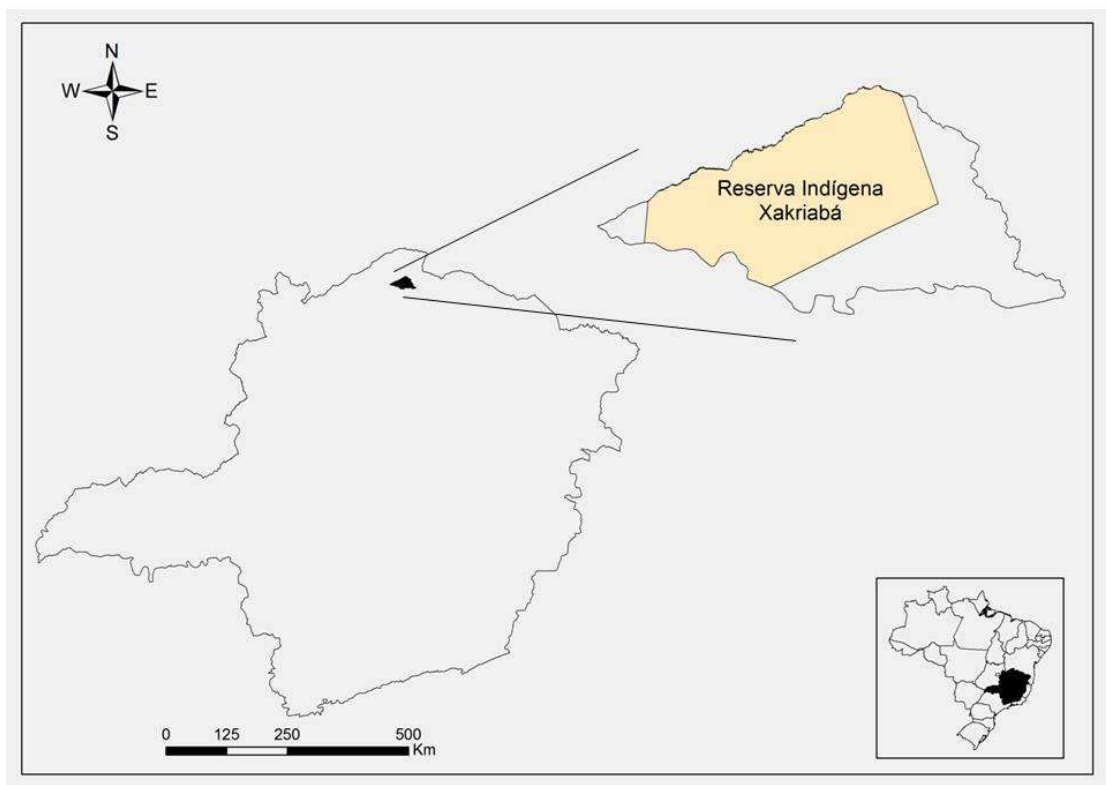


Figura 1: Localização do município de São João das Missões, onde está situada a Terra Indígena Xakriabá.

Os primeiros habitantes do município de São João das Missões foram os índios Xakriabá, em seguida vieram imigrantes da Bahia e de outras regiões de Minas Gerais. Atualmente, o município possui uma população de 11.715 habitantes, classificada como predominantemente rural (79.58%) e distribuída em uma área de 678 Km². A Terra Xakriabá que ocupa uma área de 530,74Km², correspondente a 78,29% da superfície total do município, é constituída por 20 aldeias formando 5 pólos base com população total estimada de 8.380 habitantes (IBGE, 2010, FUNASA, 2010). O presente trabalho concentrou-se apenas no pólo-base Brejo Mata Fome, onde está localizada a aldeia Imbaúbas (Figura 2). Esta aldeia foi selecionada considerando os resultados obtidos com o estudo da infecção humana e pesquisa de reservatórios silvestres, sinantrópicos e domésticos realizados anteriormente (Freire, 2011; Quaresma *et al.*, 2011).

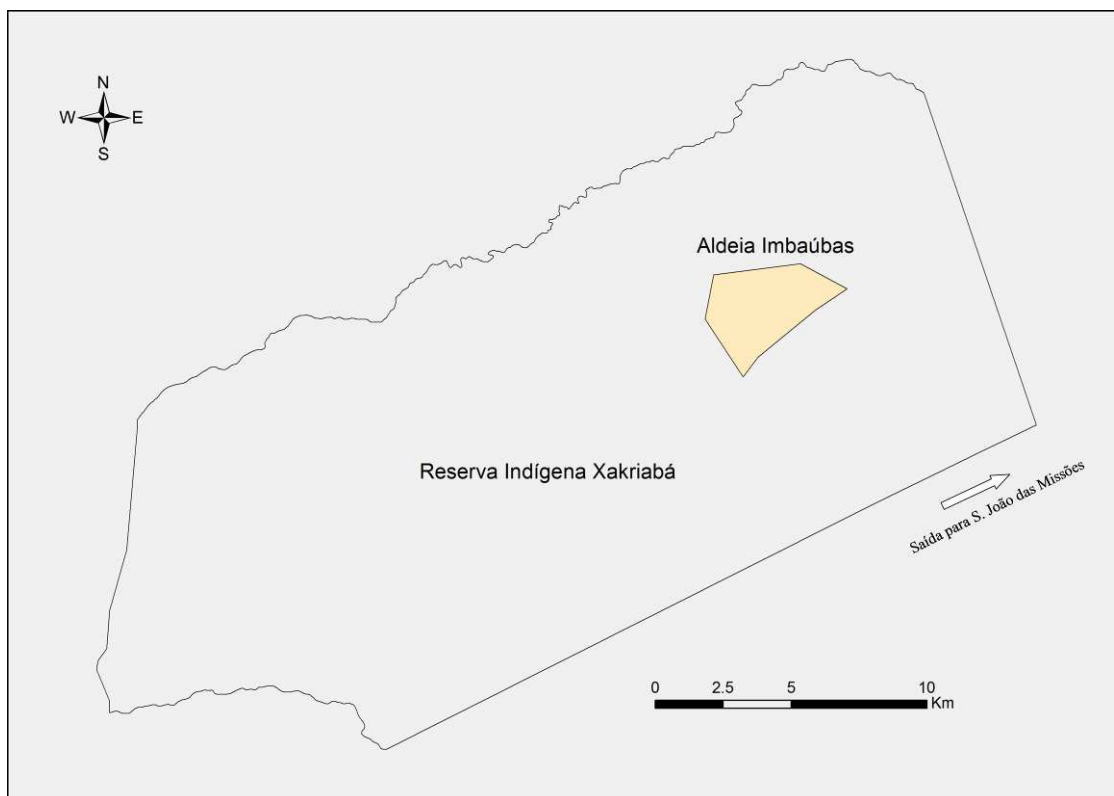


Figura 2: Delimitação da aldeia Imbaúbas, local de estudos na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.

4.2 Delineamento do estudo

4.2.1 Capturas no peridomicílio

As coletas sistematizadas de flebotomíneos na aldeia Imbaúbas foram realizadas durante o período de julho de 2008 a julho de 2009, com capturas bimensais no peridomicílio de casas selecionadas aleatoriamente através de sorteio. Foram utilizadas armadilhas luminosas automáticas, modelo HP (Pugedo *et al.* 2005), cuja luz artificial é mantida como isca para os flebotomíneos. Quatro pilhas grandes (1,5 volts cada) são utilizadas como fonte de energia tanto para a luz quanto para o motor (1,5 volts), que mantém um fluxo de ar direcionado para uma gaiola de filó onde os insetos ficam acondicionados.

As armadilhas foram expostas no peridomicílio de vinte casas, totalizando quarenta armadilhas com exposição de três noites consecutivas, das 18:00 às 6:00 horas, totalizando 36 horas de esforço amostral por armadilha por campanha (Figuras 3 e 4). Os flebotomíneos capturados no primeiro dia de coleta foram destinados apenas ao estudo da fauna flebotomínica e o restante destinado tanto para o estudo de fauna quanto para o estudo de infecção natural.

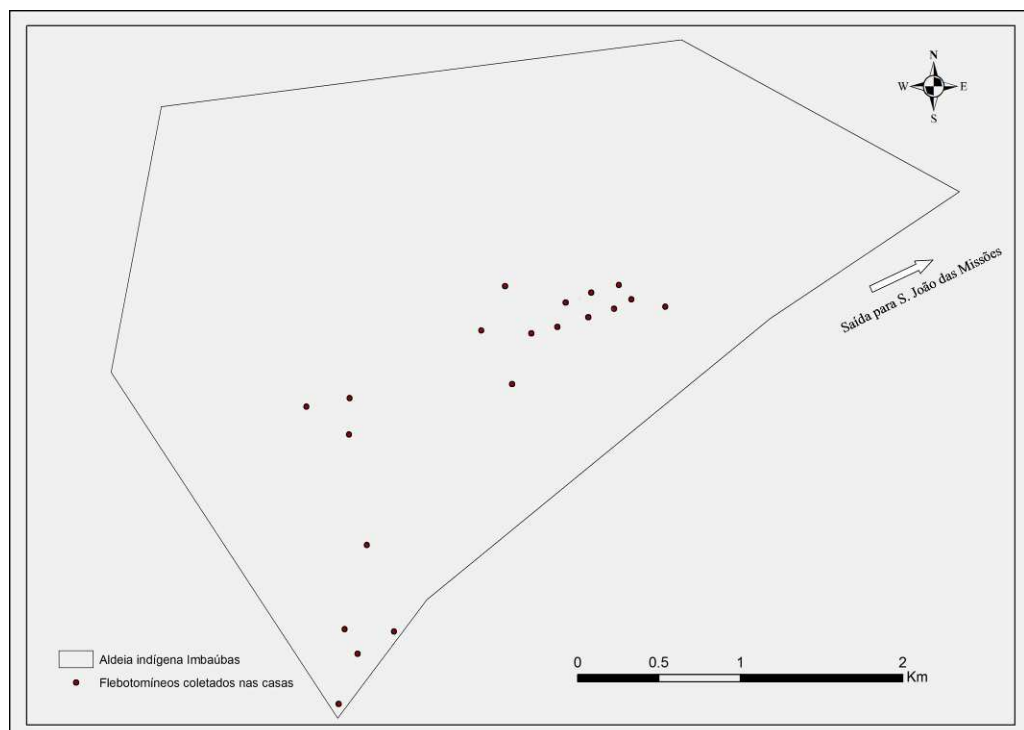


Figura 3: Mapa representativo das casas localizadas na aldeia Imbaúbas selecionadas para o estudo de flebotomíneos na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.

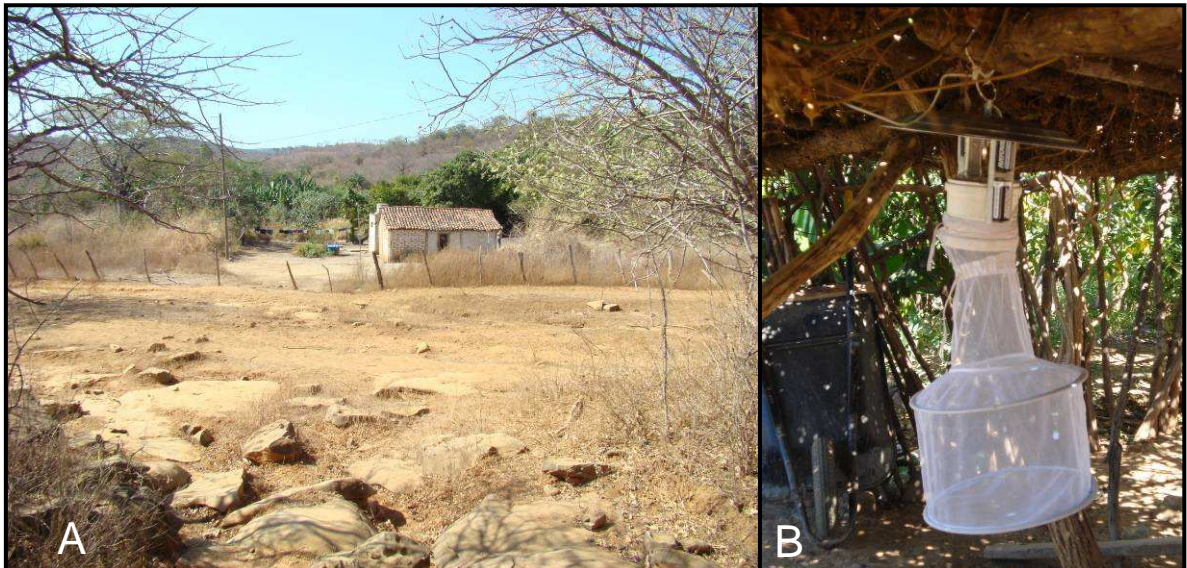


Figura 4: Aspecto do peridomicílio de uma das casas na aldeia Imbaúbas, Terra indígena Xakriabá. B - Armadilha luminosa tipo HP exposta no peridomicílio de uma das casas.

4.2.2 Capturas nas trilhas

Em outubro de 2011 iniciaram-se coletas sistematizadas bimensais nas trilhas selecionadas durante o estudo dos reservatórios (Quaresma *et al.*, 2011) de forma a amostrar os diferentes ecótopos presentes na aldeia. As capturas foram realizadas até o mês de agosto do ano de 2012 totalizando seis coletas. Foram demarcadas quatro trilhas de 330 metros de comprimento cada, nas quais foram dispostas cinco armadilhas por trilha, espaçadas uniformemente (Figura 5), totalizando vinte armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo *et al.* 2005). A exposição das armadilhas foi de três dias completos, ou seja, 72 horas de esforço amostral por armadilha por campanha. Os flebotomíneos capturados nos três dias foram destinados tanto ao estudo de fauna, quanto aos estudos de infecção natural.

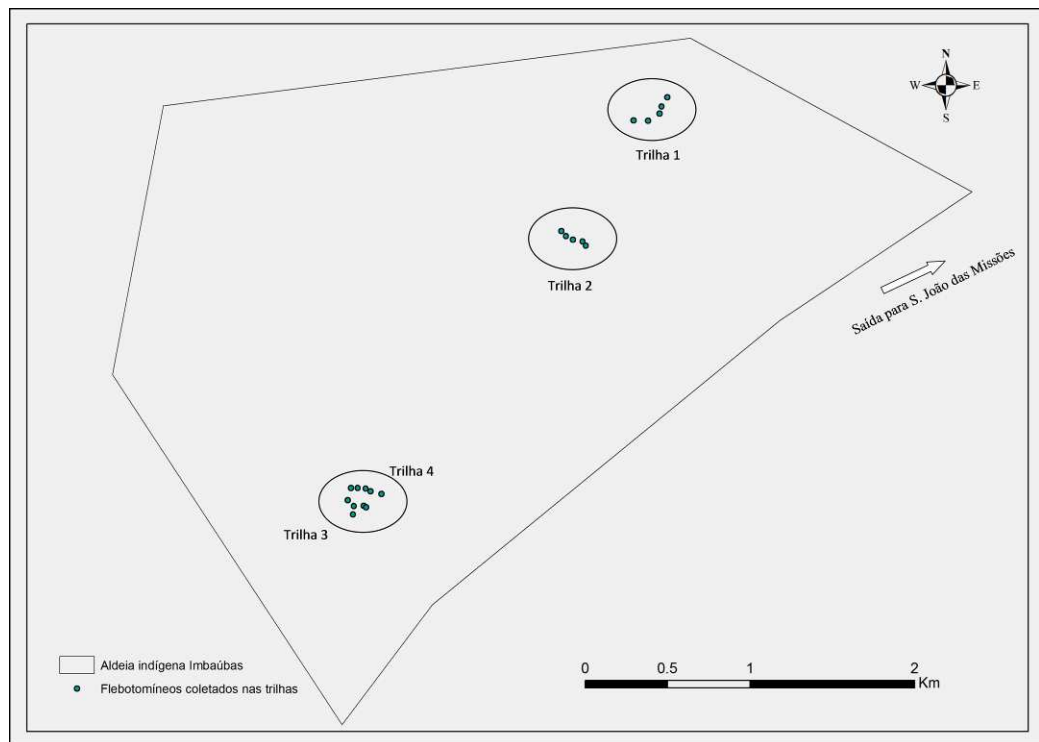


Figura 5: Esquema das trilhas localizadas na aldeia Imbaúbas para o estudo de flebotomíneos na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.

4.3 Caracterização das trilhas

As trilhas utilizadas neste estudo foram selecionadas para a investigação de reservatórios silvestres e sinantrópicos de *Leishmania* (Quaresma *et al.* 2011). Um total de quatro trilhas foram selecionadas e estas podem ser basicamente caracterizadas como áreas próximas as residências e são frequentemente utilizadas pela população para locomoção entre as casas das aldeias Imbaúbas.

A trilha denominada Número 1 (início: lat -14.834060/ long -44.213657 e término: lat- 14.835324/ long -44.215510) apresenta um ambiente de mata pouco antropizada, cujas características são de transição entre Floresta Estacional Decidual e cerrado (Figura 6).



Figura 6: Aspecto da trilha 1 para coleta de flebotomíneos. Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.

A trilha de número 2 (início: lat -14.842146/ long -44.218105 e término: lat -14.841352/ long -44.219442) também é caracterizada por um ambiente de mata semelhante a trilha 1, porém é uma região de maior altitude onde nota-se afloramento rochoso em alguns locais (Figura 7).



Figura 7: Aspecto da trilha 2 para coleta de flebotomíneos. Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.

As variações climáticas ao longo do ano são capazes de modificar bruscamente o solo e a vegetação nestas duas trilhas, podendo influenciar na captura de flebotomíneos (Figura 8).



Figura 8: Armadilha localizada na Trilha 1 para coleta de flebotomíneos em diferentes épocas do ano. A - estação chuvosa, mês de dezembro/2011; B - estação seca, mês de junho/2012.

A trilha de número 3 (início: lat -14.856787/ long -44.230832 término: -14.856392/ long -44.230107) está situada em um platô e pode ser caracterizada como área de afloramento rochoso, com crateras no solo propícias ao abrigo de flebotomíneos e roedores, além de pouca vegetação (Figura 9).

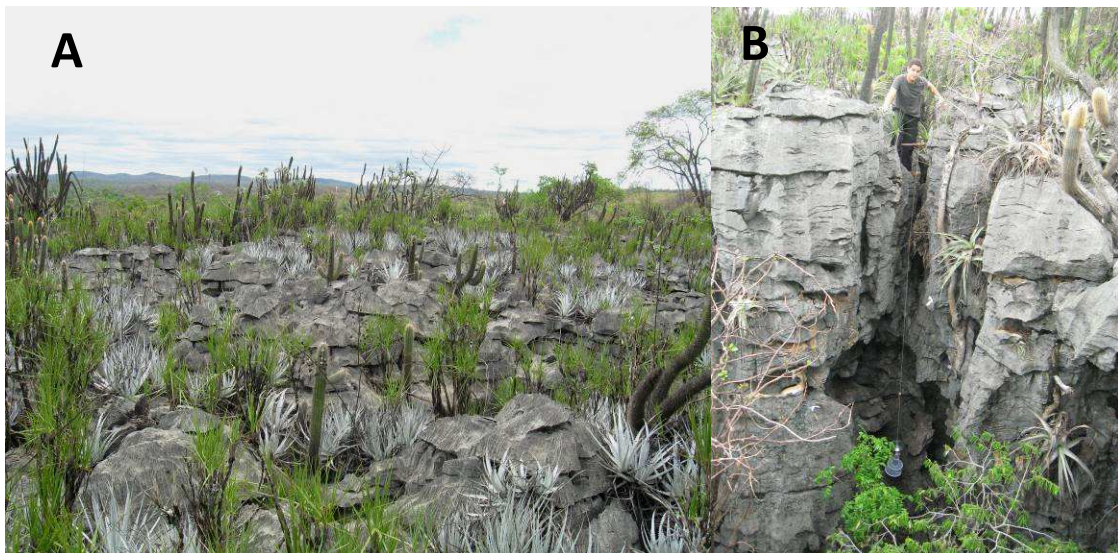


Figura 9: Aspecto da trilha 3 para coleta de flebotomíneos. A - vista panorâmica da área de coleta com afloramentos rochosos; B - local de coleta de flebotomíneos na trilha 3.

E por fim, a trilha de número 4 (início: lat -14.855338/ long -44.230934 término: lat -14.855672/ long -44.229270) está situada a margem do platô de crostão rochoso podendo portanto ser caracterizada como uma região de transição entre mata (semelhante a das trilhas 1 e 2) e afloramento rochoso com crateras (Figura 10).



Figura 10: Armadilha luminosa HP situada ao longo da trilha 4. Nota-se a área de transição entre mata e afloramento rochoso.

4.4 Processamento dos flebotomíneos coletados

A cada exposição, as armadilhas eram retiradas para realização da triagem e sexagem dos flebotomíneos que foram sacrificados em câmara de éter por dez minutos. Os machos foram retirados com auxílio de um estilete de madeira adaptado na ponta com agulha 0,45X13 26G descartável e estéril ou com pincel de plástico de cabo curto, em seguida acondicionados em criotubos contendo álcool 70° e mantidos em freezer a -20°C para posterior preparação, montagem e identificação.

As fêmeas foram acondicionadas em tubos de criopreservação contendo DMSO 6% (dimetilsulfóxido), que age como um crioprotetor evitando a morte celular durante o processo de congelamento, e mantidas em freezer a -20°C até o momento da dissecação, montagem e posterior realização da extração de DNA.

4.4.1 Preparação, Montagem e Identificação dos flebotomíneos

A preparação e montagem dos flebotomíneos foi realizada utilizando-se bálsamo do Canadá para os machos e líquido de Berlese para as fêmeas (Langeron 1949, modificada). A utilização do bálsamo para montagem dos machos se justifica pela durabilidade da preparação, enquanto o líquido de Berlese para fêmeas possibilita o exame das estruturas internas com maior nitidez, devido a sua menor refringência. Foi utilizada como caráter taxonômico na identificação específica das fêmeas, a visualização das espermatecas e do cibário, mantendo no momento da dissecação a parte ventral da cabeça voltada para cima.

A identificação específica dos flebotomíneos realizada com a observação por microscopia ótica de caracteres morfológicos internos e externos, seguindo as chaves e a classificação proposta por Galati (2003). A abreviação do nome das espécies neste estudo segue a proposta de Marcondes (2007).

4.5 Dados climáticos e geoespaciais

Os dados bioclimáticos de umidade relativa do ar, pluviosidade e temperatura média, referentes ao período de estudo, foram obtidos mensalmente junto ao

Instituto Nacional de Meteorologia – INMET. Os dados eram provenientes da Estação Meteorológica Automática de Mocaminho, localizada no Município de Itacarambi - Minas Gerais. (latitude -15.0861 e longitude -44.0161), com distância aproximada de 30 Km da Terra Indígena Xakriabá (INMET, 2012).

Para avaliar a influência das variáveis climáticas em relação ao número de flebotomíneos capturados foram utilizados os dados climatológicos do município e a densidade de flebotomíneos capturados durante o período de estudo.

Os dados geoespaciais foram obtidos através do navegador portátil GPS Garmin® eTrex Venture HC, transferidos para o software MapSource® Trip & Waypoint Manager. O método não paramétrico de estimativa de densidade de Kernel (Teekayuwat *et al.*, 2000) foi utilizado para identificar as áreas com maior número de espécimes de flebotomíneos infectados, para posterior análise conjunta com dados da infecção humana e de reservatórios obtidos em estudo realizado anteriormente na área (Quaresma *et al.* 2011). O programa ArcGIS 9.3 (ESRI, Redlands, California, USA) juntamente com a extensão de Análise Espacial foi empregado na produção dos mapas de densidade de infecção segundo estimador de Kernel.

4.6 Detecção da infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

4.6.1 Extração de DNA das fêmeas capturadas

As fêmeas que não apresentavam sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen foram identificadas através da montagem da cabeça em posição ventral e terminália (últimos três segmentos abdominais) em lâmina e lamínula com líquido de berlese e dispostas em "*pools*" contendo no máximo dez espécimes da mesma espécie, localidade e data de coleta para a realização da extração de DNA e posterior pesquisa de *Leishmania* spp.

A extração foi realizada utilizando Kit de Extração de tecido e células Genra Puregene® da QIAGEN seguindo o seguinte protocolo modificado por Quaresma *et al.*, (2011): as fêmeas de flebotomíneos foram maceradas em 100µL de solução de lise celular (para uma fêmea) ou 200 µL (para pool de até dez fêmeas) e à mistura

foi adicionado 1 µL de proteinase K (para uma fêmea) ou 1,5 µL (para pools). A solução foi homogeneizada por inversão do tubo e incubada a 55° C *overnight*. Após o período de incubação, foi adicionado 1µL de RNase (para uma fêmea) ou 1,5µL (para pools) à solução, que deverá ser homogeneizada por inversão e incubada a 37° C por trinta minutos. Posteriormente as amostras foram incubadas por três minutos no gelo e adicionados 100µL de solução de precipitação de proteínas. Os tubos foram vortexados por 20 segundos a alta velocidade seguido de centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm), e a fase aquosa transferida para um tubo novo. Adicionou-se 300µL de isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente, seguida de outra centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm). Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo secado invertido contra um papel absorvente. Adiciona-se etanol 70% ao tubo já seco e invertê-lo várias vezes seguido de outra centrifugação a 12000 x g (14000 rpm) por cinco minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo deve permanecer invertido contra um papel absorvente para secar até não sobrar nenhum resquício de álcool. Ao final, adicionou-se 25µL de solução de hidratação de DNA ou água DNase e RNase *free* (para uma fêmea) ou 40µL (para pool de dez fêmeas). As amostras foram incubadas a 65° por uma hora e posteriormente deixadas a temperatura ambiente *overnight*, sendo estocadas ao final à temperatura de -20°C.

Após a extração foi realizada a dosagem de moléculas de DNA em amostras sorteadas aleatoriamente, verificando a presença, concentração e qualidade do material extraído. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000. Conforme recomendações do fabricante o espectro de luz é ajustado para 260 e 280 nanômetros, faixa em que os ácidos nucléicos são detectados. A razão da absorbância de 260nm/280nm é utilizada para avaliar a pureza do material extraído, sendo considerado aceitável valores entre 1,4 de 1,8. Valores menores que a margem podem indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes provenientes do processo de extração.

4.6.2 *Nested* PCR dirigida ao gene SSUrRNA

A técnica de *Nested* PCR dirigida ao gene SSUrRNA amplifica um fragmento de uma região conservada entre todas espécies de *Leishmania* e portanto foi aplicada para determinar a infecção natural dos flebotomíneos coletados no

peridomicílio das casas situadas na aldeia Imbaúbas. A técnica é utilizada para detecção direta, sem a necessidade de isolamento do parasito, a partir de diferentes amostras biológicas (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002 e 2006). Tal metodologia, adaptada e modificada por Cruz *et al.* (2002) permite a amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, pela utilização dos iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, pela utilização dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'. A primeira reação foi preparada para um volume final de 50µL contendo 10µL de DNA da amostra testada, 5µL da solução tampão 10x -15mM MgCl₂, 1µL de dNTP mix a 10mM, 1µL de cada iniciador R1 e R2 a 15mM, 1,4µL de Tth DNA polimerase a 1U/µL (Biotools) e 30,6µL de H₂O destilada estéril. Em tubos contendo 1mL de H₂O foram diluídos 25µL de produto da primeira reação, para serem utilizados como "*template*" da segunda reação. Esta foi preparada para um volume final de 25µL contendo 10µL do produto amplificado diluído, 2,5µL da solução tampão 10x - 15mM de MgCl₂, 0,5µL de dNTP's a 10mM, 0,5µL do iniciador R3 a 15mM, 0,25µL do iniciador R4 a 15mM, 0,7µL de Tth DNA polimerase a 1U/µL (Biotools) e 10,55µL de H₂O destilada estéril. As amplificações foram processadas em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient utilizando os seguintes ciclos: 1ª reação - desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; 2ª reação: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos. A extensão final foi de 72°C por cinco minutos em ambas reações.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 nanogramas de DNA extraído de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), e como controle negativo foi utilizado água destilada estéril como "*template*".

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV) sendo

considerados positivas aquelas amostras que apresentaram banda de peso molecular correspondente ao esperado, 603pb e 353pb na primeira e segunda reações respectivamente, utilizando o peso molecular (PM) de 100pb.

4.6.3 PCR dirigida ao *Internal Transcribed Spacer I (ITS I)* do rDNA

Para determinar a taxa de infecção natural dos flebotomíneos coletados nas trilhas, as amostras de DNA extraídas dos “pools” foram analisadas através da técnica PCR dirigida ao ITS1 de *Leishmania* (El Tai *et al.*, 2000), que amplifica um fragmento de aproximadamente 300 a 350 pares de bases (Schonian *et al.*, 2003). Para a amplificação das amostras foi utilizado o par de iniciadores LITSR: 5´ CTGGATCATTTTCCGATG 3´ e L5.8S: 5´ TGATACCACTTATCGCACTT 3´.

A reação foi preparada para um volume final de 25µL contendo 5µL de DNA da amostra a ser testada, 2,5 µL da solução tampão 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP mix a 10mM, 1,25 µL de cada um dos iniciadores (LITSR e L5.8R) a 10µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase a 10U/ µL, 1,25 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 12,25 µL de H₂O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi a 72°C por dez minutos. Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 nanogramas de DNA extraído de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), e como controle negativo foi utilizado água destilada estéril como “template”. As amostras positivas foram submetidas a digestão pela enzima de restrição *HaeIII* conforme descrito por Schonian *et al.*, 2003.

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV), sendo consideradas positivas aquelas amostras que apresentaram banda de peso

molecular correspondente ao esperado, 300-350pb, utilizando o peso molecular (PM) de 100pb.

A PCR-RFLP realizada subsequente a PCR, torna possível distinguir as seguintes espécies: *Le. donovani*, *Le. infantum*, *Le. aethiopica*, *Le. tropica*, *Le. major*, *Le. mexicana*, *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis* e *Le. panamensis*. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de HaeIII (10U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima, 2,5 µL de H₂O destilada e 10,0µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas e os perfis de restrição analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência (indicadas no item anterior).

A reação de sequenciamento do fragmento de 300-350pb foi empregada para o esclarecimento de dúvidas na identificação pela PCR-RFLP (Schonian *et al.*, 2003).

4.6.4 Reação de Sequenciamento

Para a identificação da espécie de *Leishmania* foi realizada a reação de sequenciamento do produto amplificado da segunda reação da Nested PCR (fragmento esperado de 353 pb).

As amostras a serem sequenciadas foram preparadas da seguinte forma: os produtos de PCR obtidos a partir da amplificação com os iniciadores foram purificados com o kit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen) segundo instruções do fabricante. Em seguida foi preparada uma mistura contendo 1µL dos produtos purificados, 1µL de cada iniciador na concentração de 3,3 pmol, senso ou anti-senso, em tubos separados, 1µL de 5x Sequencing Buffer, 1µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing e água destilada em quantidade suficiente para 10 µL empregando o programa que alterna 35 ciclos de 95° C por 15 segundos e 65° C por 15 segundos. As sequências foram determinadas pelo seqüenciador automático de DNA ABI 3730xl DNA Analyzer e analisadas por meio dos softwares Finch TV (Geospiza, Inc.), Sequence Scanner v 1.0 (Applied Biosystems) e MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Por fim, o BLAST foi utilizado para o alinhamento das sequências obtidas com as sequências do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

4.7 Correlação dos dados entomológicos com dados epidemiológicos da área de estudos

O estimador não paramétrico de densidade de Kernel (Teekayuwat *et al.*, 2000) foi utilizado a fim de avaliar a presença de *hotspots* na área de estudos quando se utilizam em conjunto os dados entomológicos de infecção natural obtidos neste estudo e os dados referentes a infecção natural de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos e cães descritos por Quaresma *et al.* (2011). Além disso, utilizaram-se dados de infecção humana por LTA entre os indígenas referentes ao banco de dados do Grupo de Estudos em Leishmanioses, do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG (dados não publicados). Para tal, banco de dados foram produzidos no software Microsoft Excel 2003[®] e posteriormente foi realizada a interface dos dados com o programa ArcGIS 9.3 (ESRI, Redlands, California, USA) juntamente com a extensão de Análise Espacial.

4.8 Análise estatística

Os dados foram organizados em planilhas e as análises descritivas foram registradas no programa Microsoft Excel[®] (Office 2003).

As análises comparativas de riqueza e abundância de flebotomíneos coletados nas trilhas foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA). Como variáveis dependentes, foram utilizados os valores de riqueza e abundância. As estações do ano, áreas de coleta, sexo e meses do ano foram utilizados como variáveis categóricas.

Análises multivariadas também foram utilizadas para descobrir possíveis padrões de distribuição das espécies de flebotomíneos. Os métodos de ordenação permitem que muitas variáveis sejam reduzidas, geralmente, a dois conjuntos de coordenadas, embora essa simplificação possa resultar numa má interpretação dos dados. Entretanto, o método de ordenação mais comumente utilizado em ecologia é o da análise de correspondência (CA), uma vez que ela é indicada para a análise de tabelas de frequência. Os habitat e as espécies que eles contêm podem ser plotados no mesmo gráfico com base nas coordenadas que melhor representem as suas

relações. A análise de agrupamento foi feita com o uso do algoritmo UPGMA, que resulta na construção de um dendrograma que descreve os vários graus de similaridade entre as comunidades. Este algoritmo trabalha com médias aritméticas (não ponderadas) e produz menos distorções do que outros métodos. Para todas as análises estatísticas citadas acima, foi utilizado o software Statistica 10.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

Uma vez que a distribuição dos valores de riqueza e abundância de flebotomíneos referentes às coletas feitas nas casas não atendeu aos pré-requisitos de normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors test, $p < 0,05$), foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA por ranking e teste de medianas para verificar se existe variação significativa na riqueza e abundância dos insetos coletados nas residências. Como variáveis dependentes, foram utilizados os valores de riqueza e abundância. As estações do ano, os meses, as aldeias e o sexo do flebotomíneo foram definidos como as variáveis categóricas. O teste avalia a hipótese de que diferentes amostras foram tiradas de uma mesma distribuição ou de distribuições com a mesma mediana. A interpretação do teste é basicamente idêntica ao teste paramétrico ANOVA com um fator, exceto que ele é baseado em *rankings* e não em médias. O programa faz simultaneamente com o teste de Kruskal-Wallis, o teste de medianas. Este conta o número de casos em que cada amostra cai acima ou abaixo da mediana comum, e calcula o valor do qui-quadrado para uma tabela de contingência com 2 x n amostras. A hipótese nula é a de que se todas as amostras originaram-se de populações com medianas idênticas, espera-se que aproximadamente 50% de todos os casos em cada amostra fiquem acima (ou abaixo) da mediana comum. Estas análises também foram feitas por meio do software Statistica 10.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Coletas Sistematizadas de Flebotomíneos no Peridomicílio

Foram realizadas seis coletas de flebotomíneos no peridomicílio das casas localizadas na aldeia Imbaúbas da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, no período de julho de 2008 a julho de 2009.

O número de flebotomíneos capturados por espécie e sexo é apresentado na Tabela 1. De um total de 2126 espécimes de flebotomíneos, foram identificadas dezenove espécies pertencentes a nove gêneros: *Brumptomyia* França & Parrot, 1921, *Evandromyia* Mangabeira, 1941, *Lutzomyia* França, 1924, *Martinsmyia* Galati, 1995, *Micropygomyia* Barreto, 1962, *Migonemyia* Galati, 1995, *Nyssomyia* Barreto, 1962 e *Sciopemyia* Barreto, 1962. As espécies capturadas foram *Brumptomyia avellari* Costa Lima, 1932, *Evandromyia lenti* Mangabeira, 1938, *Ev. cortelezzii* Brethes, 1923, *Ev. sallesi* Galvão & Coutinho, 1939, *Ev. spelunca* Carvalho, Sanguinette, Brazil & Andrade Filho 2011, *Ev. termitophila* Martins, Falcão & Silva, 1964, *Lutzomyia ischnacantha* Martins, Souza & Falcão, 1962, *Lu. longipalpis* Lutz & Neiva, 1912, *Lu. renei* Martins, Falcão & Silva, 1957, *Martinsmyia minasensis* Mangabeira, 1942, *Mi. capixaba* Dias, Falcão, Silva & Martins, 1987, *Mi. goiana* Martins, Falcão & Silva, 1962, *Mi. peresi* Mangabeira, 1942, *Mi. quinquefer* Dyar, 1929, *Migonemyia migonei* França, 1920, *Nyssomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, *Ny. whitmani* Antunes & Coutinho, 1939, *Pintomyia serrana* Damasceno & Arouck, 1949 e *Sciopemyia sordellii* Shannon & Del Ponte, 1927. Em alguns exemplares não foi possível a identificação precisa ao nível de espécie pela perda de estruturas morfológicas fundamentais para identificação durante a captura e/ou preparo dos espécimes em lâminas microscópica, ficando, portanto, identificadas ao nível de gênero.

Tabela 1: Flebotomíneos capturados no peridomicílio das casas da aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, no período de julho 2008 a julho 2009.

Espécies	Nº de flebotomíneos capturados				Total (%)
	♀	%	♂	%	
<i>Brumptomyia avellari</i>	19	48.7	20	51.3	39 (1.9)
<i>Evandromyia lenti</i>	31	60.7	20	39.3	51 (2.3)
<i>Evandromyia cortelezii</i>	7	63.6	4	36.4	11 (0.5)
<i>Evandromyia complexo cortelezii</i>	22	100	0	0	22 (1.2)
<i>Evandromyia sallesi</i>	2	50	2	50	4 (0.2)
<i>Evandromyia spelunca</i>	5	80	1	20	6 (0.3)
<i>Evandromyia termitophila</i>	3	50	3	50	6 (0.3)
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	18	72	7	28	25 (1.2)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	542	49.9	544	50.1	1086 (51)
<i>Lutzomyia sp.</i>	27	65.8	14	34.2	41 (1.9)
<i>Lutzomyia renei</i>	33	97	1	3	34 (1.7)
<i>Martinsmyia minasensis</i>	1	100	0	0	1 (0.04)
<i>Micropygomyia capixaba</i>	3	50	3	50	6 (0.3)
<i>Micropygomyia goiana</i>	39	60.9	25	39.1	64 (3.0)
<i>Micropygomyia peresi</i>	12	85.7	2	14.3	14 (0.6)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	2	100	0	0	2 (0.09)
<i>Migonemyia migonei</i>	8	29.6	19	70.4	27 (1.2)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	605	89.4	71	10.6	676 (31.7)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	3	60	2	40	5 (0.2)
<i>Pintomyia serrana</i>	3	75	1	25	4 (0.2)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	2	100	2 (0.09)
Total	1385	65.1	741	34.9	2126 (100)

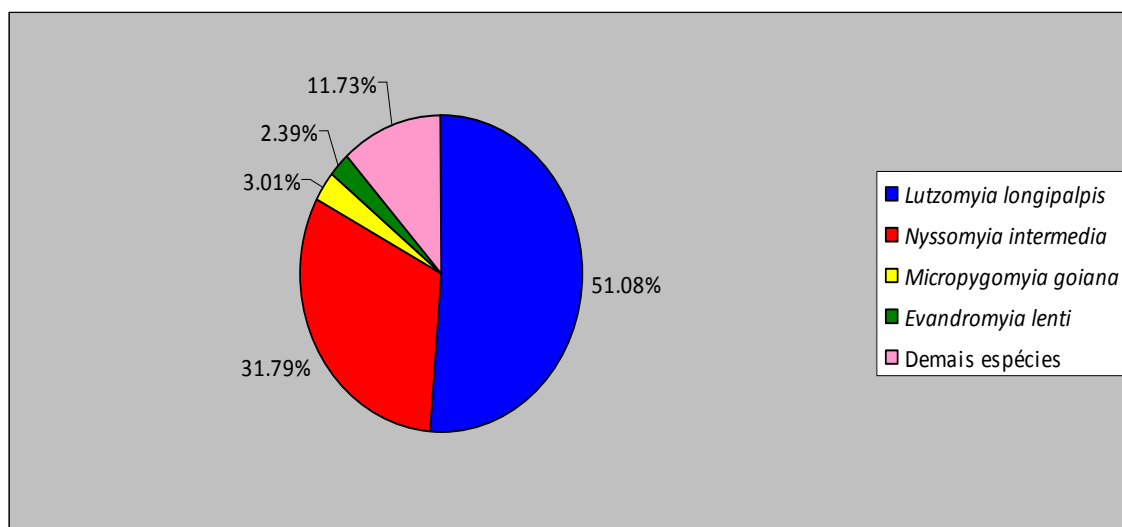


Figura 11: Porcentagem de flebotomíneos por espécie coletados no peridomicílio das casas situadas na aldeia Imbaúbas, localizada na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, no período de Julho de 2008 a Julho de 2009.

Conforme apresentado na figura anterior (Figura 11), a espécie *Lu. longipalpis* correspondeu a 51,08% do total de espécimes coletados na área de estudo, seguida por *Ny. intermedia* com 31,79% e *Mi. goiana* com 3,01%. O número de fêmeas (1385) foi maior que o número de machos (741) sendo a razão fêmea/macho igual a 1,86. Ao realizar o teste de Kruskal-Wallis foi possível constatar uma diferença significativa (Figura 12) entre a abundância de machos e fêmeas coletados ($H_{1,198} = 26,62$; $p=0,000$). É importante ressaltar que a razão macho:fêmea de *Lu. longipalpis* durante o período de estudo foi de 1,0:1,0 enquanto *Ny. intermedia* apresentou razão entre os sexos igual a 1,0:8,5 com predominância de indivíduos fêmeas.

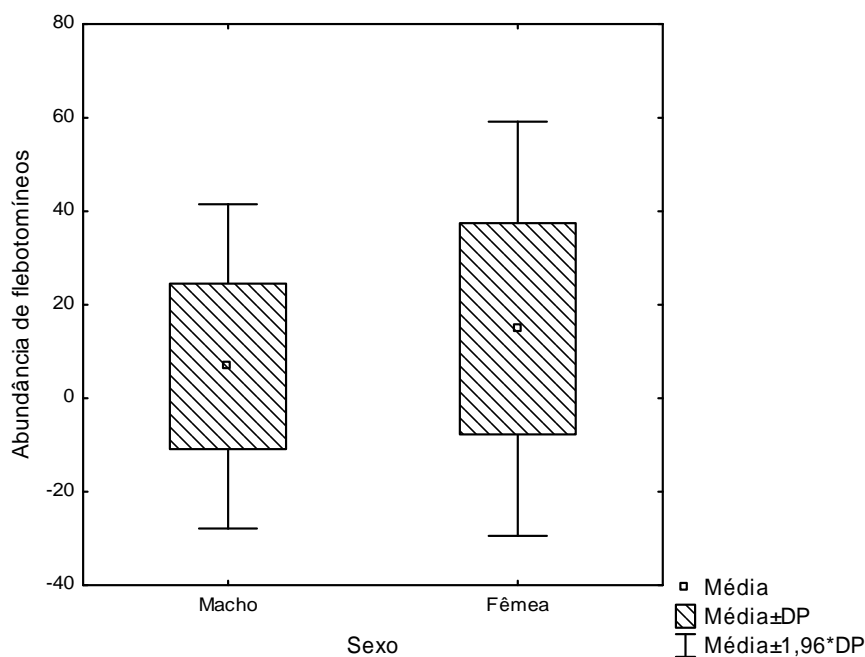


Figura 12: Relação entre abundância e sexo de flebotomíneos capturados no peridomicílio das casas situadas na Aldeia Imbaúbas, durante o período entre Julho/08 a Julho/09 ($H_{1,198} = 26,62$; $p=0,000$).

A Tabela 2 destaca a distribuição das espécies capturadas de acordo com os meses de coleta. Os dados correspondem ao somatório de todas as armadilhas dispostas no peridomicílio das casas localizadas na aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, MG. Foi possível constatar através do teste Kruskal-Wallis que a maioria das espécies foram representadas por indivíduos fêmeas (Figura 13 - $H_{1,198}=34,80$; $p=0,000$).

Tabela 2: Flebotomíneos coletados, por sexo e por mês de captura no peridomicílio das casas localizadas na aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, MG, no período de julho de 2008 a julho de 2009.

Espécies	Campanhas de coleta												Total		
	Julho/08		Setembro/08		Novembro/08		Janeiro/09		Abril/09		Julho/09		♀ (%)	♂ (%)	Total (%)
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂			
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	1	2	3	15	14	0	0	1	0	1	2	19 (48.7)	20 (51.3)	39 (1.8)
<i>Evandromyia lenti</i>	3	4	10	7	13	6	0	0	4	2	1	1	31 (60.7)	20 (39.3)	51 (2.3)
<i>Evandromyia cortellezii</i>	0	0	6	0	0	3	0	0	1	1	0	0	7 (63.6)	4 (36.4)	11 (0.5)
<i>Evandromyia complexo cortellezi</i>	0	0	0	0	20	0	2	0	0	0	0	0	22 (100)	0 (0)	22 (1.0)
<i>Evandromyia sallesi</i>	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2 (50)	2 (50)	4 (0.1)
<i>Evandromyia spelunca</i>	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	1	0	5 (80)	1 (20)	6 (0.2)
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	3	3 (50)	3 (50)	6 (0.2)
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	0	0	6	2	10	2	0	0	2	3	0	0	18 (72)	7 (28)	25 (1.1)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	6	39	176	60	260	295	40	54	27	54	33	42	542 (49.9)	544 (50.1)	1086 (51)
<i>Lutzomyia sp.</i>	1	0	0	6	15	5	0	1	11	2	0	0	27 (65.8)	14 (34.2)	41 (1.9)
<i>Lutzomyia renei</i>	0	1	14	0	16	0	1	0	2	0	0	0	33 (97)	1 (3)	34 (1.6)
<i>Martinsomyia minasensis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0 (0)	1 (0.04)
<i>Micropygomyia capixaba</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	3	3 (50)	3 (50)	6 (0.2)
<i>Micropygomyia goiana</i>	0	2	10	2	24	19	2	0	2	1	1	1	39 (60.9)	25 (39.1)	64 (3)
<i>Micropygomyia peresi</i>	1	0	0	0	6	1	2	0	2	0	1	1	12 (85.7)	2 (14.3)	14 (0.6)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2 (100)	0 (0)	2 (0.09)
<i>Migonemyia migonei</i>	1	5	1	7	3	5	1	1	0	0	2	1	8 (29.6)	19 (70.4)	27 (1.2)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	179	15	209	20	40	4	8	3	82	11	87	18	605 (89.4)	71 (10.6)	676 (32.78)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3 (60)	2 (40)	5 (0.2)
<i>Pintomyia serrana</i>	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	3 (75)	1 (25)	4 (0.1)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0 (0)	2 (100)	2 (0.09)
Total (%)	192 (74.1)	67 (25.9)	439 (80.1)	109 (19.9)	429 (54.6)	356 (45.4)	59 (48.7)	62 (51.3)	138 (64.7)	75 (35.3)	128 (64)	72 (36)	1385 (65.1)	741 (34.9)	2126 (100)
	259 (12.18)		548 (25.77)		785 (36.92)		121 (5.69)		213 (10.01)		200 (9.43)			2126	

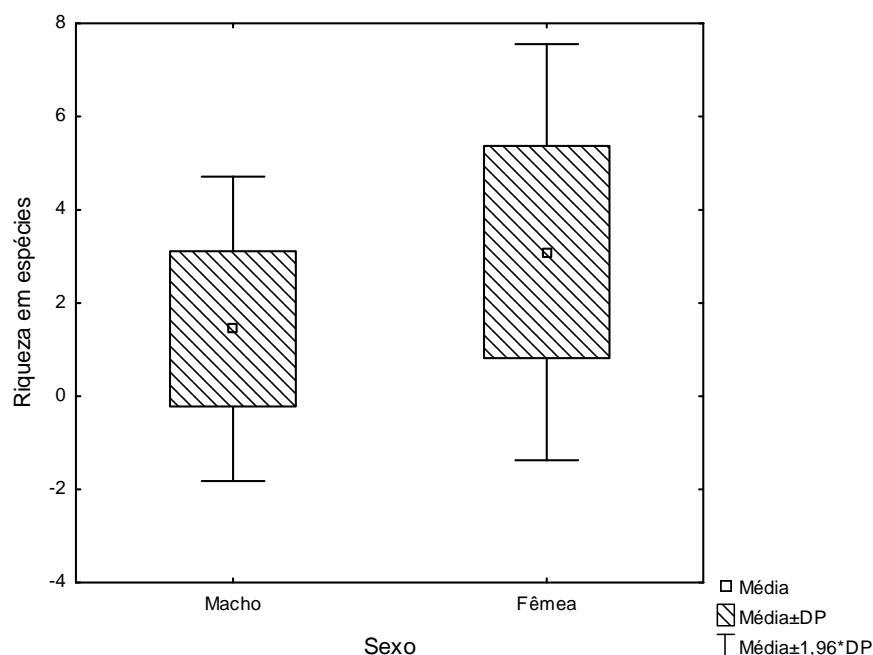


Figura 13: Relação entre riqueza de espécies e sexo dos flebotomíneos coletados no peridomicílio das casas durante o período entre Julho/08 a Julho/09.

A coleta referente ao mês de novembro de 2008 representou 36,92% do total geral de flebotomíneos capturados seguida pelo mês de setembro de 2008 com 25,77% e os demais meses de coleta foram responsáveis por 37,31% do número de flebotomíneos capturados. Em todos os meses, *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* foram as espécies mais prevalentes. Estas espécies, juntamente com *Mi. goiana* foram as únicas capturadas em todos os meses de coleta (Tabela 2). As espécies *Br. avellari*, *Ev. lenti*, *Lu. renei*, *Mi. peresi* e *Mg. migonei* foram coletadas em cinco meses do total de seis, e as demais espécies foram coletadas em quatro ou menos meses. O Teste Kruskal-Wallis permitiu verificar uma diferença significativa (Figura 14) na abundância de flebotomíneos entre os meses coletados ($H_{5,99} = 18,44$; $p=0,002$).

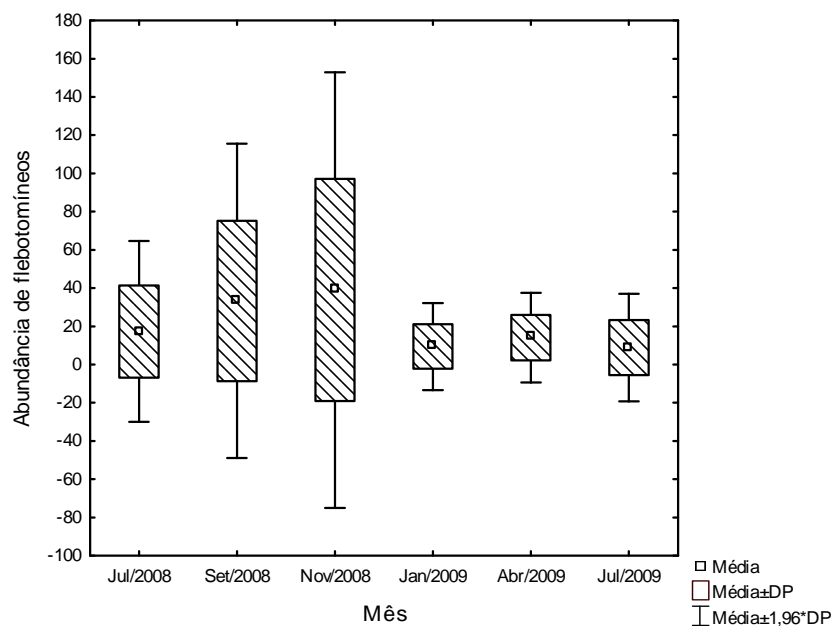


Figura 14: Relação entre abundância de flebotomíneos e os meses de coleta ($H_{5,99} = 18,44$; $p=0,002$) durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Os meses de setembro/2008 e novembro/2008 apresentaram a maior riqueza de espécies coletadas. Nestes meses, foram capturadas quatorze das dezenove espécies relatadas no período de estudos. O mês de abril/2009 apresentou treze espécies capturadas, seguido por janeiro/2009 com onze espécies capturadas, julho/2009 com dez e julho/2008 com nove espécies. Ao realizar o teste Kruskal-Wallis foi possível observar uma diferença significativa ($H_{5,99} = 29,58$; $p=0,000$) na riqueza de espécies de flebotomíneos coletados entre os meses (Figura.15).

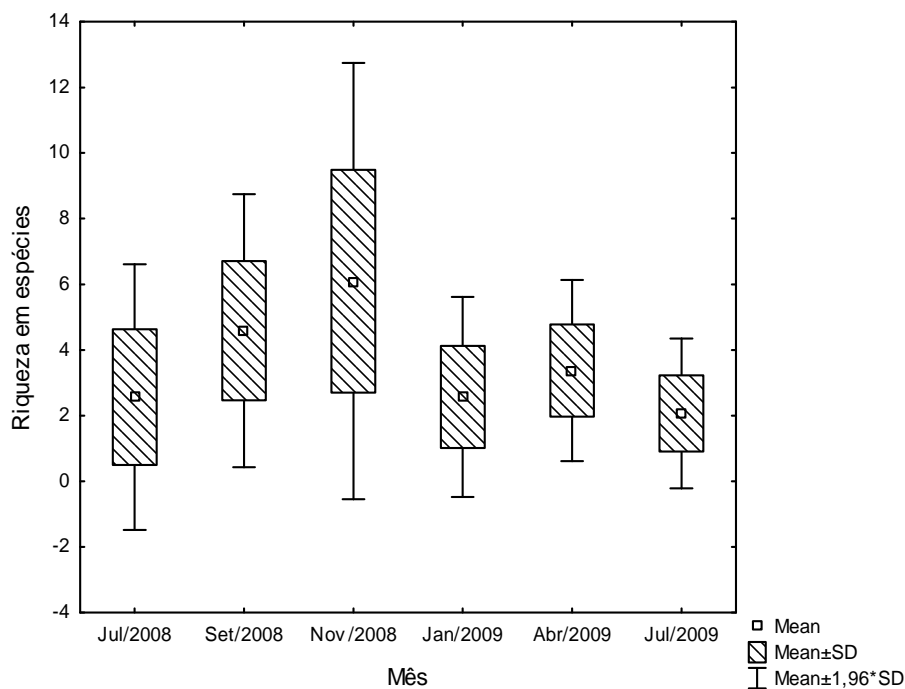


Figura 15: Relação entre riqueza de espécies de flebotomíneos e os meses de coleta ($H_{5,99} = 29,58$; $p=0,000$) durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

A Figura 16 destaca as porcentagens das duas espécies mais frequentes, *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, segundo o período de coleta. *Lutzomyia longipalpis* foi mais abundante durante três meses de coleta: setembro/2008, novembro/2008 e janeiro/2009, enquanto *Ny. intermedia* foi mais abundante em outros três meses: julho/2008, abril/2009 e julho/2009. Mesmo que em pequenas porcentagens podemos notar a presença de *Mg. migonei* e *Ny. whitmani* nos meses de estudo, estas espécies se juntam a *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, como espécies coletadas na área que já foram incriminadas vetor das leishmanioses no Brasil.

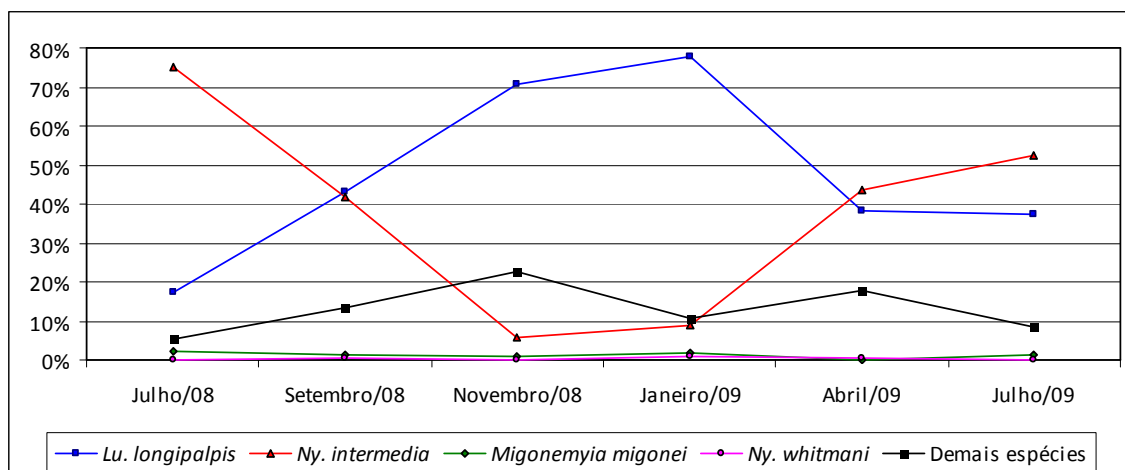


Figura 16: Percentagem das espécies vetoras de *Leishmania* coletadas no período de julho de 2008 a julho de 2009, no peridomicílio das casas na aldeia Imbaúbas, localizada na Terra Indígena Xakriabá, MG.

As temperaturas médias durante o período de estudos variaram entre 21,3°C e 26,3°C. A umidade relativa do ar variou entre 53% e 66,5% enquanto os valores totais de precipitação pluviométrica mensal variaram entre 0,0 mm³ e 244,2 mm³ ao mês. Apesar disso, durante o período de estudos não foi possível constatar correlações significativas entre as variáveis climáticas e a abundância e riqueza de espécies de flebotomíneos entre os meses de coleta. Porém ao caracterizar como *estação seca* as coletas referentes aos meses de julho/2008, setembro/2008 e julho/2009 cuja precipitação pluviométrica mensal foi de 0 mm³, 12,6 mm³ e 0 mm³ respectivamente e como *estação chuvosa* as coletas referentes aos meses de novembro/2008, janeiro/2009 e abril/2009, nos quais a precipitação pluviométrica mensal foi de 189,4 mm³, 239,6 mm³ e 244,2 mm³, respectivamente, foi possível verificar uma diferença significativa na riqueza de espécies entre as estações (Figura 17), de modo que na estação chuvosa foram capturadas mais espécies de flebotomíneos ($H_{1,99} = 4,57$; $p=0,0325$). Com relação a abundância, não foi possível verificar uma diferença significativa entre as estações seca e chuvosa ($H_{1,99} = 1,721$; $p=0,1895$).

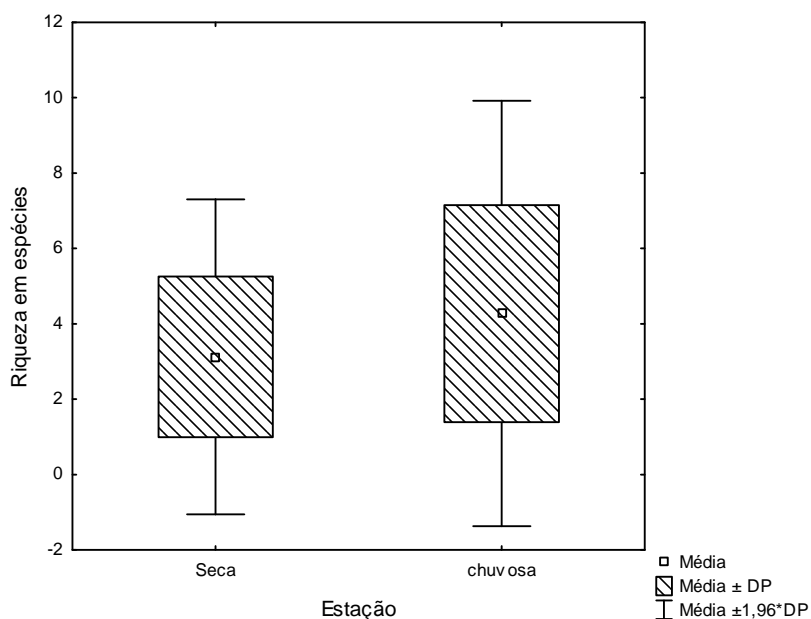


Figura 17: Relação entre a média do número de espécies capturadas e as estações climáticas ($H_{1,99} = 4,57$; $p=0,0325$) durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Durante o período de estudos foi possível constatar que não houve diferença significativa tanto para a abundância de flebotomíneos ($H_{1,99} = 0,1468$; $p=0,70$) quanto para a riqueza de espécies ($H_{1,99} = 0,367$; $p=0,544$) nas casas selecionadas situadas na Aldeia Imbaúbas. O cálculo foi realizado a partir do número total de machos e fêmeas por espécie capturados mensalmente com as armadilhas luminosas automáticas HP.

5.2 Coletas Sistematizadas de Flebotomíneos nas Trilhas

Foram realizadas seis coletas de flebotomíneos em trilhas previamente demarcadas para o estudo de hospedeiros silvestre e sinantrópicos de *Leishmania* spp. (Quaresma *et al.* 2011) na aldeia Imbaúbas da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, no período de outubro de 2011 a agosto de 2012.

O número de flebotomíneos capturados por espécie e sexo é apresentado na Tabela 3. De um total de 5.920 espécimes de flebotomíneos, foram identificadas

vinte e sete espécies pertencentes a onze gêneros: *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Martinsmyia*, *Micropygomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psathyromyia*, *Psychodopygus* e *Sciopemyia*. As espécies capturadas foram *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia brumpti* Larrousse, 1920, *Evandromyia cortelezii*, *Evandromyia evandroi* Costa Lima & Antunes, 1936, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia sallesi*, *Evandromyia spelunca*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia cavernicola* Costa Lima, 1932, *Lutzomyia ischnacantha*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia renei*, *Martinsmyia minasensis*, *Micropygomyia capixaba*, *Micropygomyia goiana*, *Micropygomyia longipennis* Barreto, 1946, *Micropygomyia peresi*, *Micropygomyia quinquefer*, *Micropygomyia schreiberi* Martins, Falcão & Silva, 1975, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neivai* Pinto, 1926, *Pintomyia misionensis* Castro, 1960, *Pi. serrana*, *Psychodopygus ayrozai* Barreto & Coutinho, 1940, *Sciopemyia sordellii* além de um exemplar do gênero *Psathyromyia*.

Em alguns exemplares não foi possível a identificação ao nível de espécie pela perda de estruturas morfológicas durante a captura e/ou preparo dos espécimes em lâmina microscópica, ficando portanto identificadas ao nível de gênero.

Tabela 3: Flebotomíneos capturados nas trilhas de coleta localizadas na aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, no período de julho 2008 a julho 2009.

Espécies	Nº de flebotomíneos capturados				Total (%)
	♂	%	♀	%	
<i>Brumptomyia avellari</i>	5	0.26	2	0.04	7 (0.11)
<i>Brumptomyia brumpti</i>	2	0.1	0	0	2 (0.03)
<i>Evandromyia cortelezii</i>	7	0.37	0	0	7 (0.11)
<i>Evandromyia evandroi</i>	7	0.37	0	0	7 (0.11)
<i>Evandromyia lenti</i>	86	4.55	68	2	154 (2.3)
<i>Evandromyia sallesi</i>	4	0.2	0	0	4 (0.06)
<i>Evandromyia sp.</i>	0	0	4	0.09	4 (0.06)
<i>Evandromyia spelunca</i>	79	4.18	322	8	401 (6.8)
<i>Evandromyia termitophila</i>	7	0.37	29	0.7	36 (0.6)
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	12	0.63	1026	25.5	1038 (17.24)
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	163	8.62	220	0.05	383 (6.7)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	41	2.2	41	1.01	82 (1.4)
<i>Lutzomyia renei</i>	665	35.2	167	4.15	832 (14)
<i>Lutzomyia sp.</i>	0	0	39	1.5	39 (0.7)
<i>Martinsmyia minasensis</i>	332	17.5	1235	34.2	1567 (26.7)
<i>Micropygomyia capixaba</i>	14	0.8	207	5.5	221 (3.8)
<i>Micropygomyia goiana</i>	66	3.5	269	6.85	335 (5.7)
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	0	22	0.55	22 (0.4)
<i>Micropygomyia peresi</i>	314	16.6	171	4.25	485 (8.2)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	2	0.1	0	0	2 (0.03)
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	34	1.8	47	1.33	81 (1.4)
<i>Micropygomyia sp.</i>	0	0	13	0.32	13 (0.25)
<i>Migonemyia migonei</i>	1	0.05	3	0.07	4 (0.06)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	46	2.5	139	3.45	185 (3.12)
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	0	2	0.04	2 (0.03)
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	0	1	0.02	1 (0.01)
<i>Pintomyia serrana</i>	0	0	1	0.02	1 (0.01)
<i>Psathyromyia (Foratiniella) sp.</i>	0	0	1	0.02	1 (0.01)
<i>Psychodogypus ayrozai</i>	1	0.05	0	0	1 (0.01)
<i>Scyopemyia sordellii</i>	1	0.05	2	0.04	3 (0.05)
Total	1889	31.9	4031	68.1	5920 (100)

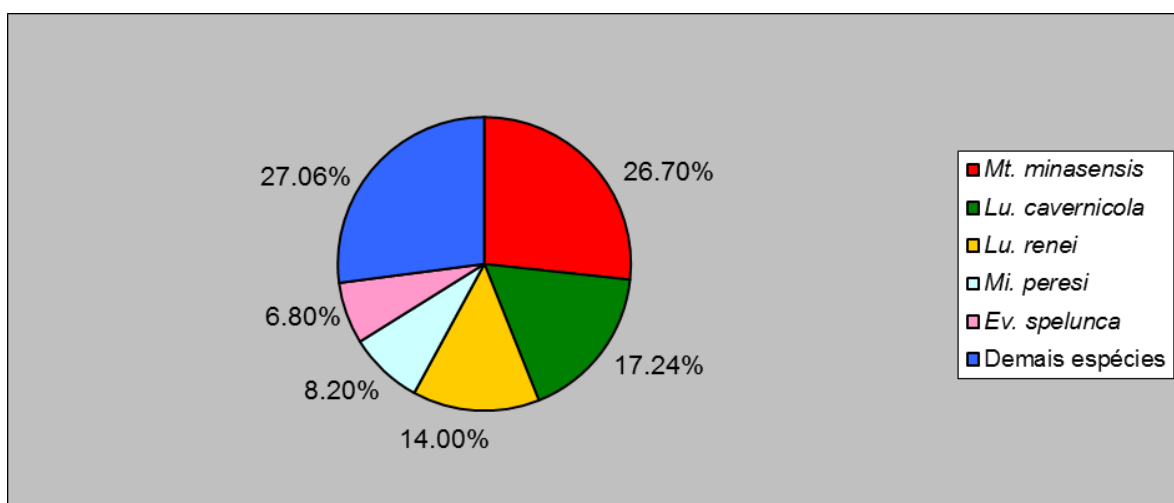


Figura 18: Porcentagem de flebotomíneos por espécie coletados nas trilhas selecionadas para o estudo de reservatórios silvestres e sinantrópicos de *Leishmania*, situadas na aldeia Imbaúbas da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, no período de Outubro de 2011 a Agosto de 2012.

Conforme apresentado na Figura 18, a espécie *Mt. minasensis* correspondeu a 26,7% do total de espécimes coletados na área de estudo, seguida por *Lu. cavernicola* com 17,24% e *Lu. renei* com 14,0%.

O número total de fêmeas coletadas (4031) foi superior ao número total de machos (1889) sendo a razão fêmea/macho igual a 2,13. Ao realizar o teste ANOVA foi possível constatar uma diferença significativa entre o número de machos e fêmeas coletados (Figura 19). Com relação à riqueza de flebotomíneos (Figura 20), pode-se perceber que a maioria das espécies foram representadas por indivíduos fêmeas ($F_{1,36}=5,9671$; $p=0,01961$).

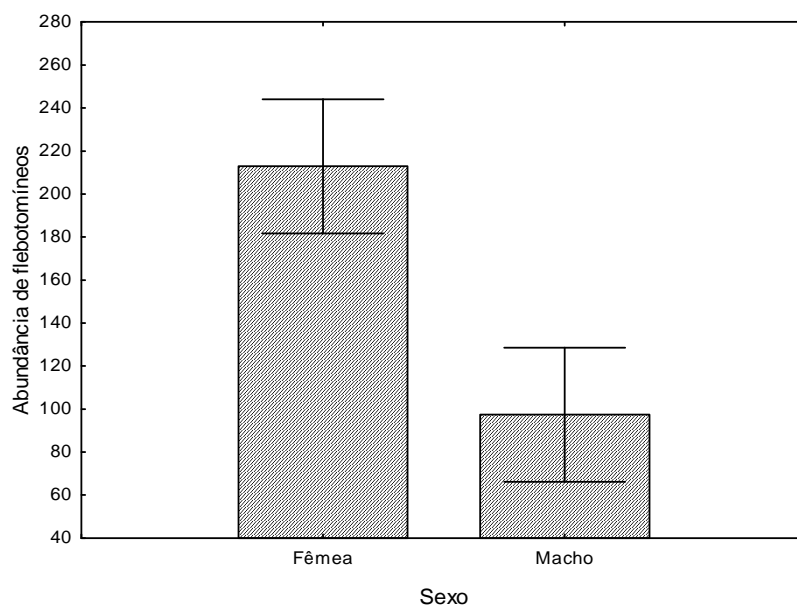


Figura 19: Relação entre abundância e sexo de flebotomíneos capturados na aldeia Imbaúba da Terra Indígena Xakriabá no período de outubro de 2011 a agosto de 2012 ($F_{1,36}=28,239$; $p=0,000$).

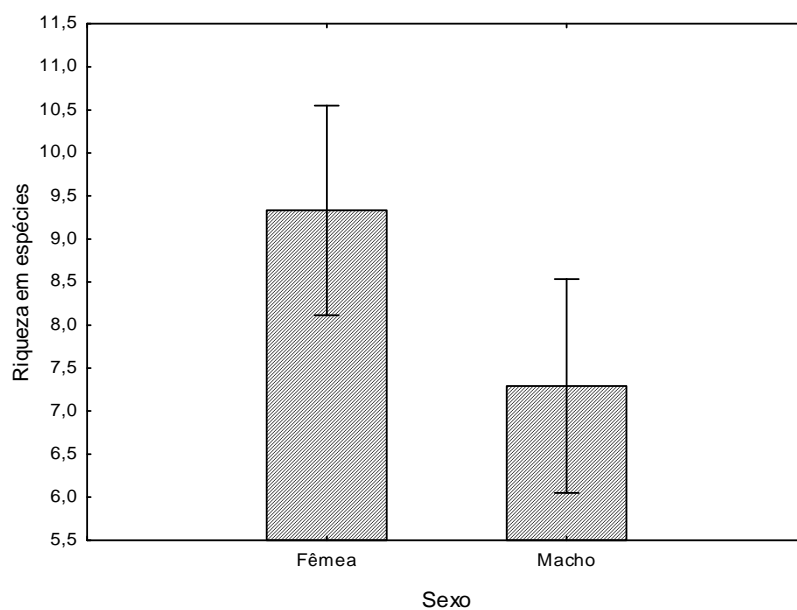


Figura 20: Relação entre riqueza de espécies e sexo de flebotomíneos capturados na aldeia Imbaúba da Terra Indígena Xakriabá no período de outubro de 2011 a agosto de 2012 ($F_{1,36}=5,9671$; $p=0,01961$).

A Tabela 4 e a Figura 21 mostram a distribuição das espécies capturadas de acordo com os meses de coleta. Os dados correspondem ao somatório das armadilhas dispostas nas trilhas de coleta localizadas na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Tabela 4: Distribuição dos flebotomíneos coletados nas trilhas de acordo com o sexo e os meses de coleta na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Espécies	Meses de Coleta												Total (%)	
	Outubro/11		Dezembro/11		Fevereiro/12		Abril/12		Junho/12		Agosto/12			
	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)
<i>Brumptomyia avellari</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0	5	2
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0
<i>Evandromyia cortelezii</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	7	0
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	7	0
<i>Evandromyia lenti</i>	6	10	0	7	6	5	4	18	66	25	4	3	86	68
<i>Evandromyia sallesi</i>	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0
<i>Evandromyia sp.</i>	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Evandromyia spelunca</i>	0	50	28	43	8	84	16	63	16	51	11	31	79	322
<i>Evandromyia termitophila</i>	4	10	0	1	0	0	1	2	0	13	2	3	7	29
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	0	0	2	263	5	49	2	118	2	416	1	180	12	1026
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	0	6	28	64	11	40	25	41	58	59	41	10	163	220
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	7	4	0	1	0	2	3	5	29	28	2	1	41	41
<i>Lutzomyia renei</i>	13	5	107	28	59	0	85	134	270	0	131	0	665	167
<i>Lutzomyia sp.</i>	0	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39
<i>Martinsomyia minasensis</i>	58	559	150	234	98	341	18	64	6	37	2	0	332	1235
<i>Micropygomyia capixaba</i>	0	0	12	114	0	45	0	48	0	0	2	0	14	207
<i>Micropygomyia goiana</i>	1	96	5	29	8	9	22	74	26	45	4	16	66	269
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	8	0	12	0	0	0	0	0	2	0	0	0	22
<i>Micropygomyia peresi</i>	27	37	152	34	7	33	84	57	32	10	12	0	314	171
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	0	0	21	0	3	0	2	2	4	10	4	35	34	47
<i>Micropygomyia sp.</i>	0	12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	13
<i>Migonemyia migonei</i>	0	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	3
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1	9	5	6	9	42	14	42	17	39	0	1	46	139
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Pintomyia serrana</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia (Foratiniella) sp.</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Psychodopygys ayrozai</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Scyopemyia sordellii</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	2
Total (%)	119 (12.3)	852 (87.7)	516 (38.1)	836 (61.9)	217 (24.9)	652 (75.1)	279 (29.3)	671 (70.7)	539 (42.1)	740 (57.9)	219 (43.8)	280 (56.2)	1889 (31.9)	4031 (68.1)
	971 (16.4)		1352 (22.9)		869 (14.7)		950 (16.0)		1279 (21.6)		499 (8.4)		5920 (100)	

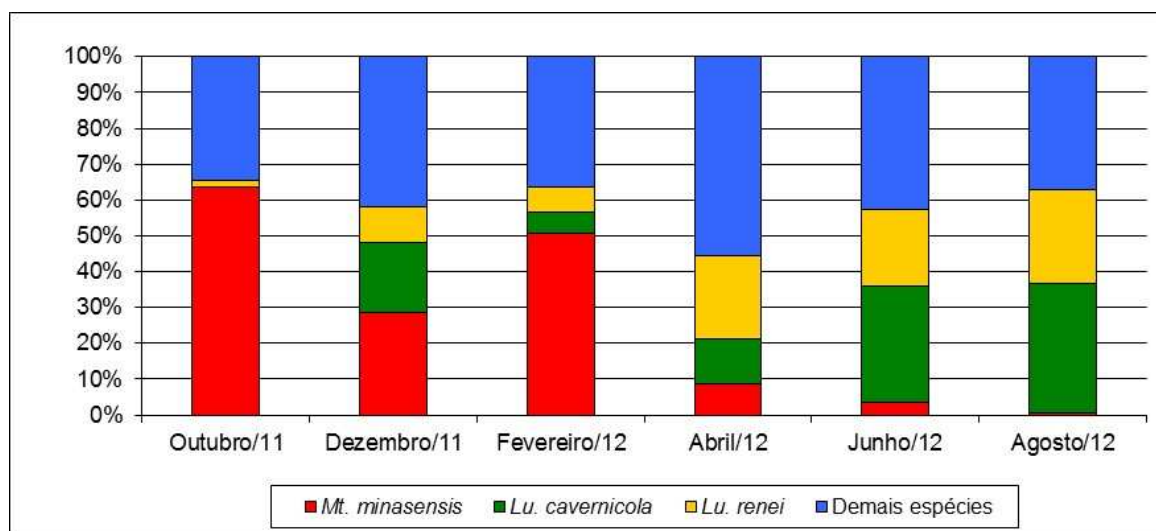


Figura 21: Distribuição das principais espécies de flebotomíneos coletadas nas trilhas demarcadas, durante o período de Outubro de 2011 a Agosto de 2012.

A coleta referente ao mês de dezembro/2011 representou 22,9% do total geral de flebotomíneos capturados seguida pelo mês de junho/2012 com 21,6% e os demais meses de coleta foram responsáveis por 55,5% do número de flebotomíneos capturados. Ao realizar o teste ANOVA (Figura 22) foi observada diferença significativa na abundância de indivíduos entre os meses amostrados ($F_{5,12}=48,257$; $P=0,000$). Foram coletados mais flebotomíneos nos meses de dezembro e junho. Entretanto, a diferença entre esses dois meses não foi significativa. Além disso, de acordo com o mesmo teste (Figura 23), não houve diferença significativa na riqueza em espécies entre os meses amostrados ($F_{5,12}=1,5990$; $p=0,23381$).

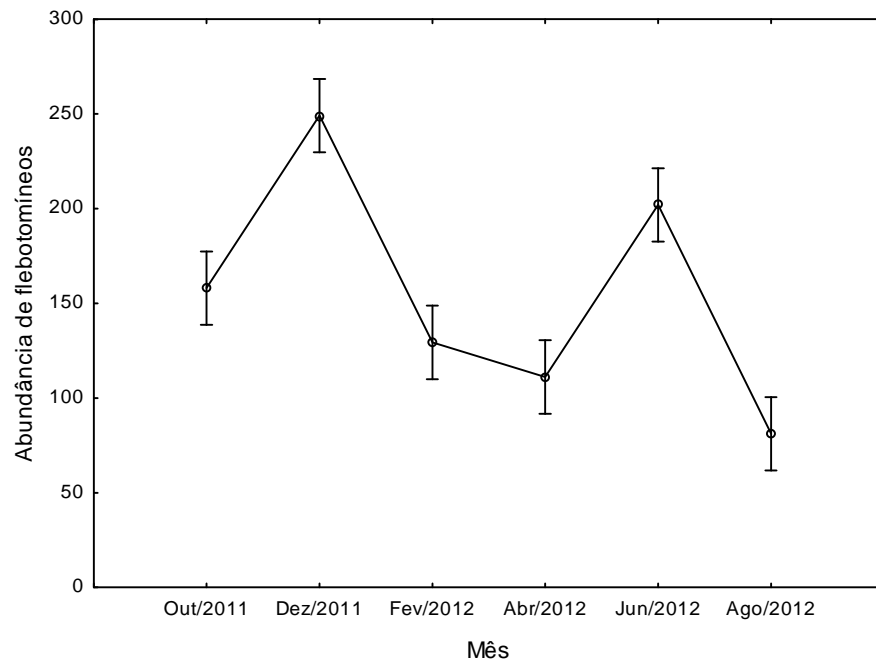


Figura 22: Relação entre abundância de flebotomíneos e meses de coleta nas trilhas situadas na Aldeia Imbaúbas. ($F_{5,12}=48,257$; $P=0,000$).

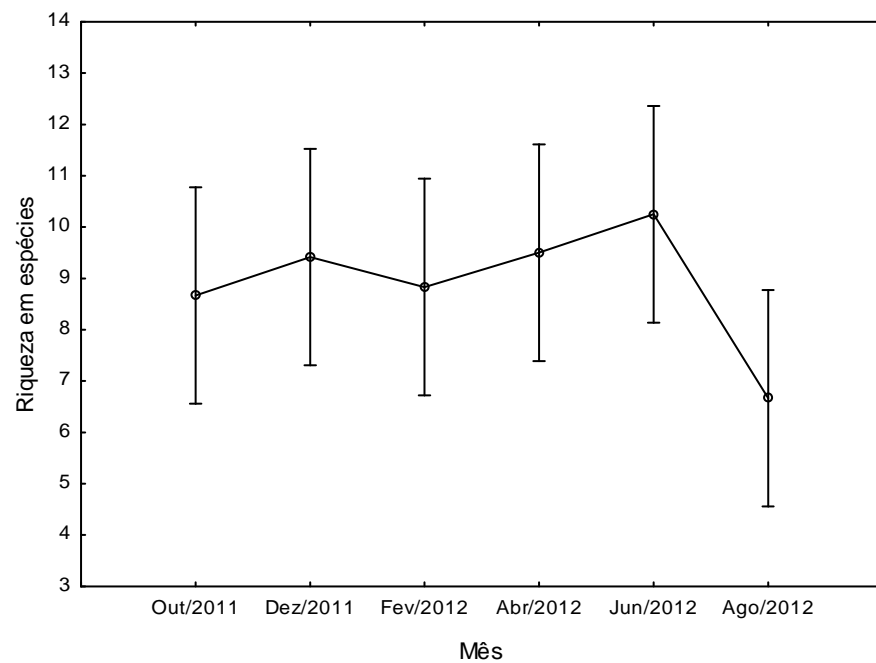


Figura 23: Relação entre riqueza de espécies de flebotomíneos e meses de coleta nas trilhas situadas na Aldeia Imbaúbas ($F_{5,12}=1,5990$; $p=0,23381$).

A Tabela 5 e a Figura 24 mostram a distribuição das principais espécies de flebotomíneos coletadas em cada uma das quatro trilhas durante o período de estudos. Na trilha 3 foram capturados 52,58% dos flebotomíneos, enquanto que na trilha 4 foram capturados 34,71% e nas demais 12,71%. O teste Tukey verificou que as trilhas 1 e 2 apresentaram menor abundância de espécimes quando comparadas com as trilhas 3 e 4 ($p < 0,05$) e que não houve diferença significativa para esta variável entre as trilhas: 1x2 e 3x4.

Tabela 5: Total de flebotomíneos por sexo coletados nas trilhas demarcadas para o estudo, na aldeia Imbaúbas localizada na Terra Indígena Xakriabá, MG, durante o período entre outubro de 2011 a Agosto de 2012.

Espécies	Locais de coleta								Total		Total
	Trilha 1		Trilha 2		Trilha 3		Trilha 4		♂	♀	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀			
<i>Brumptomyia avellari</i>	2	0	0	0	2	2	1	0	5	2	7
<i>Brumptomyia brumpti</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>Evandromyia cortelezii</i>	0	0	0	0	7	0	0	0	7	0	7
<i>Evandromyia evandroi</i>	3	0	0	0	3	0	1	0	7	0	7
<i>Evandromyia lenti</i>	19	12	8	9	18	12	41	35	86	68	154
<i>Evandromyia sallesi</i>	1	0	1	0	2	0	0	0	4	0	4
<i>Evandromyia</i> sp.	0	1	0	0	0	2	0	1	0	4	4
<i>Evandromyia spelunca</i>	5	18	1	8	38	160	35	136	79	322	401
<i>Evandromyia termitophila</i>	4	19	1	5	1	3	1	2	7	29	36
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	0	10	0	11	11	720	1	285	12	1026	1038
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	5	3	2	2	102	121	54	94	163	220	383
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	26	19	5	7	1	3	9	12	41	41	82
<i>Lutzomyia renei</i>	3	0	9	1	383	100	270	66	665	167	832
<i>Lutzomyia</i> sp.	0	1	0	0	0	38	0	0	0	39	39
<i>Martinsmyia minasensis</i>	3	4	5	17	206	774	118	440	332	1235	1567
<i>Micropygomyia capixaba</i>	1	27	0	35	6	48	7	97	14	207	221
<i>Micropygomyia goiana</i>	20	26	4	45	14	104	28	94	66	269	335
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	0	0	0	0	10	0	12	0	22	22
<i>Micropygomyia peresi</i>	35	26	63	32	79	71	137	42	314	171	485
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	2
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	0	0	1	1	18	39	15	7	34	47	81
<i>Micropygomyia</i> sp.	0	1	0	0	0	9	0	3	0	13	13
<i>Migonemyia migonei</i>	0	0	0	1	1	0	0	2	1	3	4
<i>Nyssomyia intermedia</i>	35	119	7	14	2	2	2	4	46	139	185
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Pintomyia serrana</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>Psathyromyia (Foratiniella) sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Psychodogypus ayrozai</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
<i>Scyopemyia sordellii</i>	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2	3
Total (%)	165 (36.1)	292 (63.9)	107 (36.2)	188 (63.8)	895 (28.7)	2218 (71.3)	722 (35.1)	1333 (64.9)	1889 (31.9)	4031 (68.1)	5920 (100)
	457 (7.73%)		295 (4.98)		3113 (52,58%)		2055 (34,71%)				

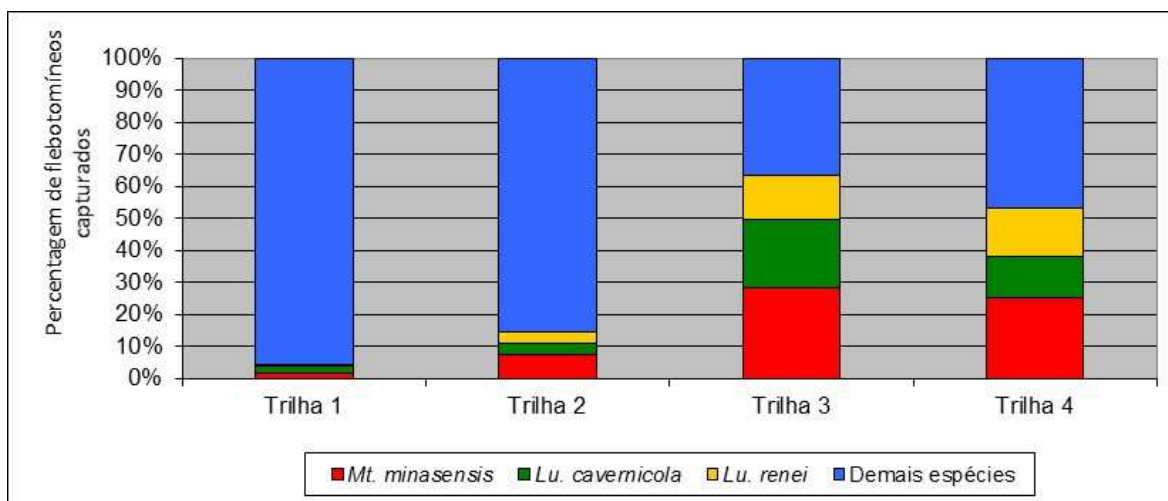


Figura 24: Distribuição dos flebotomíneos capturados em cada trilha de coleta localizada na aldeia Imbaúbas, situada na Terra Indígena Xakriabá, MG, durante o período entre outubro de 2011 a agosto de 2012.

A análise da riqueza de espécies nas trilhas indicou diferença significativa entre elas ($F_{3;20} = 7,1566$; $p < 0,05$). A trilha 2 apresentou menor riqueza específica, com 15 espécies de flebotomíneos, enquanto nas trilhas 3 e 4 foram coletadas 20 espécies e a trilha 1, um total de 21 espécies (Tukey – $p < 0,05$). Não houve diferença para esta variável entre as trilhas: 1x3, 1x4 e 3x4.

Ao comparar os ambientes amostrados que caracterizavam cada trilha: Trilha 1 e 2 - áreas de mata; Trilha 3 - afloramento rochoso e Trilha 4 - área de transição (mata/afloramento rochoso) foi possível verificar uma diferença significativa na riqueza entre estes ambientes ($F_{2;36} = 11,882$; $p = 0,00011$). As trilhas localizadas em áreas de mata foram as que apresentaram menor riqueza média (com 9,5 espécies). Entretanto, não houve diferença nessa variável entre os ambientes de maior riqueza: rochoso e o de transição (Figura 25).

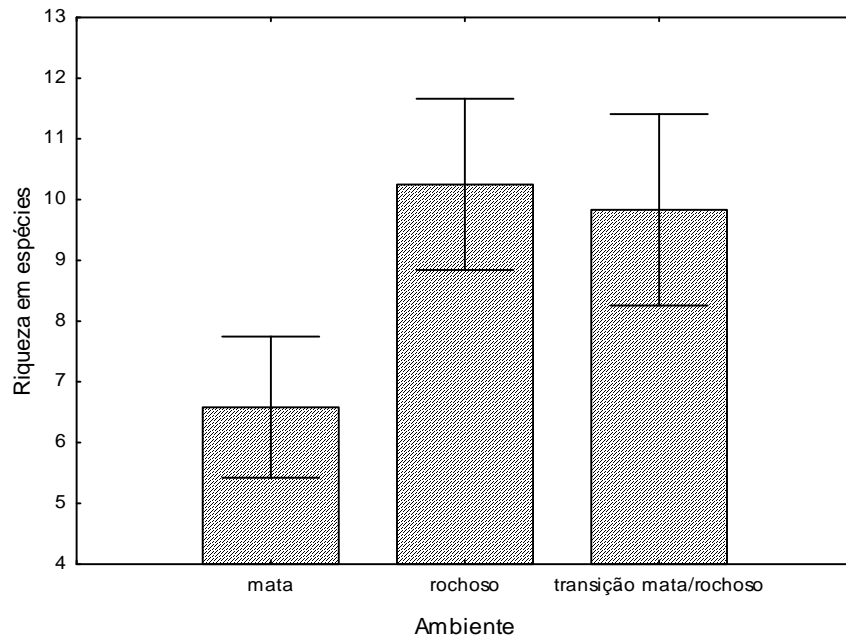


Figura 25: Relação entre riqueza de espécies e ambientes de coleta de flebotomíneos na Aldeia Imbaúbas durante o período de estudos ($F_{2,36} = 11,882$; $p=0,00011$).

Ainda com relação aos diferentes ambientes, quando comparada a abundância de flebotomíneos, foi possível constatar uma diferença significativa de indivíduos entre os ambientes amostrados (Figura 26). Foram encontrados mais insetos no ambiente rochoso, seguido pelo ambiente de transição e mata ($F_{2,36}=44,385$; $p=0,000$).

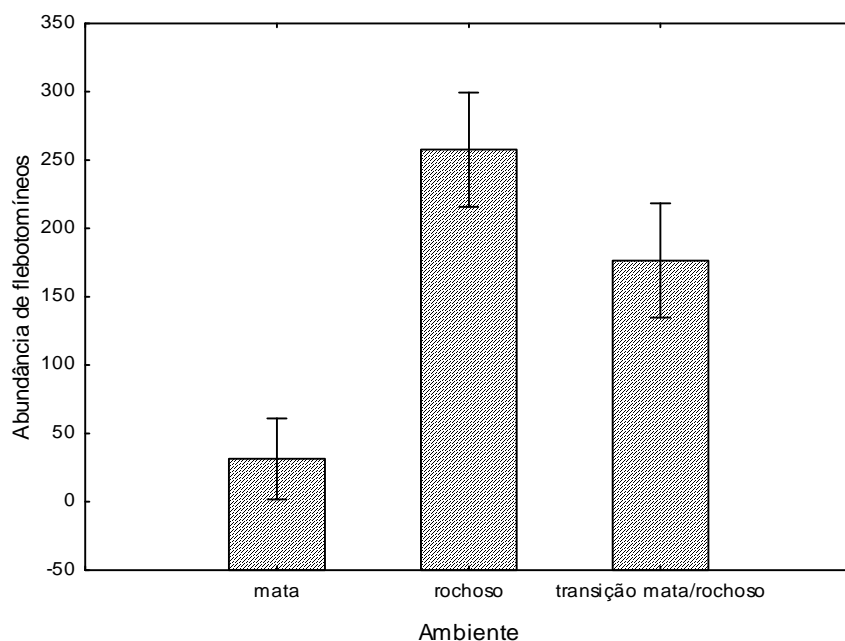


Figura 26: Relação entre abundância de flebotomíneos e ambientes de coleta na Aldeia Imbaúbas, durante o período de estudos ($F_{2,21} = 7,0678$; $p < 0,05$).

As temperaturas médias durante o período de estudos variaram entre 24,2°C e 25,9°C. A umidade relativa do ar variou entre 50,7% e 79,3% enquanto os valores totais de precipitação pluviométrica mensal variaram entre 0,0 mm³ e 147,8 mm³ ao mês. Apesar disso, durante o período de estudos não foi possível constatar correlações entre as variáveis climáticas e a abundância e riqueza de espécies de flebotomíneos entre os meses de coleta.

Considerou-se como *estação seca* as coletas referentes aos meses de abril/2012, junho/2012 e agosto/2012 cuja precipitação pluviométrica mensal foi de 6,4 mm³, 4 mm³ e 0 mm³ respectivamente e como *estação chuvosa* as coletas referentes aos meses de outubro/2011, dezembro/2011 e fevereiro/2012, nos quais a precipitação pluviométrica mensal foi de 89,5 mm³, 147,8 mm³ e 20,2 mm³ respectivamente. As análises mostraram que não houve diferença significativa no número de espécies entre as estações, como mostrado na Figura 27 ($F_{1,36} = 0,04932$; $p = 0,82551$). Apesar disso, foi possível notar uma diferença significativa na abundância de flebotomíneos entre as estações, ou seja, a estação chuvosa foi a de

maior densidade flebotomínica durante o período de estudos ($F_{1,36}=4,7571$; $p=0,03579$; Figura 28).

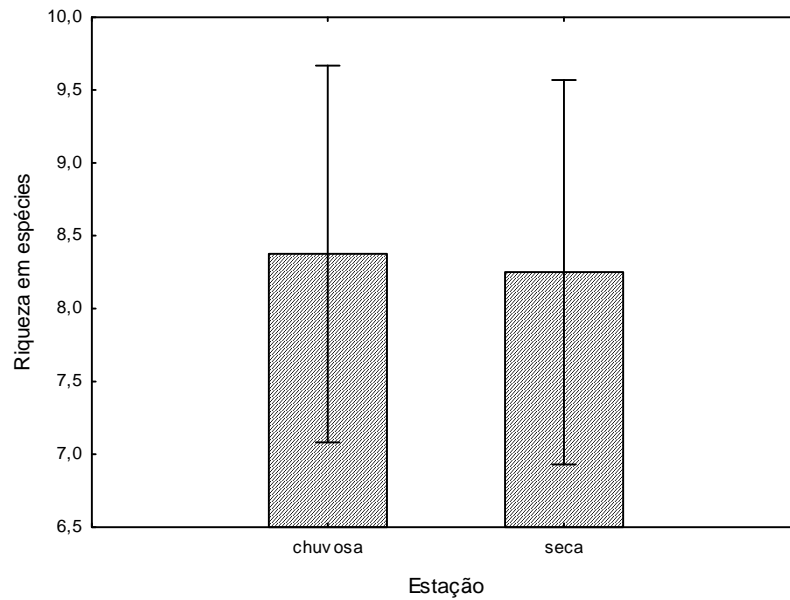


Figura 27: Relação entre riqueza de espécies e estações climáticas durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas ($F_{1,36}=0,04932$; $p=0,82551$).

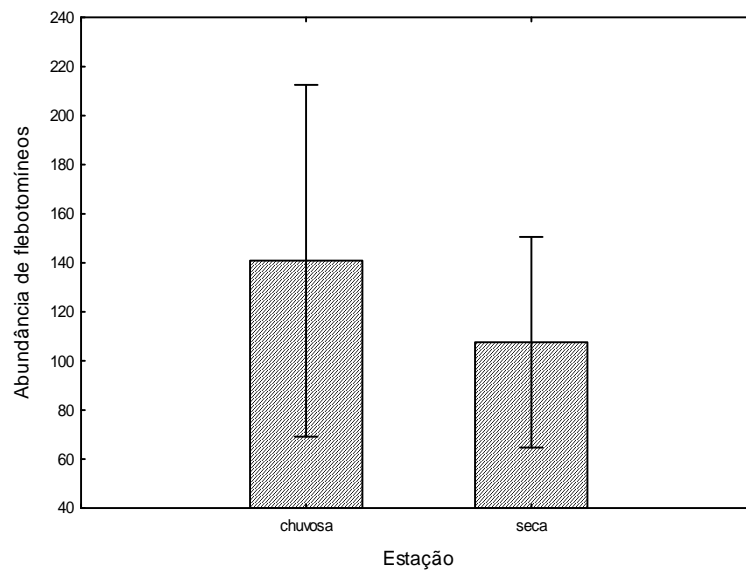


Figura 28: Relação entre abundância de flebotomíneos e estações chuvosas durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas ($F_{1,36}=4,7571$; $p=0,03579$).

Ao comparar a densidade de flebotomíneos por sexo durante as estações climáticas estabelecidas (chuvosa e seca) foi possível constatar uma diferença significativa no número de machos e fêmeas entre as estações ($F_{1,36}=8,7494$; $p=0,00544$). As fêmeas foram mais abundantes do que os machos nas duas estações, porém a ocorrência de indivíduos fêmeas foi maior na estação chuvosa (Figura 29). Apesar disso, não houve diferença significativa no número de espécies para machos e fêmeas entre as estações ($F_{1,36}=2,6521$; $p=0,11214$), conforme observa-se na Figura 30.

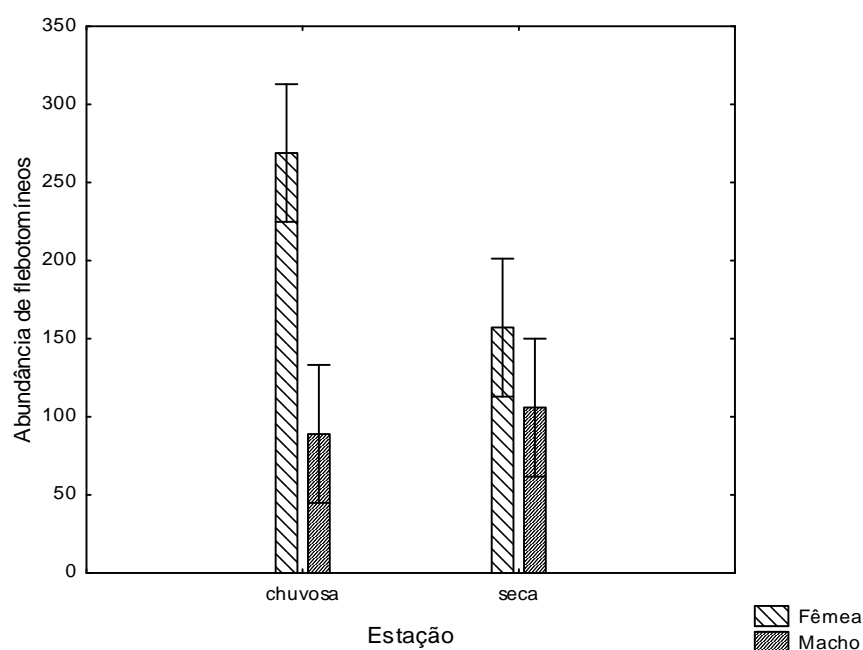


Figura 29: Relação entre estações climáticas e abundância de flebotomíneos por sexo na aldeia Imbaúbas durante o período de estudos ($F_{1,36}=8,7494$; $p=0,00544$).

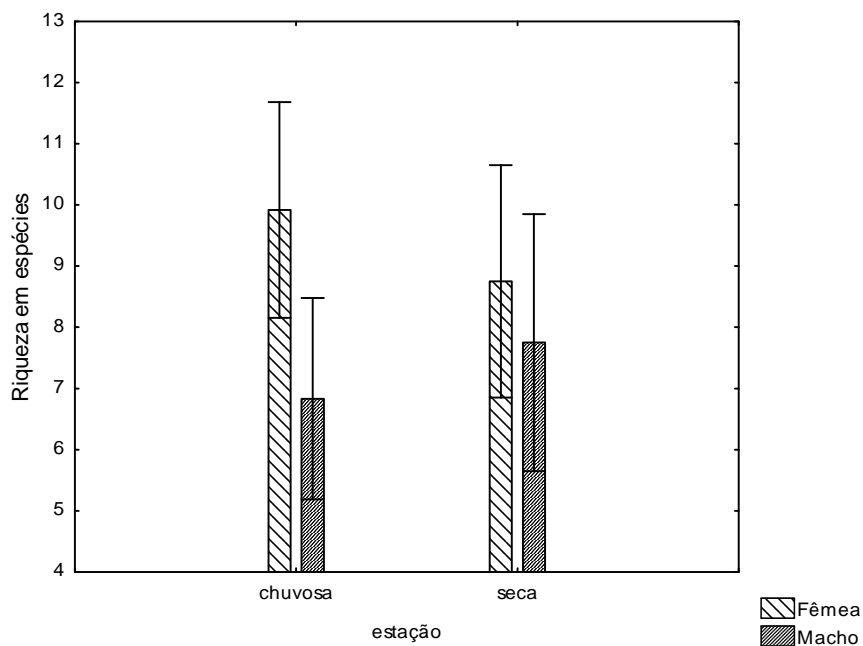


Figura 30: Relação entre estações climáticas e riqueza de flebotomíneos por sexo na aldeia Imbaúbas durante o período de estudos ($F_{1,36}=2,6521$; $p=0,11214$).

A Tabela 6 mostra o número total e porcentagem representativa de cada espécie capturada nas trilhas de coleta durante o período de estudos, de modo que é possível notar a distribuição diferenciada da fauna de flebotomíneos entre as trilhas.

Tabela 6: Número total e porcentagem representativa dos flebotomíneos capturados nas trilhas de coleta durante o período de estudos na Aldeia Imbaúbas.

Espécies	Locais de coleta				Total (%)
	Trilha 1 (%)	Trilha 2 (%)	Trilha 3 (%)	Trilha 4 (%)	
<i>Brumptomyia avellari</i>	2 (28.6)	0 (0)	4 (57.1)	1 (14.3)	7 (100)
<i>Brumptomyia brumpti</i>	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
<i>Evandromyia cortelezzi</i>	0 (0)	0 (0)	7 (100)	0 (0)	7 (100)
<i>Evandromyia evandroi</i>	3 (42.9)	0 (0)	3 (42.9)	1 (14.2)	7 (100)
<i>Evandromyia lenti</i>	31 (20.1)	17 (11.2)	30 (19.4)	76 (49.3)	154 (100)
<i>Evandromyia sallesi</i>	1 (25)	1 (25)	2 (50)	0 (0)	4 (100)
<i>Evandromyia sp.</i>	1 (25)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	4 (100)
<i>Evandromyia spelunca</i>	23 (5.7)	9 (2.4)	198 (49.3)	171 (42.6)	401 (100)
<i>Evandromyia termitophila</i>	23 (63.8)	6 (16.6)	4 (11.1)	3 (8.5)	36 (100)
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	10 (1.0)	11 (1.1)	731 (70.4)	286 (27.5)	1038 (100)
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	8 (2.0)	4 (1.2)	223 (58.2)	148 (38.6)	383 (100)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	45 (54.9)	12 (14.6)	4 (4.9)	21 (25.6)	82 (100)
<i>Lutzomyia renei</i>	3 (0.1)	10 (1.2)	483 (58.2)	336 (40.5)	829 (100)
<i>Lutzomyia sp.</i>	1 (2.6)	0 (0)	38 (97.4)	0 (0)	39 (100)
<i>Martinsmyia minasensis</i>	7 (0.5)	22 (1.4)	980 (62.5)	558 (35.6)	1567 (100)
<i>Micropygomyia capixaba</i>	28 (12.8)	35 (15.8)	54 (24.4)	104 (47)	221 (100)
<i>Micropygomyia goiana</i>	46 (13.8)	49 (14.6)	118 (35.2)	122 (36.4)	335 (100)
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0 (0)	0 (0)	10 (45.5)	12 (54.5)	22 (100)
<i>Micropygomyia peresi</i>	61 (12.6)	95 (19.6)	150 (30.9)	179 (36.9)	485 (100)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	2 (100)
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	0 (0)	2 (2.5)	57 (70.4)	22 (27.1)	81 (100)
<i>Micropygomyia sp.</i>	1 (7.8)	0 (0)	9 (69.2)	3 (23)	13 (100)
<i>Migonemyia migonei</i>	0 (0)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	4 (100)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	154 (83.2)	21 (11.4)	4 (2.1)	6 (3.3)	185 (100)
<i>Nyssomyia neivai</i>	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
<i>Pintomyia misionensis</i>	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Pintomyia serrana</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>Psathyromyia (Foratiniella) sp.</i>	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Psychodogypus ayrozai</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>Scyopemyia sordellii</i>	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
Total (%)	457 (7.73)	295 (4.98)	3113 (52,58)	2055 (34,71)	5920 (100)

A Figura 31 representa uma análise multivariada na qual é possível comparar a composição da fauna de flebotomíneos entre os ambientes amostrados (mata, ambiente rochoso e mata de transição) e as estações climáticas (chuvosa e seca). No plano vertical do gráfico é possível diferenciar a fauna de insetos entre os ambientes, de modo que as áreas de mata apresentam uma fauna flebotomínica característica. Ao traçar uma linha vertical imaginária a partir do ponto zero do eixo X é possível perceber que todas as regiões de mata (trilhas 1 e 2) estão separadas das regiões de mata de transição (trilha 4) e ambiente rochoso (trilha 3). Uma única exceção é a trilha 2 da estação seca que está localizada no plano inferior esquerdo do mapa agrupada com áreas de mata de transição e ambiente rochoso. Entretanto, nesse plano de análise não é possível observar uma separação nítida entre fauna de ambiente rochoso e mata de transição.

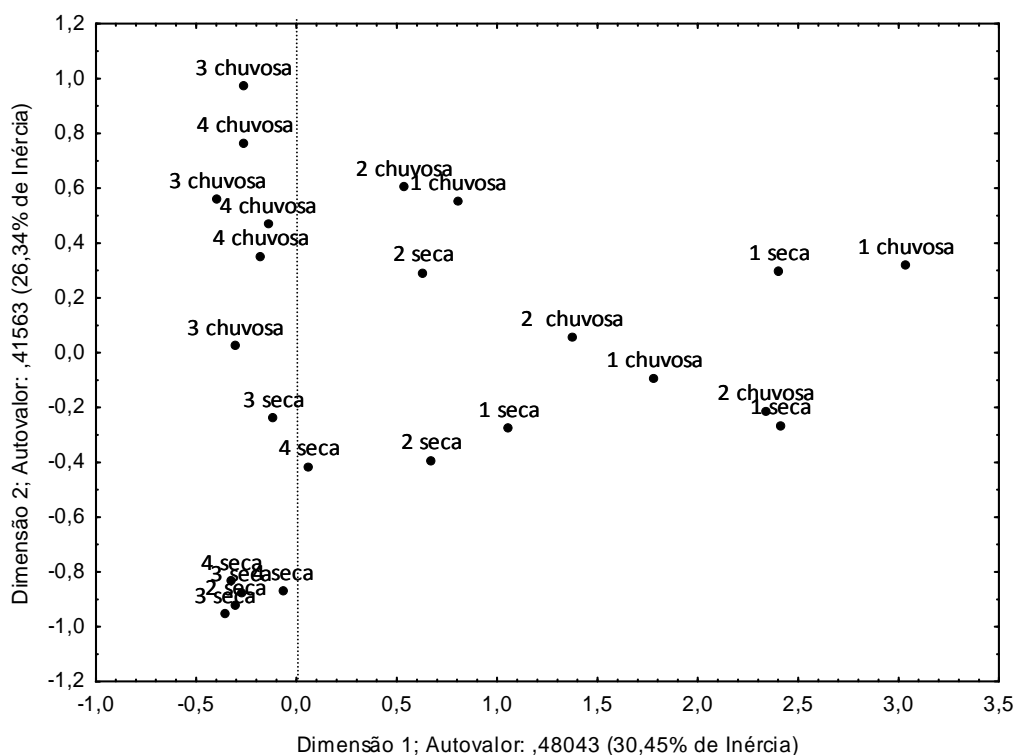


Figura 31: Análise multivariada comparando a composição da fauna de flebotomíneos entre os ambientes amostrados (mata, ambiente rochoso e mata de transição) e as estações climáticas (chuvosa e seca). Destaque para a separação dos ambientes.

Quando se traça uma linha horizontal a partir do ponto zero do eixo Y (Figura 32) é possível diferenciar a fauna de flebotomíneos entre as estações chuvosa (acima da linha) e seca (abaixo da linha). É possível notar a presença de dois pontos na parte superior da linha correspondentes as trilhas 1 e 2 pertencentes a estação seca. Estes pontos fora do padrão, indicam que a composição faunística destas localidades em um determinado período da estação seca mostrou-se mais semelhante a fauna de flebotomíneos correspondente a estação chuvosa. Da mesma forma é possível notar a presença de dois pontos na parte inferior da linha correspondentes as trilhas 1 e 2 pertencentes a estação chuvosa cuja composição faunística se mostrou mais semelhante às faunas de flebotomíneos correspondentes a estação seca.

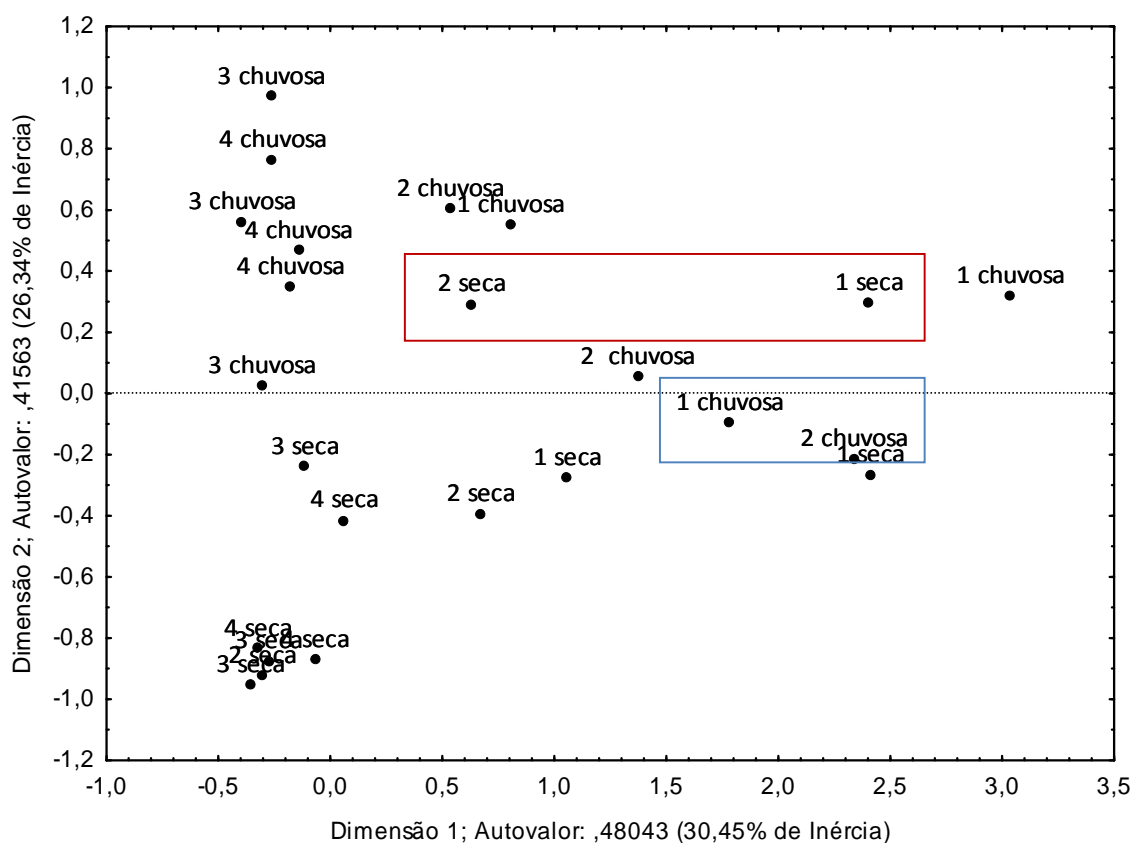


Figura 32: Análise multivariada comparando a composição da fauna de flebotomíneos entre os ambientes amostrados (mata, ambiente rochoso e mata de transição) e as estações climáticas (chuvosa e seca). Destaque para a separação das estações.

5.3 Análise descritiva das principais espécies de flebotomíneos coletadas nos diferentes ecótopos

Somadas as capturas realizadas no peridomicílio das casas e nas trilhas durante o período de estudos foram coletados 8.046 flebotomíneos. O número de flebotomíneos capturados por espécie e sexo é apresentado na Tabela 7.

Foram identificadas vinte e oito espécies pertencentes a onze gêneros: *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Martinsmyia*, *Micropygomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psathyromyia*, *Psychodopygus* e *Sciopemyia*. As espécies capturadas foram *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia cortelezii*, *Evandromyia evandroi*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia sallesi*, *Evandromyia spelunca*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia cavernicola*, *Lutzomyia ischnacantha*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia renei*, *Martinsmyia minasensis*, *Micropygomyia capixaba*, *Micropygomyia goiana*, *Micropygomyia longipennis*, *Micropygomyia peresi*, *Micropygomyia quinquefer*, *Micropygomyia schreiberi*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia misionensis*, *Pintomyia serrana*, *Psychodopygus ayrozai*, *Sciopemyia sordellii* além de um exemplar do gênero *Psathyromyia*.

Tabela 7: Distribuição dos flebotomíneos por sexo, capturadas durante o período de estudos, na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Espécies	Locais de coleta								
	Trilhas			Peridomicílio			Total		
	♀ (%)	♂ (%)	Total	♀ (%)	♂ (%)	Total	♀ (%)	♂ (%)	Total
<i>Brumptomyia avellari</i>	2 (28.5)	5 (71.5)	7	19 (48.7)	20 (51.3)	39	21 (45.6)	25 (54.4)	46
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0 (0)	2 (100)	2	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	2 (100)	2
<i>Evandromyia cortelezii</i>	0 (0)	7 (100)	7	7 (63.6)	4 (36.4)	11	7 (38.8)	11 (61.2)	18
<i>Evandromyia complexo cortelezii</i>	0 (0)	0 (0)	0	22 (100)	0 (0)	22	22 (100)	0 (0)	22
<i>Evandromyia evandroi</i>	0 (0)	7 (100)	7	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	7 (100)	7
<i>Evandromyia lenti</i>	68 (44.1)	86 (55.9)	154	31 (60.7)	20 (39.3)	51	99 (48.2)	106 (51.8)	205
<i>Evandromyia sallesi</i>	0 (0)	4 (100)	4	2 (50)	2 (50)	4	2 (25)	6 (75)	8
<i>Evandromyia sp.</i>	4 (100)	0 (0)	4	0 (0)	0 (0)	0	4 (100)	0 (0)	4
<i>Evandromyia spelunca</i>	322 (80.2)	79 (19.8)	401	5 (83,3)	1 (16,7)	6	327 (80.3)	80 (19.7)	407
<i>Evandromyia termitophila</i>	29 (80.5)	7 (19.5)	36	3 (50)	3 (50)	6	32 (76.1)	10 (23.9)	42
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	1026 (98.8)	12 (1.2)	1038	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	12 (100)	1038
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	220 (57.4)	163 (42.6)	383	18 (72)	7 (28)	25	238 (58.3)	170 (41.7)	408
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	41 (50)	41 (50)	82	542 (49,9)	544 (50.1)	1086	583 (49.9)	585 (50.1)	1168
<i>Lutzomyia renei</i>	167 (19.7)	665 (80.3)	832	33 (97)	1 (3)	34	197 (22.8)	666 (77.2)	866
<i>Lutzomyia sp.</i>	39 (100)	0 (0)	39	27 (65,8)	14 (34.2)	41	66 (82.5)	14 (17.5)	80
<i>Martinsmyia minasensis</i>	1235 (78.8)	332 (21.2)	1567	1 (100)	0 (0)	1	1236 (78.8)	332 (21.2)	1568
<i>Micropygomyia capixaba</i>	207 (93.6)	14 (6.4)	221	3 (50)	3 (50)	6	210 (92.5)	17 (7.5)	227
<i>Micropygomyia goiana</i>	269 (80.2)	66 (19.8)	335	39 (60,9)	25 (39,1)	64	308 (77.1)	91 (22.9)	399
<i>Micropygomyia longipennis</i>	22 (100)	0 (0)	22	0 (0)	0 (0)	0	22 (100)	0 (0)	22
<i>Micropygomyia peresi</i>	171 (35.2)	314 (64.8)	485	12 (85,7)	2 (14,3)	14	183 (36.6)	316 (63.4)	499
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	47 (58)	34 (42)	81	0 (0)	0 (0)	0	47 (58)	34 (42)	81
<i>Micropygomyia sp.</i>	13 (100)	0 (0)	13	0 (0)	0 (0)	0	13 (100)	0 (0)	13
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0 (0)	2 (100)	2	2 (100)	0 (0)	2	2 (50)	2 (50)	4
<i>Migonemyia migonei</i>	3 (75)	1 (25)	4	8 (29,6)	19 (70,4)	27	11 (35.4)	20 (64.6)	31
<i>Nyssomyia intermedia</i>	139 (75.1)	46 (24.9)	185	605 (89,4)	71 (10,6)	676	744 (86.4)	117 (13.6)	861
<i>Nyssomyia neivai</i>	2 (100)	0 (0)	2	0 (0)	0 (0)	0	2 (100)	0 (0)	2
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0 (0)	0 (0)	0	3 (60)	2 (40)	5	3 (60)	2 (40)	5
<i>Pintomyia misionensis</i>	1 (100)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	0	1 (100)	0 (0)	1
<i>Pintomyia serrana</i>	1 (100)	0 (0)	1	3 (75)	1 (25)	4	4 (80)	1 (20)	5
<i>Psathyromyia (Foratiniella) sp.</i>	1 (100)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	0	1 (100)	0 (0)	1
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	0 (0)	1 (100)	1	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	1 (100)	1
<i>Scyopemyia sordellii</i>	2 (66.7)	1 (33.3)	3	0 (0)	2 (100)	2	2 (40)	3 (60)	5
Total	4031 (68)	1889 (32)	5920	1385 (65,1)	741 (34,9)	2126	5413 (67.3)	2630 (32.7)	8046

A coleta de flebotomíneos no peridomicílio foi realizada no período entre julho/08 e julho/09 e a coleta nas trilhas entre outubro/11 e agosto/12, e por terem ocorrido em épocas diferentes não foi possível comparar estatisticamente a abundância e riqueza de flebotomíneos entre estes ambientes.

Durante as coletas no peridomicílio, foi possível amostrar 2126 espécimes de flebotomíneos (26,4%) pertencentes a dezenove espécies (67,8%) e nove gêneros sendo *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia evandroi*, *Lutzomyia cavernicola*, *Micropygomyia longipennis*, *Micropygomyia schreiberi*, *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia misionensis*, *Psathyromyia* sp. e *Psychodopygus ayrozai* as espécies cuja presença não foi registrada neste ambiente. Por outro lado, nas trilhas de coleta um total de 5920 espécimes (73,6%) pertencentes a vinte e sete espécies (96,4%) e onze gêneros foram coletados. Cabe ressaltar que *Ny. whitmani* foi a única espécie cuja presença não foi amostrada neste ambiente.

A proporção entre os flebotomíneos machos e fêmeas se manteve próxima nos diferentes ambientes. Nas trilhas, cerca de 68% do total de flebotomíneos coletados foram indivíduos fêmeas, enquanto no peridomicílio, este número foi de 65,1% o que confere um total global de 67,3% para as fêmeas e 32,7% para os machos (Figura 33).

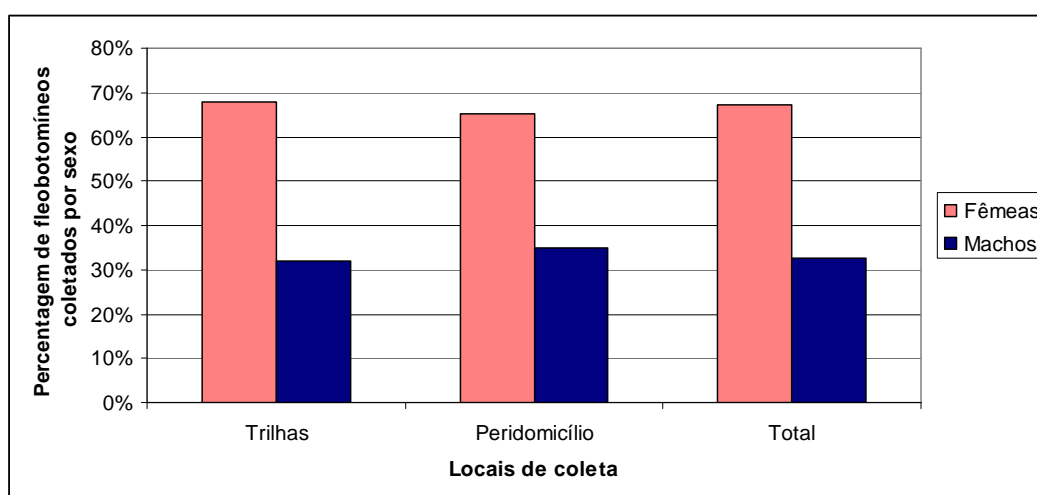


Figura 33: Porcentagem de flebotomíneos capturados por sexo, nos diferentes ecótopos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Com relação às espécies de vetores incriminados das leishmanioses observou-se que a maior densidade destas espécies ocorreu no peridomicílio. Para a espécie *Lu. longipalpis*, 92,98% dos espécimes foram coletados no ambiente peridomiciliar e apenas 7,02% nas trilhas. Enquanto, *Ny. intermedia* 78,52% foram capturados no peridomicílio e 21,48% nas trilhas. Além disso, espécies como *Ny. neivai* e *Ny. whitmani*, tiveram suas presenças registradas em menor número nas trilhas e no peridomicílio respectivamente.

5.4 Estudo de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio

As 729 (52,6%) fêmeas não alimentadas referentes aos segundos e terceiros dias de coleta de cada mês (julho/2008; setembro/2008; novembro/2008; janeiro/2009; abril/2009 e julho/2009) foram submetidas à pesquisa de DNA de *Leishmania* através da técnica de PCR dirigida ao alvo *its1*, como observado na Tabela 8. As fêmeas submetidas à análise molecular foram agrupadas em 263 amostras ou "*pools*", conforme observa-se na Tabela 9. Com a realização da *its1*-PCR e subsequente eletroforese em gel de agarose 1,5% não foi possível identificar a presença do fragmento de 300-350 pb que caracteriza a amostra como positiva para *Leishmania*. Partindo deste resultado, foi utilizada a *Nested* PCR dirigida a uma região do gene SSUrRNA. Este alvo foi escolhido por apresentar maior sensibilidade da técnica em relação a região intergênica *its1* (Schönian *et al.*, 2003).

Tabela 8: Fêmeas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio das casas, referente ao segundo e terceiro dia, utilizadas no estudo de infecção natural por *Leishmania*, durante o período de estudos.

Espécies	Campanhas de coleta						Total
	Jul-08	Set-08	Nov-08	Jan-09	Abr-09	Jul-09	
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	0	2	0	0	1	3
<i>Evandromyia lenti</i>	2	6	5	0	3	1	17
<i>Evandromyia cortelezii</i>	0	6	0	0	1	0	7
<i>Evandromyia sallesi</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>Evandromyia spelunca</i>	0	0	4	0	0	1	5
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2	134	99	9	11	33	288
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	0	5	3	0	2	0	10
<i>Lutzomyia renei</i>	0	5	0	0	1	0	6
<i>Martinsomyia minasensis</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Micropygomyia capixaba</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>Micropygomyia goiana</i>	0	4	8	0	1	1	14
<i>Micropygomyia peresi</i>	0	0	3	0	1	1	5
<i>Migonemyia migonei</i>	0	0	2	0	0	2	4
<i>Nyssomyia intermedia</i>	114	85	19	1	55	87	361
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	1	0	0	1	0	2
<i>Pintomyia serrana</i>	0	0	2	0	0	0	2
Total	119	247	146	10	77	128	727

Tabela 9: Número de fêmeas de flebotomíneos analisadas, por espécie, de acordo com o número de espécimes presente em cada amostra processada.

Espécies	Nº de espécimes por amostra										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Nº de amostras										
<i>Brumptomyia avellari</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Evandromyia lenti</i>	14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	15
<i>Evandromyia cortelezii</i>	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>Evandromyia sallesi</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Evandromyia spelunca</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Evandromyia termitophila</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	73	12	4	3	2	2	2	2	0	11	111
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7
<i>Lutzomyia renei</i>	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
<i>Martinsmyia minasensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Micropygomyia capixaba</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Micropygomyia goiana</i>	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	11
<i>Micropygomyia peresi</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Migonemyia migonei</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Nyssomyia intermedia</i>	39	7	4	5	5	2	1	2	2	19	86
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Pintomyia serrana</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	171	23	9	9	8	4	3	4	2	30	263

A presença do fragmento de 353pb originado pela reação de *Nested* PCR dirigida a uma região do gene SSUrRNA foi observada em 11 amostras (Figura 34), sendo quatro pertencentes a espécie *Ny. intermedia*, duas a *Lu. renei* e *Lu. longipalpis* e uma amostra de cada uma das seguintes espécies: *Lu. ischnacantha*, *Mi. goiana* e *Ev. lenti*.

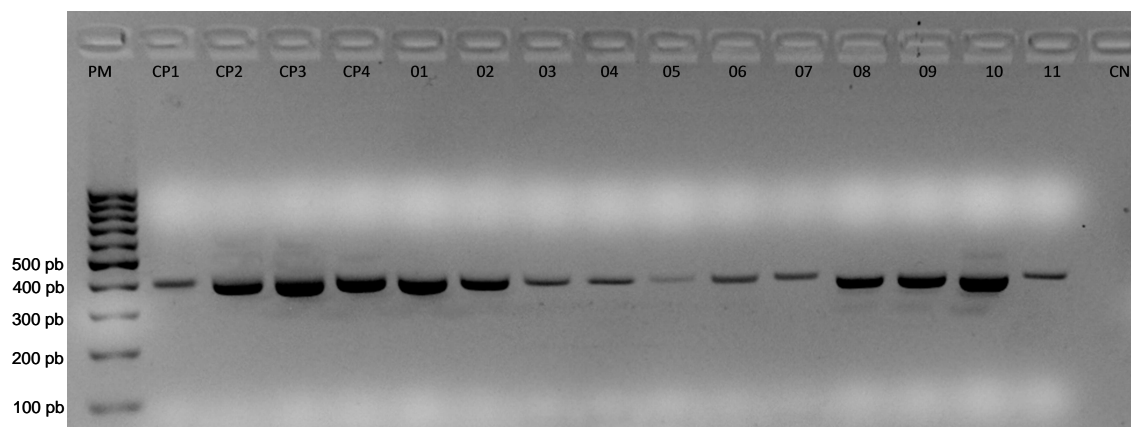


Figura 34: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados da reação de *Nested* PCR realizada com fêmeas de flebotomíneos coletadas no peridomicílio das casas da aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, MG. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb; CP1 - controle positivo de *Le. amazonensis*; CP2 - controle positivo de *Le. braziliensis*; CP3 - controle positivo de *Le. infantum*; CP4 - controle positivo de *Le. guyanensis*; 01 a 11 - amostras de flebotomíneos; CN - controle negativo.

Para a identificação da espécie de *Leishmania*, utilizou-se a técnica do sequenciamento genético. Em nove (81,8%) das onze amostras positivas, esta técnica permitiu caracterizar as espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* nas fêmeas de flebotomíneos infectadas. Desta maneira, foram encontradas duas amostras de *Ny. intermedia* positivas para *Leishmania braziliensis*, uma amostra positiva para *Le. infantum* e uma positiva para *Le. amazonensis*. As amostras de *Lu. longipalpis* foram positivas para *Le. infantum* e *Le. (Viannia) sp.* As amostras provenientes de *Ev. lenti* e *Lu. Ischnacantha* foram positivas para *Le. infantum* e, além disso, foi possível identificar uma amostra de *Mi. goiana* e uma de *Lu. renei* positivas para *Le. guyanensis* e outra amostra de *Le. renei* positiva para *Le. (Viannia) sp.* A Tabela 10

representa todos os resultados de infecção natural por *Leishmania* nos flebotomíneos coletados no peridomicílio descritos de forma detalhada.

A taxa mínima de infecção flebotomínea para as amostras coletadas no peridomicílio das casas localizadas na aldeia Imbaúbas durante o período de estudos foi de 4,1%. Para *Ny. intermedia*, espécie vetora de *Le. braziliensis*, a taxa de positividade foi de 4,6% (4/86) e para *Lu. longipalpis*, principal espécie vetora de *Le. infantum* a taxa de infecção foi de 1,8% (2/111). As demais espécies positivas tiveram as seguintes taxas de infecção: *Lu. ischnacantha* 14,2% (1/7), *Ev. lenti* 6,6% (1/15), *Lu. renei* 33,3% (2/6) e *Mi. goiana* 9% (1/11).

A maior parte das infecções naturais encontradas nos flebotomíneos foi por *Le. infantum* (36,4%). Entretanto, ao se agrupar as espécies de *Leishmania* causadoras da forma tegumentar da doença observa-se o alto índice de 63,6%.

Tabela 10: Resultado da infecção natural de fêmeas de flebotomíneos coletados no peridomicílio das casas, durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Espécies	Fêmeas utilizadas para o estudo de infecção natural	Amostras positivas	Amostras positivas para <i>Le. braziliensis</i>	Amostras positivas para <i>Le. guyanensis</i>	Amostras positivas para <i>Le. infantum</i>	Amostras positivas para <i>Le. amazonensis</i>	Amostras positivas para <i>Le. (Viannia) sp.</i>
<i>Evandromyia lenti</i>	17	1	0	0	1	0	0
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	288	2	0	0	1	0	1
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	10	1	0	0	1	0	0
<i>Lutzomyia renei</i>	6	2	0	1	0	0	1
<i>Micropygomyia goiana</i>	14	1	0	1	0	0	0
<i>Nyssomyia intermedia</i>	361	4	2	0	1	1	0
Total	696	11	2	2	4	1	2

A figura 35 apresenta a distribuição das espécies de flebotomíneos encontradas infectadas por *Leishmania* segundo o ponto de coleta pelo estimador de densidade de Kernel. É possível notar a presença de *hotspots* que indicam uma maior prevalência de insetos positivos durante o período de estudos em determinadas regiões da aldeia Imbaúbas.

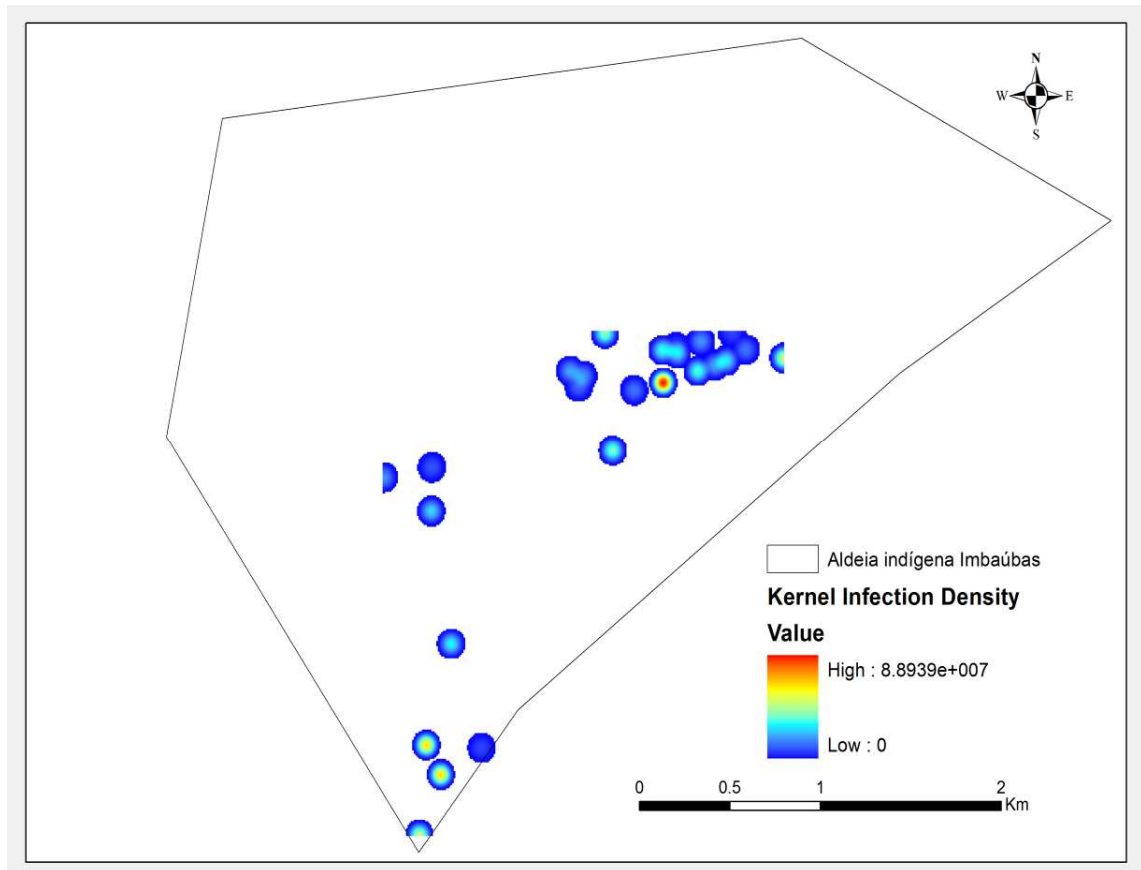


Figura 35: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais onde foi possível encontrar flebotomíneos positivos no peridomicílio das casas localizadas na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.

5.5 Estudo de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos capturadas nas trilhas

As 4031 fêmeas capturadas durante o período de coletas sistematizadas nas trilhas (outubro/11; dezembro/11; fevereiro/12; abril/12; junho/12 e agosto/12) foram submetidas à pesquisa de DNA de *Leishmania* utilizando a PCR dirigida ao alvo *its1*, como observado na Tabela 11. As fêmeas submetidas a análise molecular foram agrupadas em 1.026 amostras ou "*pools*", conforme observa-se na Tabela 12.

Tabela 11: Fêmeas de flebotomíneos capturadas nas trilhas de coleta utilizadas no estudo de infecção natural por *Leishmania* durante o período de estudos.

Espécies	Meses de coleta						Total
	Outubro/11	Dezembro/11	Fevereiro/12	Abril/12	Junho/12	Agosto/12	
<i>Brumptomyia avellari</i>	1	0	0	0	1	0	2
<i>Evandromyia lenti</i>	10	7	5	18	25	3	68
<i>Evandromyia</i> sp.	4	0	0	0	0	0	4
<i>Evandromyia spelunca</i>	50	43	84	63	51	31	322
<i>Evandromyia termitophila</i>	10	1	0	2	13	3	29
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	0	279	67	134	447	203	1026
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	6	64	40	41	59	10	220
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	4	1	2	5	28	1	41
<i>Lutzomyia renei</i>	5	28	0	134	0	0	167
<i>Lutzomyia</i> sp.	39	0	0	0	0	0	39
<i>Martinsmyia minasensis</i>	559	234	341	64	37	0	1235
<i>Micropygomyia capixaba</i>	0	114	45	48	0	0	207
<i>Micropygomyia goiana</i>	96	29	9	74	45	16	269
<i>Micropygomyia longipennis</i>	8	12	0	0	2	0	22
<i>Micropygomyia peresi</i>	37	34	33	57	10	0	171
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	0	0	0	2	10	35	47
<i>Micropygomyia</i> sp.	12	0	0	0	1	0	13
<i>Migonemyia migonei</i>	2	0	1	0	0	0	3
<i>Nyssomyia intermedia</i>	9	6	42	42	39	1	139
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	0	0	0	2	0	2
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Pintomyia serrana</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Psathyromyia (Foratiniella) sp.</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Scyopemyia sordellii</i>	0	0	0	1	1	0	2
Total	852	852	670	687	771	100	4031

Tabela 12: Número de fêmeas de flebotomíneos analisadas, por espécie, de acordo com o número de espécimes presente em cada amostra processada.

Espécies	Nº de espécimes por amostra										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Nº de amostras										
<i>Brumptomyia avellari</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Evandromyia lenti</i>	28	5	3	2	1	1	0	0	0	0	40
<i>Evandromyia</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Evandromyia spelunca</i>	34	11	8	7	3	3	4	2	1	13	86
<i>Evandromyia termitophila</i>	16	1	2	0	1	0	0	0	0	0	20
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	42	7	6	10	5	4	4	2	6	90	176
<i>Lutzomyia ischnacantha</i>	68	12	4	2	4	2	0	1	2	5	100
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	19	3	4	1	1	0	0	0	0	0	28
<i>Lutzomyia renei</i>	24	6	1	2	1	2	1	0	2	1	40
<i>Lutzomyia</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Martinsmyia minasensis</i>	36	6	5	3	4	1	3	5	4	103	170
<i>Micropygomyia capixaba</i>	16	6	2	3	1	0	3	4	1	9	45
<i>Micropygomyia goiana</i>	55	12	9	3	2	4	3	2	1	7	98
<i>Micropygomyia longipennis</i>	7	2	1	0	0	0	0	1	0	0	11
<i>Micropygomyia peresi</i>	42	9	3	5	2	4	1	3	0	11	80
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	6	2	4	0	1	1	0	0	0	2	16
<i>Micropygomyia</i> sp.	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
<i>Migonemyia migonei</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Nyssomyia intermedia</i>	69	6	4	1	3	1	0	0	0	2	86
<i>Nyssomyia neivai</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Pintomyia misionensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Pintomyia serrana</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia (Foratiniella) sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Scyopemyia sordellii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	492	88	56	39	29	23	19	20	17	243	1026

A presença do fragmento de 300-350 pb originado pela reação de PCR dirigida ao alvo *its1* foi observada em 12 amostras (Figura 36), sendo 5 pertencentes a espécie *Mt. minasensis*, 3 a *Ny. intermedia*, 2 a *Mi. peresi* e uma amostra de cada uma das seguintes espécies: *Mi. capixaba* e *Ev. lenti*.

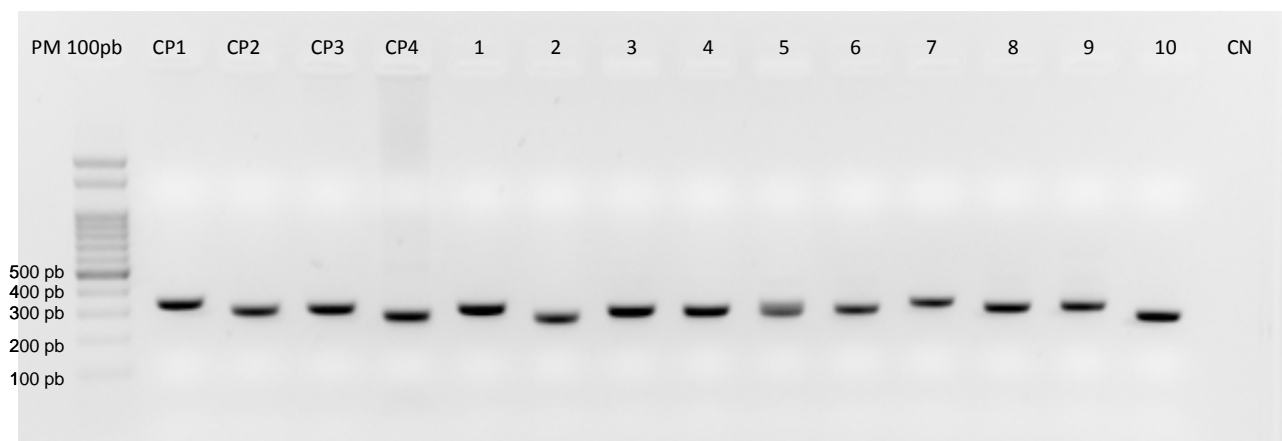


Figura 36: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando produtos amplificados pela PCR *its1* de amostras de fêmeas capturadas nas trilhas de coleta na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG. Canaletas: PM 100pb - peso molecular de 100pb; CP1 - controle positivo de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); CP2 - controle positivo de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), CP3 - controle positivo de *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), CP4 - controle positivos de *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 1 a 10 - fêmeas de flebotomíneos e CN - controle negativo.

Para a identificação da espécie de *Leishmania* utilizou-se a técnica da PCR-RFLP do alvo *ITS1*, utilizando a *HaeIII* como enzima de restrição e em todas amostras positivas, esta técnica foi capaz de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida. Desta maneira, foram encontradas quatro amostras pertencentes as espécies: *Mt. minasensis*, *Ny. intermedia*, *Mi. peresi* e *Mi. capixaba* carreando DNA de *Le. braziliensis*, três amostras pertencentes as espécies: *Ev. lenti*, *Ny. intermedia* e *Mi. peresi* carreando DNA de *Le. infantum* e três amostras pertencentes a *Mt. minasensis* positivas para *Le. guyanensis* (duas) e uma positiva para *Le. amazonensis* (Figura 37).

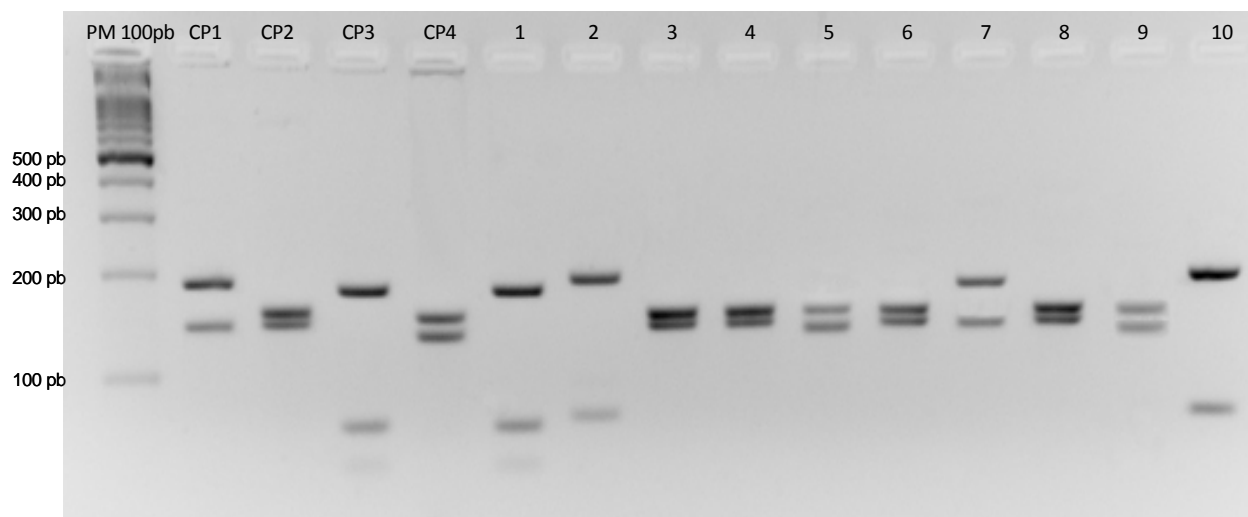


Figura 37: Gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de restrição obtidos através da técnica de PCR-RFLP utilizando *HaeIII* em amostras de fêmeas capturadas nas trilhas da aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG. Canaletas: PM 100pb - peso molecular de 100pb; CP1 - controle positivo de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); CP2 - controle positivo de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), CP3 - controle positivo de *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), CP4 - controle positivos de *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 1 a 10 - fêmeas de flebotomíneos.

Os perfis de restrição obtidos nas amostras 2 e 10 (*Ny. intermedia* e *Mi. peresi*, respectivamente) apresentaram uma pequena variação com relação a amostra 1 (*Ev. lenti*) e o controle de *Le. infantum* (Figura 37) o que também pode ser observado nos perfis gerados antes da clivagem dos produtos com a enzima de restrição (Figura 36). Esta variação pode estar relacionada ao tamanho do fragmento amplificado que varia de 300-350pb, podendo indicar uma possível variabilidade genética intraespecífica.

A taxa mínima de infecção flebotomínica para os resultados obtidos nas trilhas de coleta durante o período de estudos foi de 1,1%. A maior parte das infecções naturais encontradas foi por *Le. braziliensis*. Para *Ny. intermedia*, vetora desta espécie de *Leishmania* a taxa de positividade foi de 2,3% (2/86). A infecção por *Le. braziliensis* também foi encontrada em espécies de flebotomíneos que não são consideradas vetoras da mesma: *Mt. minasensis* apresentou 0,5% (1/170), *Mi. peresi* 1,2% (1/80) e *Mi. capixaba* 2,2% (1/45).

Para a infecção natural por *Le. infantum* as taxas de positividade foram as seguintes: *Nyssomyia intermedia* 1,1% (1/86), *Ev. lenti* 2,5% (1/40) e *Mi. peresi* 1,2% (1/80). Com relação a infecção por *Le. guyanensis* a taxa de infecção foi de 1,7% para *Mt. minasensis* (3/170) e por fim a infecção por *Le. amazonensis*

correspondeu a 0,5% (1/170) para a mesma espécie de flebotomíneo. A tabela 13 apresenta estes resultados em detalhes.

Tabela 13: Resultado de infecção natural de fêmeas de flebotomíneos capturadas das trilhas de coleta, durante o período de estudos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Espécies	Total de fêmeas coletadas	Nº de amostras positivas	Nº de amostra(s) com <i>Le. braziliensis</i>	Nº de amostra(s) com <i>Le. guyanensis</i>	Nº de amostra(s) com <i>Le. infantum</i>	Nº de amostra(s) com <i>Le. amazonensis</i>
<i>Evandromyia lenti</i>	68	1	0	0	1	0
<i>Martinsmyia minasensis</i>	1235	5	1	3	0	1
<i>Micropygomyia capixaba</i>	207	1	1	0	0	0
<i>Micropygomyia peresi</i>	171	2	1	0	1	0
<i>Nyssomyia intermedia</i>	139	3	2	0	1	0
Total	1820	12	5	3	3	1

A trilha número 3 foi a que apresentou maior número de fêmeas positivas para *Leishmania* com quatro amostras, que representam 33,3% do total de infecções naturais. Em seguida, aparecem as trilhas 4 e 2 com três amostras positivas em cada (25% por trilha) e por fim a trilha 1, com duas amostras positivas, 16,7% do total.

O mapa, representado pela Figura 38, mostra a aldeia Imbaúbas, na Terra Indígena Xakriabá, com o estimador de densidade de Kernel em relação as coletas realizadas na trilhas. É possível notar a presença de *hotspots* que indicam uma maior prevalência de insetos positivos durante o período de estudos em determinadas regiões da aldeia Imbaúbas onde predominam os afloramentos rochosos e vegetação de transição, caracterizados pela trilha 3 e 4 respectivamente.

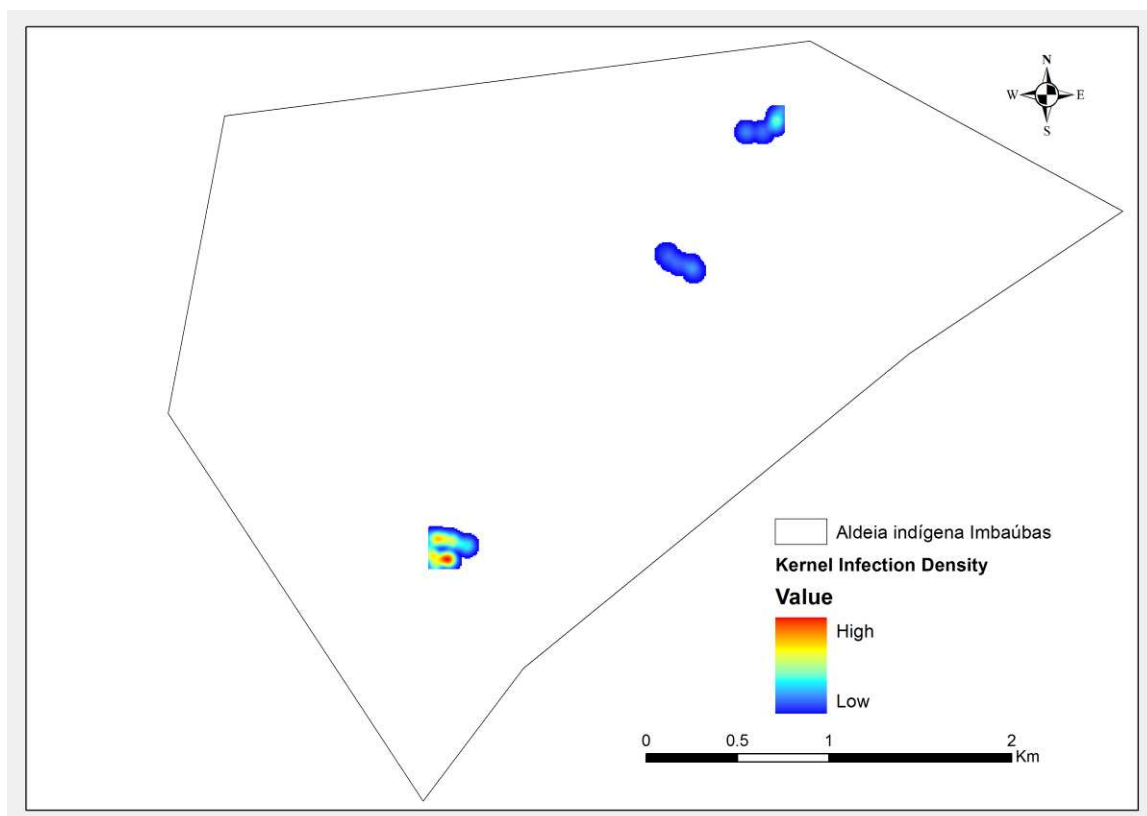


Figura 38: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais de registro de flebotomíneos positivos nas trilhas de coleta na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.

O estimador de densidade de Kernel foi utilizado também a fim de avaliar a presença de *hotspots* quando foram plotados todos os dados relacionados a infecção natural em flebotomíneos nos ecótopos peridomicílio e trilhas. É possível notar a presença de diversas regiões onde a infecção natural foi mais registrada (Figura 39). Estes locais estão principalmente relacionados às regiões próximas as trilhas, principalmente as trilhas 3 e 4, semelhante aos resultados apontados anteriormente. Entretanto, é possível notar a presença de regiões menos intensas, porém numerosas por praticamente toda a área de estudos. Vale ressaltar que estas regiões, estão relacionadas com as casas onde foram realizadas as coletas entomológicas.

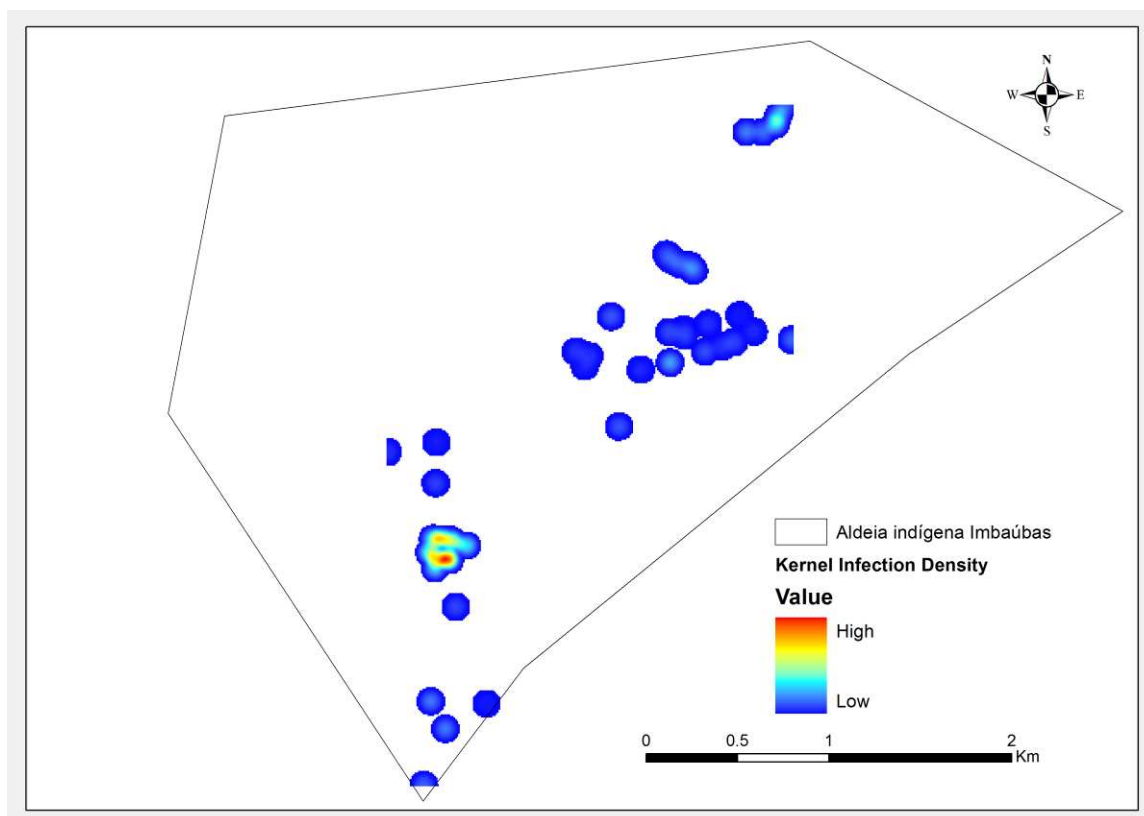


Figura 39: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais de registro de flebotomíneos positivos nas trilhas e no peridomicílio das casas da aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.

5.6 Correlação da infecção por *Leishmania* em flebotomíneos e nos hospedeiros vertebrados na Terra Indígena Xakriabá

O estimador de densidade de Kernel foi utilizado a fim de avaliar a presença de *hotspots* quando foram plotados todos os dados relacionados a presença de *Leishmania* proveniente dos hospedeiros silvestres, sinantrópicos e domésticos, além dos relatos de casos humanos de LTA e os resultados entomológicos aqui obtidos. Na Figura 40 pode-se observar o resultado obtido com cada elemento do ciclo de transmissão e de forma conjunta, unificando os dados.

Com relação aos dados referentes aos cães é possível notar a presença de diversos *hotspots* isolados, fato que se justifica devido ao fato de terem sido encontrados cães naturalmente infectados por *Leishmania* em diversas casas situadas na aldeia Imbaúbas em estudos anteriores. Fato semelhante pode ser observado com os dados provenientes de casos humano de LTA. Com relação aos dados oriundos dos hospedeiros silvestres e sinantrópicos e dos flebotomíneos é

possível notar a presença de *hotspot* em locais semelhantes, ambos situados sobre as trilhas de coleta, especialmente sobre as trilhas 3 e 4. Esta simpatria pode ilustrar uma adaptação dos flebotomíneos ao ambiente e principalmente uma relação íntima com possíveis reservatórios. Ainda com relação aos dados entomológicos, é possível notar a existência de pequenas regiões cuja infecção foi evidenciada (flebotomíneos positivos no peridomicílio), de forma que algumas sobrepõem aos dados de infecção humana e presença de cães infectados.

De forma global, com a unificação dos dados, pode-se perceber novamente a existência de uma região mais propensa a infecção por *Leishmania* em uma área de característica silvestre (trilhas 3 e 4) e regiões com características urbanizadas em torno deste *hotspot* apresentando importância epidemiológica na transmissão das leishmanioses.

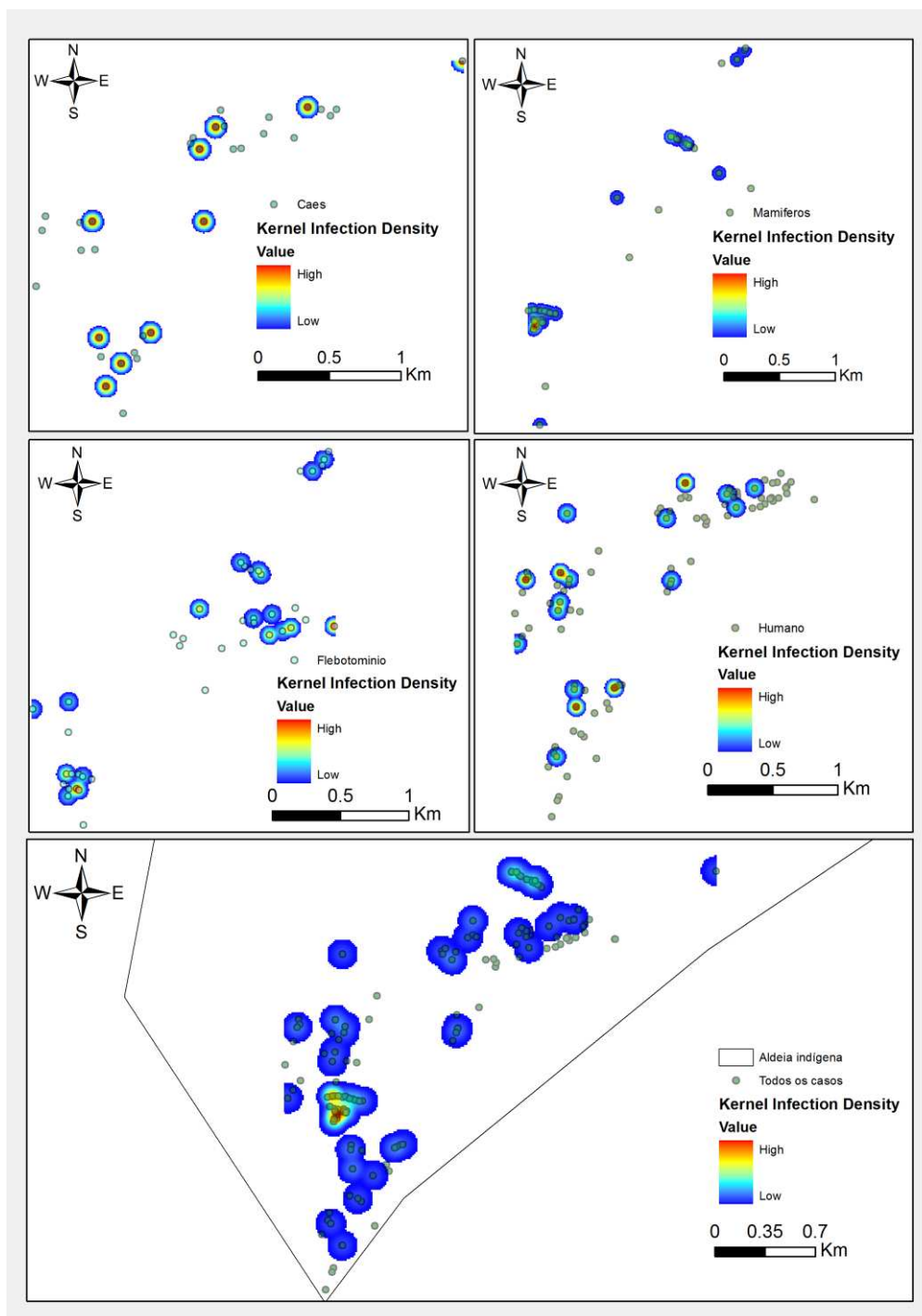


Figura 40: Estimador de densidade de Kernel atribuído aos locais onde foram registrados cães, pequenos mamíferos, casos humanos de LTA e flebotomíneos positivos na aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá.

6 DISCUSSÃO

6.1 Fauna Flebotomínica

Descrições da fauna flebotomínica e estudos sobre o comportamento de algumas espécies, geralmente de importância médica conhecida, já tem sido objeto de várias investigações (Andrade Filho *et al.*, 1997, Mayo *et al.*, 1998, Rebêlo *et al.*, 2001). Esses insetos são frequentemente encontrados em ecótopos naturais, como troncos de árvores, tocas de animais, folhas mortas, fendas rochosas (Arias & Freitas, 1982; Aguiar *et al.* 1985; Alexander *et al.* 1992; Azevedo *et al.* 1993; Galati *et al.*, 2006), bem como em ambientes rurais e urbanos próximos a abrigos de animais domésticos e residências (Ryan & Brazil, 1984; Dourado *et al.*, 1989; dos Santos *et al.*, 2003; Brazil *et al.*, 2006; Michalsky *et al.*, 2009). Considerando a diversidade de ecótopos onde estes insetos podem ser encontrados, para o estudo da fauna de uma região é imperativo a pesquisa nos diferentes ambientes que compõem o cenário da área a ser estudada. Sendo assim, em nosso estudo fizemos coletas em pontos localizados no peridomicílio das casas e em trilhas demarcadas em área de formações florestais típicas de cerrado, matas estacionais decíduais, ambiente de cerrado *sensu strictu* e áreas de transição cerrado/caatinga.

A fauna de flebotomíneos encontrada na aldeia Imbaúbas, situada na Terra Indígena Xakriabá mostrou-se bastante diversificada, com um total de vinte e oito espécies coletadas pertencentes a onze gêneros. O número de espécies coletado corresponde a 28,9% do total de 97 espécies de flebotomíneos já registradas em Minas Gerais (Andrade & Dantas-Torres, 2010; Carvalho *et al.*, 2011; Barata *et al.* 2012; Andrade & Galati, 2012).

Apesar das coletas no peridomicílio e nas trilhas terem sido feitas em períodos diferentes, impossibilitando uma análise estatística comparativa entre os ecótopos, algumas observações podem ser destacadas. Em relação à riqueza foi observado um número maior de espécies nas trilhas onde foi possível registrar a ocorrência de vinte e sete espécies (96,4% do total), enquanto que no peridomicílio foram amostradas dezenove espécies (67,8% do total). Este fato possivelmente se deve a diversidade de ecótopos que compõem as trilhas selecionadas e aos hábitos ecléticos das espécies capturadas, uma vez que nas trilhas além da ocorrência de animais silvestres observa-se também a presença constante de animais domésticos,

como cães, galinhas e porcos. Além disso, o ambiente peridomiciliar apresenta um maior grau de interferência humana o que provavelmente dificulta a adaptação de algumas espécies de flebotomíneos. Vale ressaltar que o peridomicílio das casas da Terra Xakriabá tem características rurais com a presença de animais domésticos e plantações de árvores frutíferas e grãos o que propicia um ambiente com refúgios e fonte alimentar para os flebotomíneos e matéria orgânica necessária para o desenvolvimento das formas imaturas. Isto pode explicar o número significativo de espécies (19) encontrado neste ecótopo o que geralmente não é observado nas áreas com características estritamente urbanas.

Um fato interessante do nosso estudo é a predominância das espécies *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* no ambiente peridomiciliar diferentemente do observado nas trilhas onde estas espécies foram coletadas em pequeno número. Estas espécies estão envolvidas na veiculação dos agentes etiológicos da LV e LT respectivamente em várias áreas endêmicas do Brasil (Rangel & Lainson, 2003; Andrade-Filho *et al.* 2007).

Desde a década de 30, quando o ciclo da LV começou a ser elucidado, diversos autores têm comprovado a adaptabilidade de *Lu. longipalpis* a ambientes modificados (Lainson & Rangel, 2005) bem como seu papel como elo essencial na cadeia de transmissão de *Leishmania infantum*. Sua presença constante no peridomicílio, alimentando-se com frequência em animais domésticos e sinantrópicos, associada a sua antropofilia notável contam a favor de sua capacidade vetorial (Deane, 1956; Killick-Kendrick, 1990) e consequente participação na dinâmica de transmissão da leishmaniose visceral em ambientes peridomiciliares rurais e urbanos (Deane 1956, Lainson & Shaw 1979, 1998).

Nossos resultados estão de acordo com o encontrado por outros autores em estudos entomológicos realizados no norte do Estado de Minas Gerais, onde *Lu. longipalpis* é apontada como espécie predominante (Dias *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2005). É conhecido que existe uma correlação entre a densidade desta espécie e as condições observadas no peridomicílio e que esta espécie é frequentemente associada a presença de animais domésticos (Forattini, 1960; Sherlock & Guitton, 1969; Quinnell & Dye, 1994; Camargo-Neves *et al.*, 2001). Esta característica comportamental foi evidenciada neste estudo, uma vez que no peridomicílio das casas era possível encontrar animais como galinha, porco e cães.

Com relação a *Ny. intermedia*, 78,5% dos espécimes foram coletados no peridomicílio e o restante (21,5%) esteve praticamente restrito aos ambientes de mata próxima as residências. Estes achados vão de acordo aos relatos de Forattini (1953, 1960) no planalto Paulista e Rangel *et al.*, (1999) em estudo realizado em Mesquita (RJ), nos quais *Ny. intermedia sensu lato* esteve intimamente relacionada a humanos, animais domésticos e sinantrópicos, em uma variedade de habitats, incluindo peridomicílio e regiões de mata. Já em 1922, *Ny. intermedia sensu strictu* foi incriminada como vetor potencial de *Le. braziliensis* na cidade do Rio de Janeiro, e a partir de então, evidências epidemiológicas acumuladas ao longo dos anos têm sugerido que *Ny. intermedia sensu lato* é o principal transmissor do agente etiológico de LTA em áreas endêmicas no sudeste do Brasil (Forattini & Santos, 1952; Forattini *et al.*, 1972; Casanova *et al.* 1995; Marcondes *et al.* 1997; Córdoba-Lanus *et al.*, 2006; Saraiva *et al.* 2009; Rangel & Lainson, 2009), principalmente por observar-se a distribuição coincidente com a doença no homem (Forattini, 1953; 1973; 1976; Araújo-Filho, 1979; Gomes *et al.*, 1986; Rangel *et al.*, 1986, 1990). Portanto, devido a importância epidemiológica comprovada deste táxon e a alta densidade populacional encontrada principalmente no peridomicílio, este pode está participando do ciclo de transmissão das leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá.

Ainda com referência a aspectos epidemiológicos das leishmanioses no peridomicílio, a densidade elevada de vetores aumenta a possibilidade de transmissão nesses locais (Deane & Deane 1962; Sherlock & Guitton, 1969; Brasil *et al.*, 1991; Andrade Filho *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Margonari *et al.*, 2004). A presença de abrigos de animais domésticos e as condições de higiene também contribuem para a elevada densidade de *L. longipalpis* e *Ny. intermedia* nesses ambientes (Ximenes *et al.*, 1999).

Em Minas Gerais a distribuição de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* segue aquela proposta por Marcondes *et al.* (1998). *Ny. intermedia* ocorre nas regiões do Rio Jequitinhonha, Vale do Rio Doce, Metalúrgica e Zona da Mata, enquanto *Ny. neivai* ocorre nas regiões do Triângulo Mineiro e sul do estado. Nas regiões do Alto e Médio São Francisco e noroeste as duas espécies são simpátricas. Estes dados corroboram os resultados encontrados neste estudo, já que a Terra Indígena Xakriabá está localizada na região norte do estado, no Médio São Francisco. Apesar de Barata *et al.* (2008) relatarem apenas a presença de *Ny. intermedia* em uma localidade próxima a área de estudos, também na região do Médio São Francisco,

em nosso estudo foi possível relatar a presença de *Ny. neivai* mesmo que em pequenas proporções.

Também merecem atenção as espécies *Ev. cortellezii*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Ev. termitophila*, *Migonemyia migonei*, *Ny. neivai* e *Ny. whitmani*, que apesar da baixa densidade amostrada neste estudo, já foram encontradas naturalmente infectadas e até mesmo incriminadas como vetoras em diversas regiões das Américas (Pita-Pereira *et al.* 2005; Andrade-Filho *et al.* 2007; Saraiva *et al.* 2009; Carvalho *et al.* 2008) de modo que algumas delas podem estar envolvidas nos ciclos de transmissão das leishmanioses. Do ponto de vista epidemiológico, o encontro de espécies como *Lutzomyia cavernicola* e *Martinsmyia minasensis* não indica risco de transmissão da doença ao homem por não serem incriminadas como espécies vetoras de leishmanioses, porém devido a grande densidade populacional destas espécies nas trilhas de coleta faz-se necessário conhecer aspectos a cerca dos hábitos ecológicos destas espécies que, eventualmente, podem fazer parte de um possível ciclo biológico destes parasitos.

Na aldeia Imbaúbas, uma pequena porcentagem de *Ny. whitmani* foi capturada, e este número se restringiu às coletas sistematizadas no peridomicílio das casas, particularmente em residências situadas próximas a matas e com cultivo de monocultura (principalmente bananas). Já em 1960, Forattini sugeriu que esta espécie era dependente de mata primária, mas que poderia ser coletada, em vários meses do ano, dentro das residências, em áreas cuja mata ainda estava mais preservada. Ainda que possa estar presente na mata em incidência muito baixa, é fato concreto que *Ny. whitmani* predomina no peridomicílio, onde, possivelmente, está se criando e praticando hematofagia no homem e em animais domésticos (Mayrink *et al.*, 1979; Passos *et al.*, 1991; Rangel & Lainson, 2003). Em outro estudo, Forattini (1960) relata a coexistência de *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia sensu lato* em áreas recentemente invadidas pelo homem e a predominância da segunda espécie a medida que aumentam as alterações no meio ambiente.

Apesar de ter sido coletada em pequeno número, é necessário destacar a ocorrência de *Ev. lenti* tanto no peridomicílio quanto nas trilhas de coleta. De acordo com as observações de Deane & Deane (1957) um número reduzido desta espécie foi encontrada no peridomicílio fora de abrigos naturais e a grande parte com hábito intradomiciliar. Sherlock (1957) opina que esta espécie deve ser “semi-doméstica”, criando nas redondezas das habitações, sendo encontrada pela manhã repousando

dentro de domicílios e em galinheiros e procurando se alimentar de pessoas e animais domésticos desde o crepúsculo. Estas observações foram confirmadas pelo mesmo autor em 1996 em Jacobina (BA) onde foi verificado *Ev. lenti* picando o homem, cavalos e cães, além de ter sido encontrada naturalmente infectada por promastigotas. Apesar desses relatos, Brazil *et al.*, (1997) em estudo realizado sobre a biologia desta espécie utilizando uma população de Minas Gerais, declararam que a mesma não apresenta hábitos antropofílicos e é refratária ao desenvolvimento de *Leishmania* sp. Recentemente foi relatada sua infecção natural por *Le. braziliensis* em avaliação utilizando técnicas de biologia molecular (Xavier, 2007, Margonari *et al.*, 2010, Paiva *et al.*, 2010). Assim, o possível papel epidemiológico de *Ev. lenti* precisa ser melhor esclarecido, visto que sua infecção natural foi reportada neste estudo tanto no peridomicílio quanto em áreas de mata.

A trilha que apresentou maior densidade de flebotomíneos foi a trilha 3 caracterizada como área de afloramento rochoso com pouca vegetação formada principalmente de cactáceas. Durante o período de estudos foram capturados 3113 flebotomíneos neste local, que representa 52,5% do total amostrado nas trilhas e 38,7% de toda a fauna flebotomínica coletada. Além disso, somente nesta trilha foram coletadas 20 espécies que representam 71,4% da riqueza amostrada. Este fato deve-se principalmente a composição do ambiente que é formado por afloramentos rochosos verticais, formando verdadeiras crateras no solo, mantendo a temperatura e umidade relativamente estáveis, tornando-se propícias a reprodução e estabelecimento de diferentes espécies de animais vertebrados, como pequenos e médios roedores e quirópteros, que podem servir de fonte alimentar para os flebotomíneos. Todavia, as áreas predominantemente compostas por matas (trilhas 1 e 2), foram responsáveis por cerca de 70,9% da população de *Lutzomyia longipalpis* e 94,6% da população de *Ny. intermedia* amostradas nas trilhas, denotando uma maior importância epidemiológica visto que a ocorrência das principais espécies vetoras foram praticamente restritas a estes ambientes.

Ainda com referência aos dados entomológicos obtidos na trilha 3, algumas espécies coletadas estão entre as cerca de 60 espécies citadas como predominantemente troglófilas ou adaptadas a ambientes rochosos, são elas: *Brumptomyia avellari*; *Evandromyia spelunca*; *Lutzomyia cavernicola*; *Lutzomyia longipalpis*; *Lutzomyia renei*; *Martinsmyia minasensis*; *Micropygomyia goiana*; *Micropygomyia peresi* e *Micropygomyia quinquefer* (Williams, 1976; Lugo *et*

al., 1991; Young & Duncan, 1994; Galati *et al.*, 1996; Galati & Nunes, 1999; CIPA Group, 1999, Carvalho *et al.*, 2011). A predominância de *Mt. minasensis* (31,4% do total coletado neste ambiente) merece atenção, uma vez que a alimentação e os hábitos desta espécie são pouco conhecidos, podendo estar intimamente relacionada a roedores. Outro aspecto que corrobora este ponto de vista é que a espécie em questão pertence ao gênero *Martinsmyia*, cuja espécie *Mt. gasparviannai*, é sabidamente atraída por roedores (Falqueto *et al.*, 1985). Além disso, (Galati *et al.*, 2003) em estudo realizado no Mato Grosso do Sul, sugere que *Mt. oliveirai*, outra espécie deste táxon, também seja atraída por roedores.

Em relação às espécies do gênero *Micropygomyia* cuja ocorrência não se restringiu às regiões rochosas, não apresentam características em seu comportamento que as associem à transmissão das leishmanioses. Este grupo é dotado de labroepifaringe muito curta, e provavelmente se alimenta de animal de sangue frio, como sugere Young e Duncan (1994). O encontro de *Mi. peresi* foi relatado em gaiola com a isca representada por um lacertídeo (lagartixa), e em espaço entre pedras e fendas de rochas (Deane & Deane, 1957; Galati *et al.*, 1997).

Ev. spelunca, descrita por Carvalho *et al.* 2011 em uma gruta no município de Lassance (MG) e coletada neste estudo principalmente nas trilhas 3 e 4 (ambiente rochoso e mata de transição respectivamente) é pertencente ao complexo *cortelezzii*, assim como *Ev. sallesi*, *Ev. cortelezzii* e *Ev. corumbaensis* e talvez se alimente em quirópteros e roedores, pois ambos são abundantes nestes ambientes (grutas e afloramento rochoso), como sugere Galati *et al.* (1997) para uma espécie troglófila do complexo *cortelezzii*.

Apesar de ter sido coletada em pequeno número na área de estudos *Ev. sallesi* já foi encontrada naturalmente infectada por tripanossomatídeos (Mayrink *et al.*, 1979) como também foi relatada sua infecção natural por *Le. infantum* (Saraiva *et al.*, 2008), entretanto não existem indícios de possuir capacidade vetorial (Rangel & Lainson, 2003; Young & Duncan 1994). Ainda sobre o gênero *Evandromyia*, na região metropolitana de Belo Horizonte foi assinalada a infecção natural de *Ev. cortelezzii* por *Le. infantum* (Carvalho *et al.*, 2008). Por sua vez, *Ev. termitophila*, cuja presença foi relatada neste estudo nos diferentes locais de estudos, é freqüentemente citada em levantamentos entomológicos no Estado de Minas Gerais (Loiola *et al.*, 2007). Esta espécie foi descrita em 1964, em Minas Gerais, quando teve sua ocorrência associada a ninhos de térmitas (Martins *et al.* 1977) e Saraiva *et*

al., 2010 através de técnicas moleculares, relataram a infecção por *Le. infantum* nesta espécie. Entretanto, não há outros relatos que possam indicar que tais espécies apresentem importância epidemiológica.

Além da alta prevalência de *Mt. minasensis* no ambiente das trilhas, a presença regular ao longo do ano de espécies como *Mi. peresi*, *Mi. goiana*, *Lu. renei*, *Lu. cavernicola* e *Ev. spelunca* sugere a utilização deste ambiente como criadouro, principalmente por se coletar espécimes de ambos sexos. Para as demais espécies, cuja presença ao longo do estudo foi meramente esporádica, sugere-se que o ambiente sirva apenas como abrigo, como sugerido por Galati *et al.* (1997). Se comprovada a capacidade vetorial dessas espécies, estes ecótopos podem oferecer riscos à transmissão das leishmanioses aos frequentadores do local.

O número total de fêmeas (5413) foi maior que o número de machos (2630), sendo a razão obtida entre os sexos de 2,05. Este achado diferencia do relatado por alguns autores que apontam a presença predominante de machos em relação às fêmeas (Loiola *et al.* 2007; Dorval *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010). Domingos *et al.* (1998) relatam em seus estudos que a maior proporção de machos nas armadilhas luminosas (tipo CDC) pode ser explicada por um comportamento natural, em que os machos acompanham as fêmeas a fim de garantir a fertilização durante seus deslocamentos. O fato de encontrarmos mais fêmeas neste estudo pode estar relacionado ao comportamento e atividades destes insetos, aos hábitos de seus hospedeiros entre outros fatores que ainda precisam ser melhores elucidados.

A relação macho/fêmea de *L. longipalpis* tanto nas coletas realizadas no peridomicílio quanto nas trilhas foi de 1,00:1,00. Um resultado diferente do encontrado anteriormente para esta espécie em Campo Grande (Oliveira *et al.* 2003), Porteirinha (Barata *et al.* 2004), Janaúba (Michalsky *et al.* 2009), e em Belo Horizonte (Margonari *et al.*, 2004; Resende *et al.*, 2006), onde o número de machos foi superior ao número de fêmeas. Com relação a *Ny. intermedia* a razão macho/fêmea nas trilhas de coleta foi de 1:3, com a predominância de indivíduos fêmeas, fato também observado por Domingos *et al.* (1998) no Estado de São Paulo para *Ny. intermedia sensu lato* em coletas realizadas em áreas de mata. Já no peridomicílio a predominância de fêmeas foi ainda maior (razão macho/fêmea= 1:8,5), fato que contrapõe aos achados por Domingos *et al.* (1998) que obtiveram uma razão macho/fêmea equivalente a 1,5:1,0 com pequena predominância de machos desta espécie no peridomicílio e Alves (2007) em estudo realizado no

Estado do Rio de Janeiro que encontrou uma proporção de machos cerca de dezessete vezes maior do que fêmeas no peridomicílio.

A razão macho/fêmea das espécies mais frequentes na trilha 3 (ambiente rochoso) foi bastante diversificada. Espécies como *Ev. spelunca* (razão = 1:4,2), *Lu. cavernicola* (razão = 1:65,4) e *Mt. minasensis* (razão = 1:3,75) tiveram ao final do estudo o número de fêmeas bastante superior ao número de machos, enquanto que para *Mi. peresi* a razão encontrou-se muito próxima a 1:1 e em *Lu. renei* (razão = 3,83:1) o número de machos foi bastante superior. Se de fato o método de coleta estiver refletindo a dinâmica das populações, pode-se pensar que haja atração diferenciada para ambos os sexos em relação a atração ou ainda ao local de coleta. Tendo em vista estes aspectos, pode-se sugerir que fêmeas que se criam fora da gruta, podem utilizar este ambiente como abrigo e ovoposição ou ainda pode ocorrer a saída de machos, para busca de parceiras fora deste ecótopo. Porém também é importante ressaltar que é comum os machos acompanharem as fêmeas aos locais de repasto, fato que pode explicar razões sexuais equivalentes (Chaniotis *et al.*, 1971; Shaw & Lainson, 1972; Zelédon *et al.*, 1984; Navin *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 1986; Galati *et al.*, 2003).

A interferência de fatores climáticos sobre a população de flebotomíneos tem sido estudada por diversos autores. De acordo com a literatura, variáveis como temperatura, umidade e pluviosidade, podem influenciar de modo variável a população de flebotomíneos, dependendo da região analisada. Rutledge & Ellenwood (1975) sugerem que a sazonalidade dos flebotomíneos está relacionada com os padrões de distribuição das chuvas que agem modificando as condições dos criadouros no solo. Comumente, estes insetos são encontrados em altas densidades durante os meses quentes e úmidos (Aguiar, 1984; Gomes & Galati 1987; Gomes *et al.*, 1980; Salomón *et al.*, 2002, 2003) ou em meses mais secos, como observado por Zelédon e colaboradores (1984) em área da Costa Rica e Galati *et al.* 1996 no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.

Barata *et al.*, em 2004 mostraram a interferência de fatores climáticos sobre a densidade populacional de flebotomíneos no município de Porteirinha (Minas Gerais, Brasil), indicando uma correlação significativa entre o número de flebotomíneos capturados e a pluviosidade e umidade. Neste mesmo estudo não foi observado efeito significativo da temperatura sobre a dinâmica destes insetos na região, fato

também relatado por Feliciangeli (1987) a respeito de algumas espécies de flebotomíneos em um foco endêmico de leishmaniose cutânea na Venezuela.

Em nosso estudo não foi encontrada correlação entre a densidade de flebotomíneos e a temperatura, possivelmente devido à baixa variação desta durante o período estudado. Outro aspecto a ser considerado é que o tempo de estudo (um ano de coleta para cada ambiente) pode não ter sido suficiente para avaliar com precisão as mudanças climáticas no local de estudos. Este encontro corrobora os achados de Barata *et al.* 2004, em estudo realizado no norte do Estado de Minas Gerais, no qual a temperatura média durante o período de estudos não influenciou na densidade populacional de flebotomíneos. A correlação não-significativa entre a densidade de insetos e as variáveis bioclimáticas também foi observada por Souza *et al.* (2004) em Belo Horizonte, e Rebelo (2001b) em São Luís, Estado do Maranhão. Entretanto, em nosso estudo foi possível verificar a predominância de flebotomíneos na estação chuvosa nas trilhas de coleta ($F_{1,36}=4,7571$; $p=0,03579$) todavia no ambiente peridomiciliar esta correlação não foi significativa. Dados como estes, vem sendo observados em diferentes estados brasileiros como, Minas Gerais (Barata *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2005), Rio Grande do Norte (Ximenes *et al.*, 2006), Mato Grosso (Missawa & Dias, 2007), Mato Grosso do Sul (Galati *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008), Rio de Janeiro (Souza *et al.*, 2005) e Ceará (Deane, 1956) e Bahia (Sherlok & Guilton, 1969).

Ximenes *et al.*, (2006) em estudo realizado no Rio Grande do Norte, verificou picos de ocorrência para *Lu. longipalpis* nos meses quentes e chuvosos. Nas análises de correlação da densidade com os parâmetros climáticos os machos apresentaram correlação significativa apenas com a umidade relativa do ar e as fêmeas com todos os parâmetros avaliados. Sherlock (1996) em estudo realizado na Bahia relata a maior ocorrência de *Lu. longipalpis* nos meses mais chuvosos do ano, tanto os mais quentes, como os mais frios. Em nossas coletas, *Lu. longipalpis* foi amostrado em todos os meses no peridomicílio das casas porém, nos meses de setembro e novembro esta espécie teve maior predominância neste ambiente. Além de terem sido os meses cuja temperatura se mostrou mais elevada estes corresponderam ao período chuvoso, corroborando com os achados de vários estudos (Resende *et al.*, 2006; Monteiro *et al.* 2005, Barata *et al.* 2004 e Oliveira *et al.* 2003) que relataram um aumento do número de flebotomíneos,

principalmente *Lu. longipalpis*, quando a combinação de altas temperaturas e períodos de chuva regulares ocorreu.

Os habitat naturais dos flebotomíneos caracterizam-se por possuírem uma pequena variação na temperatura e umidade já que os mesmos são muito sensíveis à dessecação. Uma pequena variação dos fatores climáticos nos microhabitat é suficiente para alterar a dinâmica das populações de flebotomíneos (Dias *et al.*, 2007). Esta característica pode explicar a maior densidade de flebotomíneos coletada na trilha 3 cujo afloramento rochoso mantém a temperatura e umidade relativamente estáveis, enquanto as áreas de mata e transição sofrem constantes modificações climáticas e conseqüentemente alterações ambientais ao longo do ano, como por exemplo nos meses secos, cuja redução das chuvas acarreta uma diminuição drástica da cobertura vegetal, característica das áreas de mata estacional decidual (Figura 8).

6.2 Infecção natural de flebotomíneos

As técnicas de biologia molecular contribuem significativamente para a correta identificação das espécies de *Leishmania* que ocorrem nos vetores, pois as reações de PCR são métodos mais específicos e sensíveis quando comparados à dissecação individual. O uso da PCR em estudos de infecção natural é crescente, e padronizações de variações da técnica têm sido desenvolvidas para serem utilizadas com esta finalidade (Paiva *et al.*, 2007). As técnicas baseadas na PCR que identificam parasitos do gênero *Leishmania*, além de serem mais sensíveis e específicas (Schonian *et al.*, 2003; Manna *et al.*, 2004; Galati *et al.*, 2006) que as técnicas de dissecação e procura dos flagelados ao microscópio óptico, permitem a diferenciação entre os complexos ou mesmo espécies de flagelados que os flebotomíneos podem albergar em seu intestino de forma mais rápida e eficiente (Pérez *et al.*, 1994; Jorquera *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2005, Nascimento *et al.*, 2007, Paiva *et al.*, 2007 e Carvalho *et al.* 2008).

Neste estudo, utilizamos apenas o tórax e o abdômen sem a terminália no processo de extração de DNA e as taxas de infecção natural foram calculadas segundo o critério de taxa mínima de infecção, quando se tratava de *pools* de espécimes de uma mesma espécie. Atualmente estes dois passos metodológicos

estão se consagrando como os melhores para este tipo de estudo (Paiva *et al.*, 2007; Pita-Pereira *et al.*, 2005).

A taxa de infecção no peridomicílio (4,1%) foi mais alta do que a observada nas trilhas de coleta (1,1%) e este fato pode ser explicado pela utilização do alvo molecular em questão, visto que a técnica de *Nested* PCR dirigida ao alvo SSUrRNA tem se mostrado mais sensível quando comparada a técnica de PCR dirigida ao alvo *its1* (Schonian *et al.*, 2003). Um dos fatores que pode explicar este encontro é que as espécies *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, vetoras comprovadas de *Leishmania*, ocorreram em altas taxas no peridomicílio contrastando com as trilhas onde estas espécies contribuíram com 1,4% e 3%, respectivamente, do total de exemplares coletados. Deve ser ressaltado que as coletas no peridomicílio e nas trilhas foram realizadas em épocas diferentes o que pode também influenciar nas taxas de infecção dos flebotomíneos.

De acordo com relatos na literatura as taxas de infecção natural dos flebotomíneos nos focos endêmicos variam em torno de 0,2% (Rodriguez *et al.*, 1999; Luz *et al.*, 2000). Porém outros estudos relatam taxas de infecção bem mais elevadas como Silva *et al.* (2008) que encontraram uma taxa de infecção de 1,9% e Pita-Pereira *et al.* (2005) que observaram uma taxa de 2,0% em estudos realizados no Rio de Janeiro. Estas diferenças observadas nas taxas de infecção podem ser explicadas considerando vários aspectos. Um deles está relacionado aos índices de sensibilidade, que podem ser diferentes, para cada um dos alvos utilizados na detecção do DNA de *Leishmania* nestes estudos. Outra questão importante e que ultimamente vem sendo muito explorada é a diversidade genética observada nas populações de flebotomíneos. Utilizando o gene mitocondrial ND4 foi observada uma marcada variabilidade genética em populações de *Lu. longipalpis* provenientes de regiões geográficas diferentes e que pode se refletir na capacidade vetorial das populações (Soto *et al.*, 2001).

A técnica de PCR-RFLP, com digestão de produto amplificado a partir de PCR gênero específica, utilizando a enzima de restrição *HaeIII*, para diferenciação de *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. amazonensis* e *Le. infantum*, desde a sua padronização por Schönian (2003), tem sido usada com sucesso para identificação de amostras clínicas provenientes de hospedeiros e reservatórios silvestres, sinantrópicos e domésticos, como por exemplo, para identificação de *Leishmania* em

infecções caninas e detecção de infecção natural em flebotomíneos (Dweik *et al.*, 2007; Quaresma *et al.*, 2012).

A correta identificação das espécies de *Leishmania* em uma área endêmica é fundamental para a compreensão da epidemiologia da doença e para a implementação das medidas adequadas de prevenção e controle desta protozoose (Michalsky *et al.*, 2002).

No peridomicílio das casas situadas ao longo da aldeia Imbaúbas foram registradas seis espécies de flebotomíneos carreando DNA de *Leishmania*, sendo elas: *Evandromyia lenti*, *Lutzomyia ischnacantha*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia renei*, *Micropygomyia goiana* e *Nyssomyia intermedia* enquanto nas trilhas de coleta foram encontradas cinco espécies de flebotomíneos naturalmente infectadas: *Evandromyia lenti*, *Martinsmyia minasensis*, *Micropygomyia peresi*, *Mi. capixaba* e *Nyssomyia intermedia*. Somados os dois ambientes, um total de nove espécies foram encontradas associadas ao DNA do parasito, o que corresponde a 32,1% do total de espécies coletadas durante o período de estudos.

O encontro de *Ev. lenti* infectada por *Le. infantum* tanto no peridomicílio quanto nas trilhas não condiz com relato de Brazil *et al.* (1997), no qual foi possível demonstrar o papel refratário desta espécie para *Leishmania*, todavia Margonari *et al.* (2010) e Paiva *et al.* (2010) já relataram o encontro de *Leishmania braziliensis* em *Ev. lenti* utilizando técnicas moleculares. Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, esta espécie estava intimamente associada ao peridomicílio (Oliveira *et al.*, 2003) e com abrigos de animais domésticos em zonas rurais (Galati *et al.*, 1996). Este comportamento também foi observado em nosso estudo. Além disso, a associação significativa entre este flebotomíneo e casos de LT no estado de Goiás foi encontrada (Martins *et al.*, 2002). Vale lembrar que Mayrink *et al.*, (1979) dissecaram 50 fêmeas de *Ev. lenti*, sendo que em nenhuma delas foram encontrados flagelados, entretanto Sherlock (1957) e Sherlock & Miranda (1992) relataram o encontro de infecção natural desta espécie por promastigotas. Pinto (2012) em estudo realizado no estado do Espírito Santo, correlacionou o encontro de *Ev. lenti* a presença de *Lu. longipalpis*, de modo que estas espécies compartilham os mesmos habitat, entretanto, Em estudo realizado no município de Timóteo, Minas Gerais, por Andrade-Filho *et al.* (1997) indicou a presença de *Ev. lenti*, enquanto *Lu. longipalpis* não foi encontrado. No entanto, a Souza & Borges (2008), mais recentemente no

mesmo local de estudos, indicou a presença de *Lu. longipalpis* em baixa abundância.

Durante as coletas realizadas na Terra Indígena Xakriabá, foi possível verificar a infecção natural em três espécies do gênero *Lutzomyia*, sendo elas: *Lutzomyia ischnacantha*, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia renei*. O encontro deste gênero naturalmente infectado por *Leishmania* é comumente reportado no Brasil. Savani *et al.* (2009) relatam a infecção de *Lutzomyia almerioi* por *Le. infantum* no Mato Grosso do Sul, Pita-Pereira *et al.* (2008) e Missawa *et al.* (2011) relatam o encontro de *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia forattinii* por *Le. infantum* no mesmo estado. Entretanto, os relatos em torno deste gênero são em sua maioria referentes a *Lutzomyia longipalpis*: Nascimento *et al.* (2007), Saraiva *et al.* (2010) e Michalsky *et al.* (2011) relatam a infecção desta espécie por *Le. infantum* nos estados do Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, Paiva *et al.* (2010) relatam a infecção por *Le. braziliensis* e Savani *et al.* (2008) relatam a infecção por *Le. amazonensis*.

Neste estudo *Lu. longipalpis* foi encontrada albergando DNA de *Leishmania infantum* como também de uma espécie pertencente ao subgênero *Viannia*. Estes achados reforçam os inúmeros relatos da importância epidemiológica desta espécie principalmente na transmissão de *Le. infantum* no Brasil (Deane, 1956; Killick-Kendrick, 1990; Lainson & Shaw 1979, 1998). Por sua vez, o achado desta espécie de flebotomíneo com parasitos do subgênero *Viannia* corroboram os achados de Paiva *et al.* (2010). Porém, estes achados não são suficientes para incriminar este flebotomíneo como vetora de espécies de *Leishmania* causadoras das formas tegumentares apesar de vários estudos com infecções experimentais mostrarem a alta suscetibilidade de *Lu. longipalpis* a diferentes espécies de *Leishmania* (da Silva *et al.*, 1990; Gontijo *et al.*, 1995; Barbosa *et al.*, 2006) independentemente de sua capacidade vetorial para estas espécies.

Com relação a *Lutzomyia renei* e *Lutzomyia ischnacantha* não existem relatos destas espécies associadas aos parasitos do gênero *Leishmania*, porém sabe-se que as espécies deste gênero são em sua maioria atraídas por uma diversidade de hospedeiros e possuem habitats variados que vão desde o ambiente peridoméstico e tocas de animais domésticos a abrigos naturais como: tronco de árvores, fendas em rochas ou espaço sobre pedras, grutas, folhagem de arbustos e até mesmo no solo sombreado e revestido de folhas (Deane, 1957). Os encontros de *Lu. renei* com *Leishmania guyanensis* e *Leishmania (Viannia) sp.* e *Lutzomyia ischnacantha* com

Le. infantum na Terra Xakriabá podem ser ocasionais sem importância epidemiológica ou estar associados a transmissão dos parasitos a hospedeiros silvestres, sinantrópicos e domésticos, conforme relata Quaresma *et al.*, (2011) em estudo realizado na área. Para uma melhor definição do papel destas espécies de flebotomíneos no contexto da transmissão das leishmanioses na área são necessários estudos complementares.

A espécie *Martinsmyia minasensis* cujo hábito alimentar pode estar intimamente relacionado a roedores foi encontrada naturalmente infectada por três espécies de *Leishmania*, sendo *Le. guyanensis* a mais frequente, seguida de *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis* nas mesmas proporções. O achado de *Leishmania guyanensis* na mesma área de estudos foi relatado por Quaresma *et al.* (2011) em roedores da espécie *Thrichomys apereoides* e marsupiais da espécie *Marmosops incanus*. Portanto o papel ecológico desta espécie, bem como das espécies do gênero *Martinsmyia* em geral, merece ser estudado a fim de elucidar o verdadeiro papel destas espécies em ciclos silvestres e peridomésticos, e possivelmente sua atração a humanos. O achado da infecção desta espécie de flebotomíneo por *Leishmania braziliensis* também pode estar relacionada ao encontro de roedores com este parasito na mesma área de estudos (Quaresma *et al.*, 2011). Embora o achado de *Le. amazonensis* na Terra Xakriabá jamais tenha sido relatado anteriormente e a infecção humana por esta espécie de parasito não seja considerada frequente, a mesma tem sido identificada nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil (Dias *et al.*, 2011; Dorval *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 1999; Ashford, 2000; Grimaldi Jr. *et al.* 1989; Grisard *et al.*, 2000; Lainson *et al.*, 1985; Lainson & Shaw, 1987 e Passos *et al.*, 1999). Ainda a respeito de *Le. amazonensis*, vale ressaltar que durante o período de estudos, não foi identificado nenhum exemplar de *Bichromomyia flaviscutellata*, espécie considerada vetora deste parasito principalmente na região norte do Brasil (Arias *et al.*, 1985; Ryan *et al.*, 1987; Lainson & Shaw, 1968; Ward *et al.*, 1973).

O encontro de espécies do gênero *Micropygomyia* naturalmente infectadas por *Leishmania* certamente não corresponde aos registros ecológicos deste grupo, que de acordo com Young e Duncan (1994), Deane & Deane (1957) e Andrade Filho & Brazil (2009) parecem estar associadas à animais de sangue frio principalmente lagartos, devido a morfologia do labroepifaringe curto, impossibilitando ou dificultando a laceração em tecidos mais espessos e, conseqüentemente, impedindo

o acesso sanguíneo. Esta associação com espécies de Lacertidae por sua vez, pode possibilitar infecções com tripanossomatídeos encontrados neste grupo. Infecções com formas flageladas já foram registradas na Venezuela em *Mi. atroclavata* (Aguilar *et al.*, 1984; Feliciangeli, 1987; Añez *et al.*, 1994), *Mi. venezuelensis* (Añez *et al.*, 1994) e *Mi. cayennensis* (Feliciangeli, 1987). Deane *et al.* (1978) também registraram infecções com formas flageladas em *Mi. cayennensis* capturado perto de uma caverna de morcegos. No Brasil, *Micropygomyia ferreirana* e *Micropygomyia quinquefer* já foram relatadas nos estados do Espírito Santo e Mato Grosso, respectivamente, infectadas naturalmente por *Leishmania braziliensis* através de métodos moleculares (Rocha *et al.*, 2010, Paiva *et al.* 2010). Vale ressaltar que *Mi. peresi*, aqui encontrada naturalmente infectada por *Le. braziliensis* e *Le. infantum* é uma espécie cujo hábito troglófilo já foi reportado por Galati *et al.* (1997). Porém, *Mi. goiana* encontrada infectada por *Le. guyanensis* no ambiente peridomiciliar vai de encontro com os hábitos ecológicos desta espécie, visto que apesar de poucos relatos seus hábitos parecem ser semelhantes aos demais representantes do grupo. O encontro de *Mi. peresi* em todas as trilhas de coleta e de *Mi. goiana* registrada no peridomicílio pode estar associado a presença de diversas espécies das Família Lacertidae, Tropicuridae e Teiidae, onde os principais representantes são as lagartixas, lagartos e teiús (observações pessoais). O encontro de DNA de *Leishmania* pressupõe que estes flebotomíneos tenham se alimentado em hospedeiros susceptíveis a infecção, fato até então desconhecido neste grupo de animais de sangue frio no Brasil. Vale ressaltar que nenhuma espécie deste gênero já foi relatada se alimentando em humanos (Feliciangeli, 1990).

Com relação a *Nyssomyia intermedia* foi possível verificar a presença de DNA de *Leishmania braziliensis* em quatro amostras (duas provenientes das trilhas e duas do peridomicílio), *Leishmania infantum* em duas amostras (uma proveniente do peridomicílio) e *Leishmania amazonensis* em uma amostra proveniente do peridomicílio. O achado de *Leishmania braziliensis* reforça o papel desta espécie como vetora da LT, já que em Minas Gerais ela é prevalente ou bastante abundante em área de transmissão (Andrade Filho *et al.*, 2007). Vale ressaltar que esta espécie foi predominante em áreas de mata, com alterações ambientais causadas pelo homem, próximas a domicílios. Este encontro corrobora os achados de Gontijo *et al.*, (2002) em trabalho realizado durante um surto de LT no Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, onde os autores descreveram a prevalência de *Ny. intermedia* na região, bem como sua preferência por ambientes com maior grau de modificação

antrópica. Um resultado semelhante foi relatado em Alto Caparaó e Caparaó (Saraiva *et al.*, 2006) e no Parque Nacional Cavernas do Peruaçu (Barata *et al.*, 2008) onde esta espécie foi implicada como vetor potencial.

O achado de infecção natural de *Ny. intermedia* por *Le. infantum* foi reportado por Sanguinette e colaboradores (dados não publicados) em estudo realizado no município de Várzea da Palma, Minas Gerais. Baseado no alto grau de antropofilia relatado por diversos autores (Araújo Filho, 1979; Rangel *et al.*, 1986; 1990; Forattini, 1973) e na distribuição espacial desta espécie, muito se especula sobre o possível papel desta e outras espécies de flebotomíneos na transmissão de *Le. infantum*. Oliveira *et al.*, (1958) relataram em um estudo realizado em uma aldeia em Minas Gerais, a ausência de *Lu. longipalpis* onde havia uma elevada incidência de LV. Este fato, fez com que os autores suspeitassem principalmente de *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* como vetores potenciais na transmissão de *Le. infantum*. Coelho *et al.* (1965) também não capturaram *Lu. longipalpis* em um foco da doença em Goiás, onde os flebotomíneos mais frequentes foram *Ny. intermedia*, *Ny. whitmani*, *Pa. shannoni* e *Psychodopygus davisii*. Além disso, *Ny. intermedia* compartilha habitat com características similares ao de *Lu. longipalpis*, e tem sido experimentalmente infectada com *Le. infantum* (Chagas, 1940; Paraense & Chagas, 1940). Recentemente *Ny. intermedia* foi encontrada naturalmente infectada por esta espécie de *Leishmania* na cidade de Belo Horizonte (Saraiva *et al.*, 2010). O encontro desta espécie de flebotomíneos infectadas naturalmente por *Le. infantum* pode ser ocasional no local de estudos visto que a presença do vetor desta espécie de parasito (*Lu. longipalpis*) é comumente reportada, principalmente no ambiente peridoméstico.

O encontro de *Ny. intermedia* albergando DNA de *Le. amazonensis* foi reportado por Paiva *et al.*, (2007) em um estudo experimental. Apesar disso, pouco se sabe sobre a capacidade vetorial deste flebotomíneo para este parasito em ambientes naturais.

Duas das três amostras positivas para *Leishmania infantum* provenientes das espécies *Ny. intermedia* e *Mi. peresi* capturados nas trilhas apresentaram um perfil de restrição com uma pequena variação quando comparados ao perfil obtido com a amostras de referência desta mesma espécie. Este fato pode estar relacionado ao tamanho do fragmento amplificado que pode variar de 300-350pb de acordo com

Schonian *et al.*(2003). O encontro do perfil semelhante ao controle foi relatado apenas em *Ev. lenti* o que pode sugerir a existência de diferentes populações deste parasito circulante na área, porém faz-se necessária a realização de mais estudos que confirmem este fato. Quaresma *et al.* (dados não publicados) relataram a presença de duas populações diferentes de *Le. braziliensis* no local de estudos, e que esta variabilidade genética dos parasitos estava relacionada a características clínicas da LT.

Segundo Killick-Kendrick (1988), para se confirmar uma espécie de flebotomíneo como vetora é preciso obedecer a cinco critérios: 1) a espécie deve ser abundante no foco de leishmaniose, 2) ser altamente antropofílica, 3) suportar o desenvolvimento dos parasitos na ausência de sangue no tubo digestório, 4) mostrar a mais alta taxa de infecção natural dentre os flebotomíneos observados e 5) o parasito isolado do flebotomíneo deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos. Porém, vale ressaltar que estes critérios, são de difícil demonstração prática e não fazem referência a possíveis espécies cuja participação pode estar restrita a ambientes silvestres. Recentemente Ready (2013) propôs uma atualização na incriminação de vetores acrescentando dois novos critérios que envolvem modelagem matemática. São eles: Demonstrar que o flebotomíneo é essencial para manter a transmissão com ou sem a participação de outros vetores e demonstrar que a incidência da doença diminui significativamente com uma redução na densidade de flebotomíneo específico.

Encontramos na aldeia Imbaúbas espécies infectadas naturalmente que são reconhecidas como vetores das leishmanioses, bem como espécies que não são consideradas vetoras ou que ainda não tiveram seu papel epidemiológico investigado. Ressaltamos que estes insetos provavelmente alimentaram-se em hospedeiros susceptíveis e por sua vez infectados e, embora possam ser parte da cadeia de transmissão da infecção, isso não significa que elas sejam capazes de transmitir o parasito aos seres humanos.

Os achados entomológicos relatados neste estudo, dentre eles a diversidade flebotomínica e o encontro de quatro diferentes espécies de *Leishmania* podem estar intimamente relacionados ao ambiente em que se encontra a Terra Indígena Xakriabá: uma área de transição entre cerrado e caatinga, mas com a predominância de áreas típicas de cerrado. Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo,

abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas e cerca de 199 espécies de mamíferos são conhecidas. Existe uma grande diversidade de habitats, que determinam uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias. A influência climática com períodos que variam desde seca intensa a chuva intermitente certamente contribui para a biodiversidade local.

6.3 A infecção por *Leishmania* em flebotomíneos e nos hospedeiros vertebrados na Terra Indígena Xakriabá

Os primeiros registros de casos de LTA na Terra Indígena Xakriabá datam de 2001. Entretanto, relatos de indígenas sugerem que a ocorrência desta parasitose é bem anterior a este período (Freire, 2011). As condições ambientais e de vida da população associadas à falta de medidas preventivas e de controle favorecem a transmissão da LTA na região. Os estudos epidemiológicos realizados anteriormente por nosso grupo na Terra Xakriabá mostraram uma alta prevalência de casos clínicos (8,6%) e de assintomáticos (19,2%) na aldeia Imbaúbas. Além disso, foram registrados casos nos cinco pólos existentes na Terra Xakriabá sendo que a maior concentração dos casos diagnosticados (85,4%) ocorreu nos pólos Itapicuru e Brejo do Mata Fome, onde está localizada a aldeia Imbaúbas (Freire, 2011). Estes achados indicam que a área estudada é de alta transmissão, sendo um ambiente propício ao contato homem/vetor.

Um fator que limita o entendimento da epidemiologia da LTA é o conhecimento escasso em relação aos reservatórios e aos hábitos ecológicos dos flebotomíneos em diferentes regiões endêmicas. A diversidade de espécies de *Leishmania* e de flebotomíneos vetores leva a uma grande variedade de hospedeiros vertebrados infectados, originando diferentes padrões epidemiológicos no Brasil. A presença de um número significativo de roedores e marsupiais infectados por *Le. braziliensis* na área de estudos (Quaresma *et al.* 2011) corrobora com essa alta taxa de transmissão e sugere que estes animais sejam importantes na manutenção do parasito nesta área. Além disso, estes mamíferos parecem também ter um papel na manutenção de outras espécies de *Leishmania* encontradas na área. O encontro de hospedeiros silvestres, sinantrópicos e domésticos infectados por *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensis*, além da presença de

flebotomíneos infectados com as mesmas espécies de *Leishmania* indicam a coexistência de ciclos estabelecidos destas três espécies na região. Este fato se torna evidente quando se analisa a presença de *hotspots* gerados através do estimador de densidade não paramétrico de Kernel em áreas semelhantes tanto para a presença de flebotomíneos quanto de hospedeiros silvestres e sinantrópicos (Figura 38). Além disso, o convívio estreito da população Xakriabá com os hospedeiros mamíferos infectados por *Le. infantum* enfatiza a possibilidade de ocorrência de casos humanos de LV, visto que além da presença em abundância da espécie vetora *Lu. longipalpis* principalmente no ambiente peridomiciliar, casos de LV estão sendo reportados na Terra Indígena.

A presença de animais domésticos em áreas endêmicas das Leishmanioses é comumente associada a fatores de risco para estes agravos (Reithinger & Davies, 1999; Reithinger *et al.*, 2003; Sosa-Estani *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 1994).

Até o momento, estudos de caso-controle têm sido inconsistentes em mostrar uma associação entre a presença do cão e o risco transmissão de LTA entre os humanos. Uma das razões deve-se ao fato de que apesar dos numerosos estudos sobre as taxas de infecção por espécies dermatrópicas de *Leishmania* em cães, estas informações em conjunto com os dados relacionados a doença humana disponíveis para análise são escassos (Reithinger & Davies, 1999). Em áreas de LTA, tem se tornado comum encontrar cães infectados (Santos *et al.*, 2003), sugerindo que eles possam atuar como reservatórios de *Leishmania*. Evidências circunstanciais sugerindo que os cães sejam reservatórios de espécies de *Leishmania* causadoras de LTA foram baseadas no fato de que as cepas isoladas de humanos e de cães são idênticas (Reithinger and Davies, 1999). No Brasil, infecções naturais de cães domésticos por *Le. braziliensis* têm sido documentadas em focos de LTA localizados em áreas rurais (Gontijo *et al.*, 2002) e peri-urbanas (Falqueto *et al.*, 1985; Massunari *et al.*, 2009).

No estudo de Reithinger *et al.*, 2003 foi possível demonstrar a importância epidemiológica no tamanho da população de cães como fator de risco para a LTA em humanos, admitindo, neste caso, que os cães atuem como prováveis reservatórios. Desta forma foi possível constatar que o risco de LTA humana aumentou com a presença de cães no domicílio. Com relação a LV, vale ressaltar que a presença dos cães no ambiente peridoméstico pode aumentar o risco de exposição aos flebotomíneos, principalmente *Lu. longipalpis* (espécie mais

abundante neste estudo nas coletas realizadas no peridomicílio). Vários estudos têm apontado a existência de correlação entre o número de casos caninos de LV e a ocorrência de casos humanos (Deane, 1956; Evans, 1990; Nunes *et al.*, 2010; Vieira & Coelho, 1998; Monteiro *et al.*, 2005). No estudo de Ashford *et al.* (1998) em Jacobina, Bahia, foi possível constatar que a remoção de cães soropositivos foi associada a uma diminuição na incidência de leishmaniose visceral canina, embora a transmissão não tenha sido eliminada. Além disso, houve uma redução significativa na incidência de casos humanos de leishmaniose visceral na área de intervenção. Em nosso estudo foi possível verificar a presença de *hotspots* coincidentes entre os achados de infecção canina por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* e os relatos de casos humanos de LTA, reforçando a importância epidemiológica da presença de cães para o estabelecimento e manutenção de diferentes espécies do parasito.

Com base nos encontros de infecção natural em flebotomíneos relatados neste trabalho, nos achados de infecção natural de diversos hospedeiros vertebrados por *Le. braziliensis* e *Le. infantum* (Quaresma *et al.*, 2011) e nos registros de casos humanos de LTA e LV, tornou-se possível sugerir os componentes do ciclo doméstico, sinantrópico e silvestre destas espécies de *Leishmania*.

Com relação ao ciclo da *Leishmania braziliensis* (Figura 39), no ambiente peridoméstico o marsupial *Didelphis albiventris* e o cão doméstico aparecem como hospedeiros/reservatórios e a espécie de flebotomíneo *Nyssomyia intermedia* como espécie vetora. Já no ambiente silvestre, o roedor *Thrichomys apereoides* e o marsupial *Gracilinanus agilis* aparecem como hospedeiros e as espécies *Ny. intermedia* e *Mt. minasensis* como espécies vetoras do mesmo parasito. Provavelmente a transmissão para o homem ocorra tanto no ambiente peridoméstico quanto no silvestre considerando os hábitos da população de contato constante com a mata e com as áreas rochosas. O número de casos registrados é alto além de ocorrer nas diferentes faixas etárias. A presença de *Ny. intermedia* infectada nos diferentes ecótopos reforça esta hipótese.

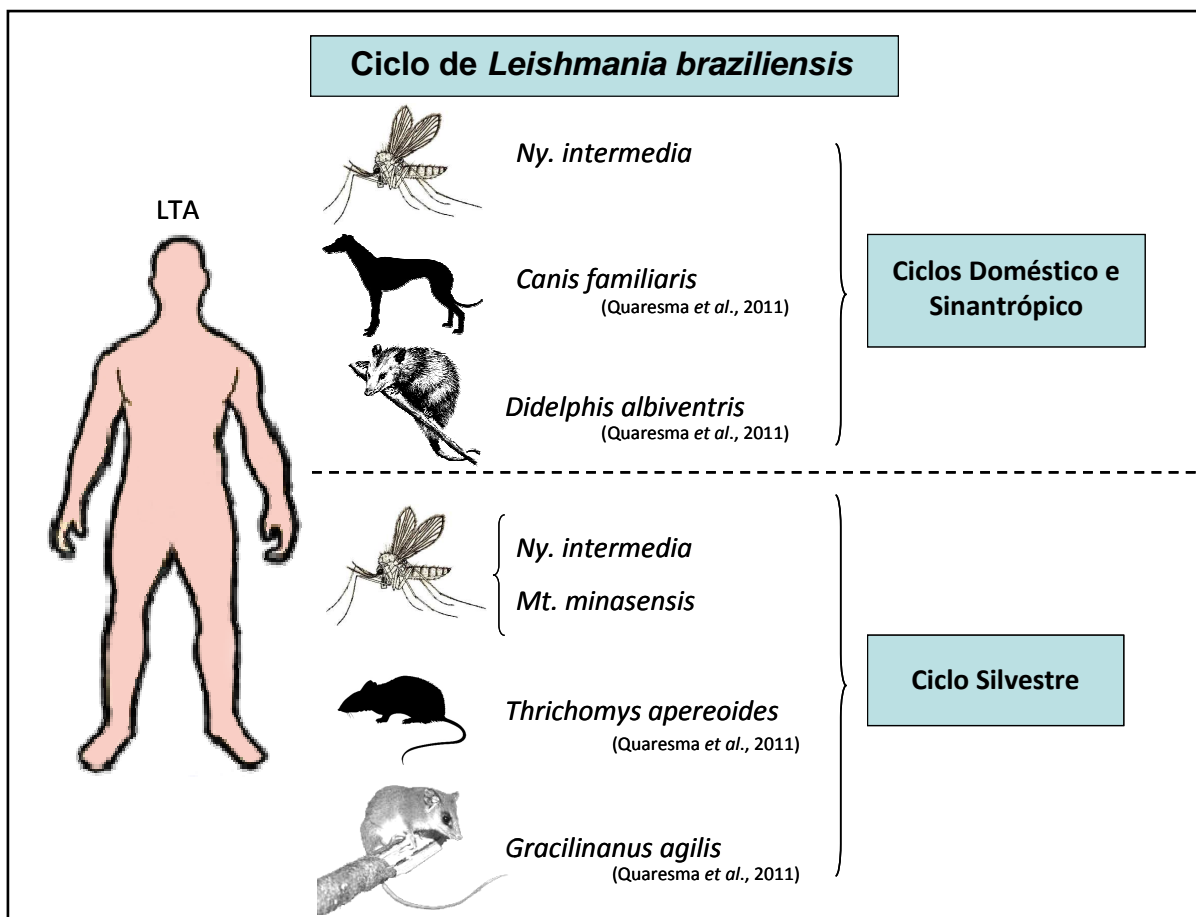


Figura 41: Ciclo da Leishmaniose Tegumentar Americana por *Leishmania braziliensis* na Aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

Por sua vez, o ciclo de *Leishmania infantum* (Figura 40) no ambiente peridoméstico o cão e o roedor *Rattus rattus* aparecem como hospedeiros e as espécies *Lu. longipalpis* e *Ev. lenti* como vetoras enquanto no ambiente silvestre os hospedeiros são os roedores das espécies *Rhipidomys mastacalis* e *Thrichomys apereoides* e os vetores, flebotomíneos das espécies *Ny. intermedia* e *Ev. lenti*. No caso da leishmaniose visceral sugerimos que a transmissão possivelmente está ocorrendo no ambiente doméstico pois o número de casos é escasso, somente ocorreram em crianças e a *Lu. longipalpis* foi registrada infectada e em abundância apenas neste ambiente.

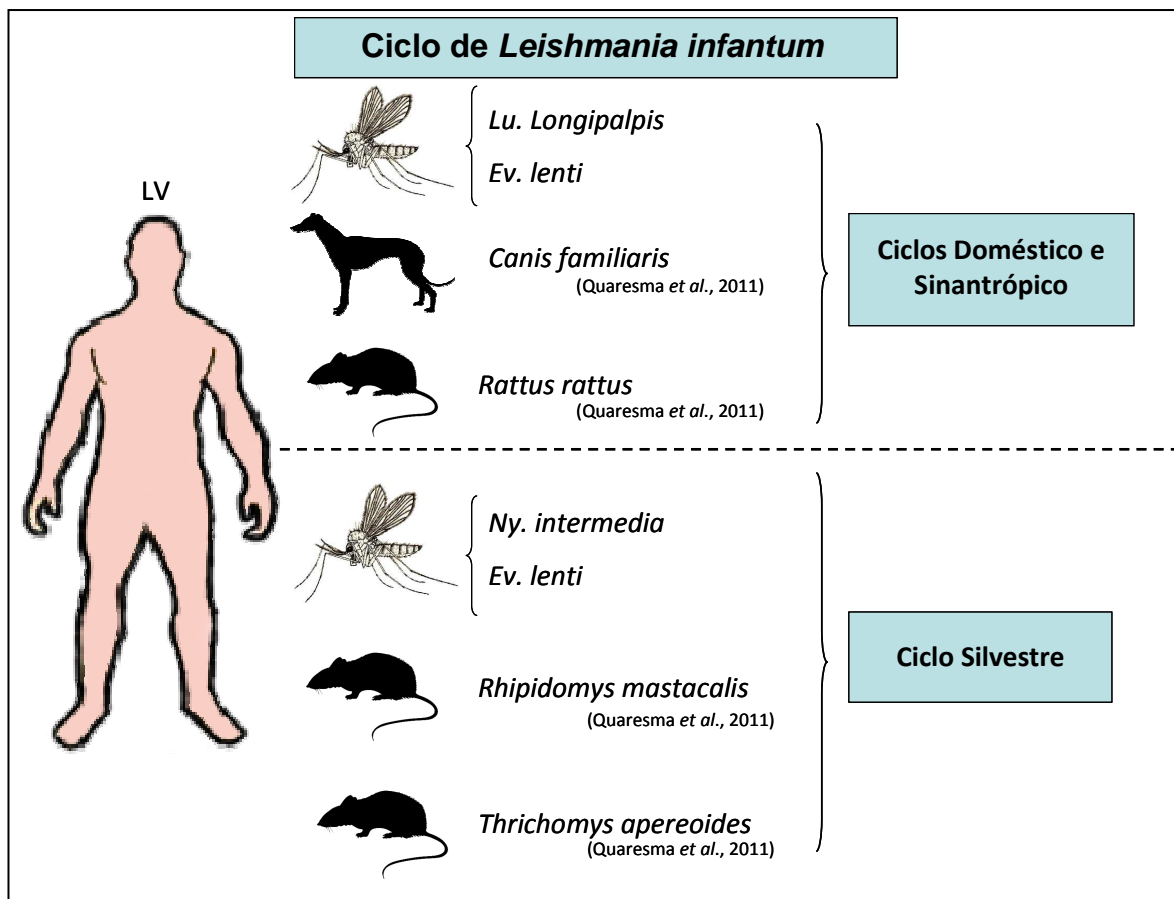


Figura 42: Ciclo da Leishmaniose Visceral por *Leishmania infantum* na Aldeia Imbaúbas, Terra Indígena Xakriabá, MG.

A análise integrada dos resultados obtidos neste estudo e nos estudos anteriormente realizados na Terra Indígena Xakriabá poderá auxiliar na escolha de medidas de prevenção e controle da transmissão das leishmanioses, visto que foi possível identificar a presença de espécies de flebotomíneos vetoras nos ambientes doméstico e silvestre, e correlacionar estes achados aos hábitos ecológicos e de infecção natural em diferentes hospedeiros vertebrados e aos registros de casos humanos.

7 CONCLUSÕES

1- A fauna flebotomínica da aldeia Imbaúbas, localizada na Terra Indígena Xakriabá, município de São João das Missões/MG, apresentou vinte e oito espécies pertencentes a onze gêneros.

2- As trilhas de coletas apresentaram uma maior densidade de flebotomíneos quando comparada ao peridomicílio.

3- As espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia intermedia*, importantes vetoras de LV e LTA respectivamente foram as espécies mais abundantes no peridomicílio das casas.

4- As espécies *Martinsmyia minasensis* e *Lutzomyia cavernicola* foram as espécies mais abundantes das trilhas de coleta.

5- Nenhum fator climático analisado apresentou correlação positiva com a densidade de flebotomíneos coletados, porém houve uma diferença significativa com relação a densidade de flebotomíneos coletados na estação chuvosa (trilhas) e com relação a riqueza de espécies (peridomicílio).

6- As técnicas moleculares empregadas (*Nested* PCR dirigida ao alvo SSUrRNA e PCR dirigida ao alvo *its1*) revelaram-se exequíveis e práticas na detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos.

7- A detecção de DNA de *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) sp.* em *Lu. longipalpis* somado a abundância de espécimes capturados no peridomicílio, sugere a possível participação desta espécie principalmente com relação ao ciclo de transmissão da LV na área de estudos.

8- A detecção de DNA de três diferentes espécies de *Leishmania* (*Le. amazonensis*, *Le. infantum* e *Le. braziliensis*) em *Ny. intermedia* tanto no peridomicílio das casas quanto em regiões de mata próxima as residências, somado a abundância de espécimes capturados, sugere a participação desta espécie no ciclo de transmissão da LTA entre os indígenas, principalmente com relação a *L. braziliensis*.

9- O encontro de *Mt. minasensis* em abundância nas trilhas de coleta associado aos achados de DNA de *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* sugerem uma

participação deste flebotomíneo em um possível ciclo silvestre, tendo em vista sua atração sugestiva a roedores.

10- A detecção de DNA de *Leishmania* em espécies do gênero *Micropygomyia* vão de encontro aos relatos da literatura científica no que diz respeito aos hábitos ecológicos deste grupo, porém o encontro do parasito sugere que estas espécies tenham se alimentado em hospedeiros susceptíveis até então desconhecidos.

11- O encontro de *Ev. lenti* associada carreando DNA de *Leishmania infantum* tanto no peridomicílio quanto nas trilhas sugere uma possível participação desta espécie no ciclo da LV em determinados hospedeiros.

12- Os resultados entomológicos aliados a identificação de *hotspots* apresentados no nosso estudo podem contribuir para um melhor entendimento e direcionamento das medidas de prevenção pelos órgãos competentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar AM & Soucasaux T. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I- Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 179-209.

Aguiar GM & Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil 2003; p.207- 255. In Rangel EF & Lainson R (org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368 pp.

Aguiar GM, Schuback PA, Vilela ML, Azevedo ACR. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. II - Distribuição vertical (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80: 187-194.

Aguiar GM, Vilela ML & Lima RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82: 583-4.

Aguilar CM, Fernandez F, de Fernandez R, Deane L. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 181-195.

Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Northern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87: 387-395.

Alexander B & Usma MC. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. Annals of Trop Med and Parasitology 1994; 88: 543-549.

Almeida PS, Nascimento JC, Ferreira AD, Minzão LD, Portes F, Miranda AM, Faccenda O, Andrade Filho JD. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Bras Entomol 2010; 54: 304–310.

Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI. Mucosal Leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 2003; 85: 39-49.

Andrade MS. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar na zona da mata de Pernambuco, Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Departamento de Saúde Coletiva. Dissertação de Mestrado 2004; 90pp.

Andrade AJ, Dantas-Torres F. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil. *Neotrop Entomol* 2010; 39: 115-123.

Andrade AJ, Galati EAB. A New Species of *Evandromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) From Minas Gerais State, Brazil. *Jour Med Entomol* 2012; 49: 445-450.

Andrade Filho JD, Brazil RP. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas State, Northeast of Brazil. *Neotrop Entomol* 2009; 38: 688-690.

Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 481-487.

Andrade Filho JD, Valente MB, Andrade WA, Brazil RP, Falcão AL. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 323-329.

Andrade Filho JD, Carneiro APS, Lima MLN, Santiago RM, Gama MA, Santos CA, Falcão AL, Brazil RP. Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Cad Saúde Pública* 1997; 13: 767-770.

Añez N, Nieves E, Carzola D, Oviedo M, Yarburgh AL, Valera M. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Merida, Venezuela. III. Altitudinal distribution, age structure, natural infection and feeding behavior of sandflies and their relation to the risk of transmission. *Annals of Trop Med and Parasitology* 1994; 88: 279-287.

Aragão HB. Transmissão da Leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brás. Méd* 1922; 36: 129-130.

Araújo Filho NA. Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar na Ilha Grande [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1979.

Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, de Freitas RA, Biancardi CB, Castellon EG. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. Am J Trop Med Hyg. 1985; 34: 1098-1108.

Arias JR. & Freitas RA. Flebotomos da Amazônia Central do Brasil. I. Resultados obtidos de capturas feitas com iscas humana e equina (Diptera, Psychodidae). Acta Amazonica 1977; 7: 507-527.

Arias JR & Freitas RA. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 3. Phlebotomine sand fly stratification in a terra firme forest. Acta Amazônica 1982; 12: 599-608.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30: 1269-1281.

Ávila-Pires FD. Zoonoses: hospedeiros e reservatórios. Caderno de saúde pública 1989; 5: 82-97.

Azevedo ACR & Rangel EF. A study of sandflies species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86: 405-410.

Azevedo ACR, Luz SLB, Vilela ML, Rangel EF. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho municipality, Rondônia state, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 88: 509-512.

Azevedo ACR, Vilela ML, Souza NA, Andrade CAC, Barbosa AF, Firmo ALS, Rangel EF. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91:75-79.

Bacha HA, Tuona FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC, Quiroga MM, Mascheretti M, Boulos M, Amato VS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011; 105: 173–178.

Barata RA, França- Silva JC, Fortes-Dias CL, Costa RT, Silva JC, Vieira EP, Prata A, Michalsky EM, Dias ES. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 481-487.

Barata RA, França da Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, de Paula KM, Dias ES. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 421-425.

Barata RA, Antonini Y, Gonçalves CM, Costa DC, Dias ES. Flebotomíneos do Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, MG. Neotrop Entomol 2008; 37: 226-228.

Barata RA, Meira PCLS, Carvalho GML. *Lutzomyia diamantinensis* sp. nov., a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae) from a quartzite cave in Diamantina, state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Osw Cruz 2012; 107: 1006-1010.

Barbosa AF, Oliveira SM, Bertho AL, Franco AM, Rangel EF. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101: 851-856.

Barbosa GMS et. al. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Cad Saúde Publica 1999; 15: 641-646.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi-Júnior G. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 536–546.

Barreto MP. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). Thesis, Faculdade de Medicina da USP. 1943; 162pp.

Barreto MP. Sobre a sistemática da subfamília Phlebotominae Rondani (Diptera, Psychodidae). Rev Bras Entomol 1955; 3: 173-190.

Barrett TV, Freitas RA, Albuquerque MIC, Guerrero JCH. Report on a collection of *Lutzomyia* sand fly (Diptera: Psychodidae) from the Middle Solimões (Amazonas, Brasil). Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 9: 27-35.

Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum D, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 488-494.

Brandão-Filho SP, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. Parasitology Today 1994; 10: 329-330.

Brandão-Filho SP, Valença HF, Almeida ÉL, Brito MEF, Almeida FA, Ishikawa E, Cupolillo E, Shaw JJ. Infecção natural de *Lutzomyia whitmani* por *Leishmania braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. In: XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém, Pará. Ver Soc Bras Med Trop 2003; 36: 396-396.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde 2000.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2ª Ed. Brasília 2007;

Brazil RP, Passos WL, Fuzari AA, Falcão AL, Andrade Filho JD. The peridomestic sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in áreas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. J Vector Ecol 2006; 31: 418-420.

Brazil RP & Brazil BG. Bionomia. In: Rangel EF, Lainson R (orgs) Flebotomíneos do Brasil. Editora da Fundação Oswaldo Cruz 2003; 257-274.

Brazil RP, Carneiro VL, Andrade Filho JD, Alves, JCM, Falcão AL. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). An Soc Entomol Brasil 1997; 26: 191-193.

Brazil RP, Almeida DC, Brazil BG, Mamede SMPO. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitol 1991; 33: 113-117.

Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spinola, RMF, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana-Araçatuba, São Paulo, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 2001; 17: 1263-1267.

Campos MB, Campos TB, Monte Mór RLMA. Questão da Demografia Indígena: o caso dos Xakriabá, no Norte de Minas. In: XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais ABEP, Caxambu. 2006;

Carreira JCA, da Silva AVM, Pita-Pereira D, Brazil RP. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. Parasit Vectors. 2012; 5: 111.

Carvalho GML, Brazil RP, Sanguinette CC, Andrade-Filho JD. Description of *Evandromyia spelunca*, a new phlebotomine species of the *cortelezzii* complex from a cave in Minas Gerais state, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Parasit Vectors 2011; 4: 158.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis 2008; 8: 407-414.

Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the Valley of the Mogi Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. Bol Dir Malariol San. Amb 1995; 35: 77-84.

Castellón EG, Araújo Filho NA, Fé NF, Alves JMC. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado de Roraima, Brasil. I. Espécies coletadas nas regiões Sul e Central. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; Rio de Janeiro, 84: 95-99.

Chagas AW. Criação de flebotomos e transmissão experimental da leishmaniose visceral americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1940; 35: 327-333.

- Chance ML. The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. In: Chang/ Gray (eds) Elsevier Science Publishing Company 1985; 93-110.
- Chaniotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM. Daily and season man-biting activity of phlebotominae sand flies in Panama. J Med Ent 1971; 4: 415-420.
- Christensen H & Herrer A. Susceptibility of sandflies (Diptera:Psychodidae), to trypanosomatidae from two-toed sloths (Edentata: Bradypodidae). J Med Entomol 1979; 16: 424-427.
- CIPA Group. Computed-aided identification of phlebotomine sand flies of America (CIPA) database 1999. Disponível em <<http://cipa.snv.jussieu.fr>>. Acesso em: 11/11/2012.
- Coelho MV, Cunha AS, Falcão AR. Notas sobre um foco de calazar no sudoeste do estado de Goiás. Rev Bras Malar Doen Trop 1965; 17: 143-148.
- Coelho WMD, Richini-PereiraVB, Langoni H, Bresciana KDS. Molecular detection of *Leishmania sp.* in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. Veterinary Parasitology 2011; 176: 281–282.
- Coimbra Jr CEA & Santos RV. Perfil epidemiológico da população indígena no Brasil. Documento do Trabalho nº3. Universidade Federal de Rondônia e Escola Nacional de Saúde Pública. 2001.
- Cordoba-Lanus E, De Grosso ML, Pinero JE, Valladares B, Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania spp.* in northwestern Argentina. Acta Trop 2006; 98: 1-5.
- Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J. A nested polymerase chain reaction (Ln- PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in coinfecting patients with human immunodeficiency virus. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96: 185-189.
- Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 44: 2343-2347.

Cuba CA, Miles MA, Vexenat A, Barker DC, McMahon Pratt D, Butcher J, Barreto AC, Marsden PD. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in T&s Bra9os, Bahia-Brazil: characterization and identification of leishmanial stocks isolated from man and dogs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1985; 19: 500-507.

da Silva AL, Williams P, Melo MN, Mayrink W. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990; 85:453-458.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Memb. Inst. Oswaldo Cruz. 2006; 101: 117-118.

Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Observações sobre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela desinsetização domiciliária, em focos endêmicos de calazar no Ceará. Rev Bras Malar Doen Trop 1955; 7: 131-141.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina 1956; USP, 162 pp.

Deane LM. & Deane MP. Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no noroeste do Estado do Ceará. Rev Bras Malar Doen Trop 1957; 9: 225-246.

Deane LM & Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop de São Paulo 1962; 4: 198-212.

Deane LM, Sargeant S, Fernandez E. Hallazgo de *Trypanosoma (Megatrypanum) pessoai* Deane & Sugay, 1963, en murcielago de Venezuela, Bol Direc Malar y Saneam Amb1978; 18: 231-237.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 27, 305–318.

Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Kenia MP, Gonçalves CM, Barata RA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no estado de Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 2007; 40: 49-52.

Dias-Lima AG, Castellón EC, Medeiros JF, Sherlock IA. Estratificação vertical da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da Amazônia central, Amazonas, Brasil. Cad Saúde Pública 2003; 18: 823-823.

Dias-Lima AG, Castellón EC, Sherlock IA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da Estação Experimental de Silvicultura Tropical Estado do Amazonas, Brasil. Acta Amaz 2000; 33: 303-316.

Domingos MF, Carreri-Bruno GC, Ciaravolo RMC, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31: 425-432.

Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Alves TP, Alves MA, Oshiro ET, et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 695-702.

Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Camargo de Castro AC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 43-46.

Dougall AM, Bruce A, Holt DC, Harris T, Sultan HA, Bates PA, Rose K, Walton SF. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. Internat Jour Parasit 2011; 41: 571-579.

Dougherty MJ, Hamilton JG, Ward RD. Semiochemical mediation of oviposition by the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Med Vet Entomol 1993; 7: 219-224.

Dourado MIC, Noronha CV, Alcântara N, Ichihara MY, Loureiro S. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). Rev Saúde Publ 1989; 23: 2-8.

Dujardin JP, Bermúdez H, Gianella A, Cardozo L, Ramos E, Saravia R, Quiroz K, Forgues G, Carazas R, Hervas D, Chavez T, Machane M, Martínez E, Torrez M. Uso de marcadores genéticos en la vigilancia entomológica de la enfermedad de Chagas. In: Cassab, J.A., Noireau, F., Guillen, G. (Eds.). La Enfermedad de Chagas en

Bolivia - Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998–2002). Ministerio de Salud y Prevision social, OMS/OPS, IRD and IBBA 1999; 157–169.

Dweik A, Schönian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and Hae III) for the detection of leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007; 101: 399-407.

El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2000; 94, 1–5.

Falqueto A, Grimaldi-Júnior G, Sessa PA, Varejão JBM, Deane LM. *Lutzomyia gasparviannai* Martins, Godoy & Silva, 1962, probable vector of *Leishmania mexicana* ssp. in Viana municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1985; 80: 497-502.

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

Feitosa MAC, Castellón EG. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amazonica* 2004; 34: 121-127.

Feliciangeli MD. Phlebotomine sandflies in Venezuela. IV. Review of the *Lutzomyia* subgenus *Micropygomyia* (Diptera: Psychodidae), with the description of *L. absonodonta* n. sp. and the male of *L. lewisi*. *Ann Trop Med Parasit* 1995; 89: 551-567.

Feliciangeli MD. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in Northern Venezuela. III - Seasonal fluctuation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 167-176.

Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública* 1953; 7: 158-167.

Forattini OP. Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera:Psychodidae). Arch Hyg Saúde Publ 1960; 25: 209-215.

Forattini OP. Entomologia Médica IV. *Psychodidae. Phlebotominae*, Leishmaniose e Bartonelose. Ed. Edgard Blucher Ltda 1973; São Paulo. VIII: 658pp.

Forattini OP. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública 1976; São Paulo, 10: 31-43.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira AO. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Públ 1972; São Paulo 6: 431-433.

Forattini OP & Santos MR. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em foco de leishmaniose tegumentar americana. Arch Hyg Saúde Publ 1952; 17: 171-174.

França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, Silva JC, Dias ES. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. Vet Parasitol 2005; 131: 213-220.

Freitas TPT, D'Andrea PS, de Paula DAJ, Nakazato L, Dutra V, Bonvicio CR, de Almeida ABPF, Boa-Sorte EC, Souza VRF. Natural Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* Captured in Mato Grosso, Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. January 2012; 12: 81-83.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In EF Rangel, R Lainson, Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz 2003; 23-51.

Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. Bol Dir Malariol Saneam Amb 1995; 35: 133-142.

Galati EAB & Nunes VLB. Descrição de *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia 1999; 43: 277-285.

Galati EAB, Nunes VL, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Damasceno-Júnior GA. *Phlebotomines* (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 175-193.

Galati EAB, Nunes VL, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Rocha HC, Garcia WB. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saú Públ 1996; 30: 115-128.

Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr EA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saúde Pública 1997; 31: 378-390.

Garnham PCC. Introduction. In: Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine 1987; 1: 13-25.

Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 5. Estratificação da atividade espacial e estacional de *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícola da região de Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical 1987; 82: 467-473.

Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1- Estudo experimental da frequência de flebotomíneos em ecótopos artificiais com referência especial a *Ps. intermedius*. Revista de Saúde Pública 1980; 14: 540-546.

Gomes AC, Santos JLF, Galati EAB. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. 4. Observations on the endophilic behaviour of the Sandfly and the vectorial role of *Psychodopigus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São Paulo State, Brazil. Revista de Saúde Pública 1986; 20: 280-287.

Gomes AC, Yoshimi IY, Capinzaiki AN, Amaral NMM, Guimarães AJG. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana nº 9. Prevalência/incidência da infecção humana nos Municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. Ver. Inst de Medic Trop 1992; 34: 149-158.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, Brasília 2004; 7: 338-349.

Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MB, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES; Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-150.

Gontijo CM, Falcão AR, Falcão AL, Coelho MV. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995; 90: 367-73.

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Review* 1993; 6: 230-250.

Grimaldi Jr G, Tesh RB & MacMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 687-725.

Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, Toma HK, Campbell DA. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Tropica* 2000; 74: 89-93

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases* 2002; 2: 494–501.

Hommel M *et al.* Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1995; 89: 55–73.

Instituto Nacional de Matereologia. INMET, Normais Climatológicas (1961-1990), Instituto Nacional de Meteorologia, Brasília, 2012.

Jorquera A, Gonzalez R., Marchan-Marcano E., Oviedo M., Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 100: 45-48.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. 2006; 22: 439-445.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashigushi Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 2005; 72: 87-93.

Kawa H & Sabroza PC. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. Cad Saúde Pública 2002; 18: 853-865.

Killick-Kendrick R, Ward DH. Transmission of leishmaniosis by the bait of phlebotomine sandfly: possible mechanism. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1981; 75: 152-154.

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

Killick-Kendrick R. Studies and criteria for the incrimination of vector and reservoir hosts of the leishmaniasis. In: Proceeding of the International Workshop on Control Strategies for the Leishmaniasis 1987 Jun 1-4; Ottawa, Canadá. 1988; 272-280.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. Medical and veterinary entomology 1990; 4: 1-24.

Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. Annales de Parasitologie Humaine et Comparee 1990; 65: 37-42.

Kobayashi J, Hasegawa H, Forli AA, Nishimura NF, Yamanaka A, Shimabukuro T, Sato Y. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1995; 37: 13-18.

Lainson R, Rangel E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100: 811-827.

Lainson R, Ryan L, & Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1987; 82: 421-424.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79: 223-226.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis-incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (mangabeira) as the vector in the lower amazonian basin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1968; 62: 385-395.

Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. Nature 1978; 273: 595-600.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds), The Leishmaniasis in Biology and Medicine 1987; 1: 1-120.

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Biology of the *Kinetoplastida*. W. H. R. Lumsden and D. A. Evans (Editors). London and New York: Academic Press 1979; 2: 1-116.

Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis: The Neotropical *Leishmania* species. In L Collier, A Baeows, M Sussman (eds), Microbiology and Microbial Infections 1998; 5: 241-266.

Langeron M. Précis de microscopie. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine Saint-Germain, Paris 1949.

Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48: 839-847.

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

Lugo J, Aldecoa T, Miqueli E, Pelegriño JL. Actividad de picada diurna y densidad estacional de *Lutzomyia (C.) orestes* (Diptera: Psychodidae). Revista Cubana de Medicina Tropical 1991; 43: 92-95.

Luz BE, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pralong F, Dedet JA, Pandey A, Thomaz-Soccol V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná State, Southern Brazil. Ann Trop Med Parasit 2000; 94: 623-631.

Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VO, Rabello AL. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2001; 34: 249-254.

Magill AJ. Leishmaniasis. In: Stickland, G.T. Hunter's Tropical Medicine and Emergins Infections Diseases 8 ed. 2000.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology 2004; 125: 251-262.

Marcelino AP, Ferreira EC, Avendanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, Moreira EC, Leite RC, Reis JKP, Gontijo CMF. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 2011; 183: 54-58.

Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomological News 2007; 118: 351–356.

Marcondes CB, Falqueto A, Lozovei ALL. Influence of preparation methods on the dimensions of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 201-202.

Margonari CS, Dias-Fortes CL, Dias ES. Genetic variability of *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in four geographical Brazilian populations by RAPD-PCR. J Med Entomol 2004; 41: 187-192.

- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 2010; 47: 1212-1219.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 2012; Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>>. Acesso em 15/10/2012.
- Martins AV, Silva J, Falcão AL. Estudos sobre os flebótomos do estado de Minas Gerais. XIII: descrição do macho e redescricao de fêmea de *Lutzomyia misionensis* (Castro,1960) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Rev Bras Biol* 1977; 96: 75-79.
- Martins F, Silva IG, Bezerra WA, Maciel JM, Silva HHG, Lima CG, Cantuária PB, Ramos OS, Ribeiro JB, Santos AS. Diversidade e frequência da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em áreas com transmissão de leishmaniose no Estado de Goiás. *Rev Patol Trop* 2002; 31: 211-224.
- Marzochi MCA. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In *Grandes Endemias Brasileiras* Universidade de Brasília, Brasília.1989.
- Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jorn Bras Medicina* 1992; 63: 82-104.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today* 2000; 16: 188-189.
- Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Warderley DMV, Corrêa FMA. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 339-345.
- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1979; 73: 123-137.

Medeiros ACR & Roselino AMF. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1999; 74: 329-336.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania spp.* in experimentally infected individual phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 2002; 44: 255–259.

Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Silva FOL, Loureiro AM, Fortes-Dias CL, Dias ES. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 56-61.

Michalsky EM, Guedes KS, Silva FOL, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, Dias ES. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; 44: 58-62.

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Neto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotominae with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002; 97: 185-188.

Missawa NA, Lima GBM. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 337-340.

Missawa NA, Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102: 913-918.

Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky EM, Dias ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato, Grosso, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44: 76-78.

Monteiro EM, França da Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 147-152.

Nadim A & Faghih M. The epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1968; 61: 534-549.

Nascimento JC, Paiva BR, Malafronte RS, Fernandes WD, Galati EAB. Natural infection of Phlebotomines (Diptera:Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2007; 49: 119-122.

Navin TR, Sierra M, Custodio R, Steuner F, Ronter CH, Ruebus TK. Epidemiologic study of visceral leishmaniasis in Honduras, 1975-1983. Am. J. Trop. Med. Hyg 1985; 34: 1069-1075.

Oliveira AC, Batista SM, Falcão AL. Calazar em Minas Gerais. Revisão dos dados epidemiológicos obtidos até 1958. Hospital 1959; 56: 625-643.

Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. Cad Saude Publica 2003; 19: 933-944.

Oliveira AG, Galati EAB, Fernandes CE, Dorval MEC, Brazil RP. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Acta Tropica 2008; 105: 55-61.

Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Acta Tropical 2010; 115: 126-130.

Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade-Junior HF, Malafronte RS. Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania spp.* em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cadernos de Saúde Pública 2007; 23: 87-94.

Paraense WL & Chagas AW. Transmissão experimental da leishmaniose visceral americana pelo "*Phlebotomus intermedius*". Nota prévia. Brasil-Médico 1940; 54: 179-180.

Passos VM, Falcão AL, Marzochi MC, Gontijo CM, Dias ES, Barbosa-Santos EG, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1993; 88: 103-110.

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degraive W, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Tropica 1999; 72: 251-258.

Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 1994; 88: 1614-1620.

Pessoa SB & Barreto MP. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional/São Paulo: Serviço de Parasitologia, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo 1948.

Pinto IS, Ferreira AL, Valim V, Carvalho FS, da Silva GM, Falcão AL, Dietze R, Falqueto A. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. J Vector Ecol. 2012; 37: 90-96.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. Identifications of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. Acta Trop 2005; 99: 905-913.

Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. Acta Tropica 2008; 107: 66–69.

Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. *Acta Tropica* 2011; 120: 273–275.

Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; 80: 593-595.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva, JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 70-72.

Quaresma PF, Carvalho GML, Ramos MCNF. Natural *Leishmania sp.* reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012; 107: 480-485.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 105: 579-585.

Quinnell, R. J., and Dye, C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.* 1994; 8: 219–224.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Estudos Wermelinger e D. sobre a fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de Leishmaniose cutânea em Mesquita, Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 39-45.

Rangel EF & Lainson R. Ecologia das leishmanioses, p.291-309. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), *Flebotomíneos do Brasil* 2003; Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 368pp.

Rangel EF & Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 937-954.

Rangel EF, Meneses CRV, Cupolillo E, Azevedo ACR, Costa WA, Costa SM. Aspectos da ecologia de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e a fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão da *Leishmania (V) braziliensis* no Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32: 115.

Rangel EF, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Além Paraíba, State of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80: 373-374.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, AF Barbosa, Andrade CA. Flebótomos de Vargem Grande, Foco de leishmaniose tegumentar não Estado do Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81: 347-349.

Ready P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. Annual Rev Entomology 2013; 58: 227-250.

Rebêlo JMM. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. Cad Saude Publica 2001; 17: 221-227.

Rebêlo JMM, Oliveira ST, de Silva FS, Barros VLL, Costa JML. Sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Amazônia of Maranhão.V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. Rev Bras Biol 2001b; 61: 107-115.

Resende MC, Camargo MCV, Vieira JRM, Nobi RCA, Porto NMN, Oliveira CDL, Pessanha JE, Cunha MCM, Brandão ST. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 51-55.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Prallong F, Bastien P, Perieres P. Taxonomy of *Leishmania* Use of enzymes, suggestions for a new classification, Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1990; 65: 11–125.

Rocha LS, Falqueto A, dos Santos CB, Ferreira AL, da Graça GC, Grimaldi-Jr G, Cupolillo E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sandfly species collected in southeastern Brazil. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; 104: 461–466.

Rodas LAC. Colonização e infecção experimental de *Lutzomyia longipalpis*, para padronização da técnica de PCR e identificação de *Leishmania sp* no vetor. Dissertação de Mestrado, Secretaria da Saúde - Coordenadoria de Controle de Doenças, Programa de Pós-Graduação em Ciências 2006; São Paulo, 95 pp.

Rodriguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 47-49.

Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropical* 2008; 105: 158–165.

Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, Carme B. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main newworld *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 459–467.

Rutledge LC, Ellenwood DA. Production of plebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The Species. *Environmental Entomology* 1975; 4: 71-77.

Ryan L. Flebótomos do Pará, Brasil. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Ministério da Saúde, Fundação SESP, Instituto Evandro Chagas, Belém, Documento Técnico 1986; 1: 154 pp.

Ryan L, Brazil, RP. *Leishmania* infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the Island of Sao Luis, Maranhao State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1984; 79: 383-384.

- Ryan L, Lainson R, Shaw JJ, Fraiha Neto H.. Ecologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na região amazônica. Instituto Evandro Chagas "50 anos". 1987; 1: 307–320.
- Sacks D, Kamhawi S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol. 2001; 55: 453-483.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998; 12: 315-317.
- Santos TG, de Mello Gaia MC, Brazil RP. Attraction of sand flies (Diptera: Psychodidae) to light traps in rural áreas of Minas Gerais state, Brazil. J Am Mosq Control Assoc 2003; 19: 74-78.
- Salomón OD, Rossi GC, Spinelli GR. Ecological aspects of phlebotomine ((Diptera, Psychodidae) in an endemic area of tegumentary leishmaniasis in the Northeastern Argentina, 1993-1998. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002; 97: 163-168.
- Salomón OD, Rossi GC, Cousiño B, Spinelli GR, Arias AR, Puerto DGL, Ortiz AJ. Phlebotominae sand flies in Paraguay. Abundance distribution in the Southeastern region. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 185-190.
- Salomón OD, Fernández MS, Santini MS, Saavedra S, Montiel N, Ramos MA, et al. Distribution de *Lutzomyia longipalpis* em la Mesopotamia Argentina 2010. Med (Buenos Aires) 2011; 71: 22-26.
- Saraiva L, Andrade-Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2010; 105: 1033–1039.
- Saraiva L, Carvalho GML, Sanguinette CC, Carvalho DAA, Falcão AL, Andrade-Filho JD. Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of the Velhas River in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2008; 103: 843–846.
- Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, Andrade Filho JD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera:

Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. J Med Entomol 2009; 46: 1159-1163.

Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 56-63.

Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania spp.* in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. Veterinary Parasitology 2009; 160: 18-24.

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2003; 47: 349-358.

Shaw JJ. Endotrypanum, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater? Ciência e Cultura 1992; 44: 107-116.

Shaw JJ. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In J Farrell, World Class Parasites: *Leishmania*, 4, Kluwer Academic Publishers 2002; 11-31.

Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent Leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1972; 66: 709-717.

Sherlock IA. Sobre o "*Phlebotomus lentii*" Mangabeira, 1936 (Diptera: Psychodidae). Rev Bras Biol 1957; 17: 77-88.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 671-683.

Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz 2003; 15-21.

Sherlock IA. & Sherlock VA. Sobre a infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania donovani*. Revista Brasileira de Biologia. 1961; 21: 409-418.

Sherlock, I.A., Sherlock, V.A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. Rev. Bras. Biol. 1972; 32: 209–217.

Sherlock IA, Guitton N. Observações sobre Calazar em Jacobina, Bahia III - Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. Rev Bras Malariol Doen Trop 1969; 21: 541-548.

Sherlock IA, Miranda JC. Observations on the ecology of visceral leishmaniasis in Jacobina, State of Bahia, Brazil (1982-1986) p. 54-80. In P Wijeyaratne, T Goodman, C Spinal (eds). Leishmaniasis Control Strategies: A critical evaluation of IDRC supported research. 1992; 1: 380 pp.

Shimabukuro PHF. Chave de identificação ilustrada dos *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae) do estado de São Paulo, PhD Thesis, Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças 2007; São Paulo, 121 pp.

Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JC, Brazuna JCM. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomine captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Exp Parasitol 2008; 119: 343-348.

Silva EA, Andreotti R, Honer MR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2007; 40: 420-425.

Smith ROA, Halder KC & Ahmed I. Further investigations on the transmission of kala-azar. Part III: The transmission of kala-azar by the bite of the sandfly *P. argentipes*. Indian Journal of Medical Research 1940; 28: 585-591.

Smith ROA, Halder KC & Ahmed I. Further investigations on the transmission of kala-azar. Part VI: A second series of transmissions of *L. donovani* by *P. argentipes*. Indian Journal of Medical Research 1941; 29: 799-802.

- Soto SI, Lehmann T, Rowton ED, Vélez BID, Porter CH. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001; 18: 84-93.
- Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 795-803.
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 759-765.
- Souza RN, Lima JWO, Souza FV, Gadelha AC, Braga VSS. Estabelecimento de um criadouro natural de *Lutzomyia longipalpis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999; 32: 214-215.
- Souza CF & Borges MAZ. Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae) em Timóteo, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24: 1454-1455.
- Teekayuwat T, Pfeiffer DU, Hayes DP. Spatial clustering of enzootic bovine leucosis in New Zealand. In: *Proceedings of the Ninth International Society on Veterinary Epidemiology and Economics* 2000.
- Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 133-142.
- Vasconcelos DRB, Melo LM, Albuquerque ES, Luciano MCS, Bevilaqua ML. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Experimental Parasitology* 2011; 129: 234–239.
- Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, Sallenave SM, Valim C, David JR, Lopes UG. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 158-164.

Vexenat JA, Barretto AC, Cuba C, Mardens PDHP. Características epidemiológicas da Leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1986; 81: 293-301.

Vieira JBF, Coelho, GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1998; 31: 85-92.

Vieira, RN, Ferreira, AL, Falqueto, A. Pesquisa de criadouros de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar, em área endêmica de leishmaniose tegumentar (LT) no Estado do Espírito Santo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 1999; 32: 31-35.

Warburg A. Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections. J Inv Pathol 1991; 58: 1889-202.

Ward RD, Shaw JJ, Lainson R, Fraiha H. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotomine fauna of an area of highly endemic cutaneous leishmaniasis in the Serra dos Carajás, Pará State. Trans R Soc Trop Med Hyg 1973; 67: 174-183.

Williams, P. The phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) of caves in Belize, Central America. Bulletin of Entomological Research 1976; 65: 601-614.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/topics/leishmaniasis/en 2011; Acesso em 22 jan de 2011.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/ 2010; Acesso em 18 jan 2010.

World Health Organization (WHO). The control of leishmaniasis: report of an expert committee. WHO Technical Report Series 1990; 793: 50-55.

Xavier DCA. Estudos entomológicos do Parque do Gafanhoto, visando a vigilância epidemiológica das Leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. [Monografia]. Divinópolis (MG): Fundação Educacional de Divinópolis, Universidade do Estado de Minas Gerais. 2007.

Ximenes MFFM, Castello EG, Souza MF, Menezes AAL, Queiroz JW, Silva VPM, Jerônimo SMB. Effect of Abiotic Factors on Seasonal Population Dynamics of

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) in Northeastern Brazil. *Journal and Medical Entomology* 2006; 43: 990-995.

Ximenes MFFM, Souza MF, Castellon EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94: 427-432.

Young DG & Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 1994; 54: 881 pp.

Zeledón R, Murillo J, Gutierrez H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 455-459.