



JOSEANE CAMILLA DE CASTRO

**INVESTIGAÇÃO DA FAUNA
FLEBOTOMÍNICA E SUA INFECÇÃO
NATURAL POR *Leishmania* spp., NO
MUNICÍPIO DE LAVRAS, MG, BRASIL**

Lavras – MG

2017

JOSEANE CAMILLA DE CASTRO

**INVESTIGAÇÃO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA E SUA
INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmaniaspp.*, NO MUNICÍPIO DE
LAVRAS, MG, BRASIL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, área de
concentração Sanidade animal, para
a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante
Orientadora
Profa. DraAna Paula Peconick.
Co-orientadora
Prof. Dr. Thales Augusto Barçante
Co-orientador

LAVRAS-MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Castro, Joseane Camilla de.

Investigação da fauna flebotomínica e sua infecção por
Leishmania spp., no município de Lavras, MG, Brasil / Joseane
Camilla de Castro. - 2017.

58p. : il.

Orientador(a): Joziana Muniz de Paiva Barçante.

Coorientador(a): Ana Paula Peconick, Thales Augusto
Barçante.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Vetor. 3. Parasito. I. Barçante, Joziana
Muniz de Paiva. II. Peconick, Ana Paula. III. Barçante, Thales
Augusto. IV. Título.

JOSEANE CAMILLA DE CASTRO

**INVESTIGAÇÃO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA E SUA
INFECCÃO NATURAL POR *Leishmaniaspp.*, NO MUNICÍPIO DE
LAVRAS, MG, BRASIL**

**RESEARCH OF SANDFLY FAUNA AND ITS NATURAL
INFECTION BY *Leishmania spp.*, IN LAVRAS, MG, BRAZIL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, área de
concentração Sanidade animal, para
a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de março de 2017.
Dra Joziana Muniz de Paiva Barçante UFLA
Dra Ana Paula Peconick UFLA
Dr Djeison Lutier Raymundo UFLA
Dra Lilian Lacerda Bueno UFMG

Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante
Orientadora
Profa. Dra. Ana Paula Peconick
Co-orientadora
Prof. Dr. Thales Augusto Barçante
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2017**

*Aos meus pais por tudo que me ensinaram, por todos os exemplos
que me deram, por serem minha base, meu tudo e estarem ao meu lado a
cada momento.*

*Ao meu irmão pelo amor, amizade, companheirismo, pelas
conversas e por caminhar ao meu lado desde sempre.*

À minha cunhada pelas risadas e carinho.

*Aos queridos amigos Ana Valéria, Pacelli e César por me acolherem
em sua casa.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e Maria que sempre me guiaram e me protegeram a cada momento, em cada escolha.

À Joziana Barçante e Thales Barçante, mais do que orientadores, grande amigos, com quem aprendi que não basta ser uma boa profissional, mas que precisamos fazer a diferença em todos os lugares e pelo grande apoio nos momentos difíceis.

À Ana Peconick por todo carinho, pela amizade, pelos conhecimentos partilhados com tanto amor, por cada conselho, por simplesmente ser essa pessoa tão incrível.

À Célia Gontijopor me receber no CPqRR e ao Felipe Rêgo e Julia Miranda que me acompanharam em todas as análises deste trabalho.

À Beatriz Mendonça e Tarcisio Milagres que estiveram comigo durante o trabalho e foram fundamentais para a realização do mesmo.

Aos moradores das casas em que foram feitas as coletas por terem aberto as portas e nos recebido.

À Patricia Quaresma que tanto contribuiu com o trabalho.

À Lilian Lacerda por ter aceitado participar da banca de defesa.

Ao Andrey Andrade pela ajuda na identificação das espécies de flebotomíneos.

Ao Daniel Fernando pela ajuda com o mapa.

Aos meus avós por todo amor, preocupação e cada oração.

À minha tia, Sônia, por cuidar de mim.

Ao meu afilhado, Fernando, pelo carinho e amor.

Aos meus tios Zé Maria, Glorinha, Virginia e a todos os primos pela torcida.

À segunda família que tenho: Claudia, Agnaldo, Carol, Rogério, Lara, Stela, Ana Laura, Julia, Paty, Zé Antônio, Patrick, Vera e Matheus por simplesmente fazerem parte da minha vida.

Ao meu querido irmão e diretor espiritual, Charles, pela intercessão, pelos conselhos e por ser presença de Deus em minha vida.

Ao querido amigo Luiz Gustavo por cada momento, conselho, por ouvir minhas reclamações, por partilhar comigo tantos momentos e ser esse grande irmão que me faz sorrir mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao querido amigo André pela tão grande amizade, por me fazer companhia e cuidar de tudo quando não tinha tempo para nada.

À Universidade Federal de Lavras, instituição tão querida, pela oportunidade de realizar esse mestrado.

À FAPEMIG pela aprovação do projeto APQ-02553-14.

Aos colegas do NEP por cada conhecimento partilhado.

MUITO OBRIGADA!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.” (Charles Chaplin)

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas que atingem grande parte da população mundial, sendo causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanioses podem se manifestar em sua forma tegumentar, causando lesões dermatológicas com diferentes características clínicas ou em sua forma viscerotrópica, potencialmente fatal. As diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas por dípteros hematófagos, da família Psychodidae, também conhecidos como flebotomíneos. O conhecimento da fauna flebotomínica de uma região é de fundamental importância para nortear as ações em vigilância em saúde relacionadas à prevenção e controle das leishmanioses. Considerando que para o município de Lavras têm sido notificados casos de leishmaniose tegumentar humana e leishmaniose visceral humana e canina, o presente trabalho teve por objetivo verificar a presença de flebotomíneos e sua infecção natural por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Para tal, foram realizadas coletas sistematizadas utilizando armadilhas luminosas tipo HP, no período compreendido entre fevereiro de 2016 e março de 2017. As armadilhas foram instaladas em oito residências que abrigavam cães que tiveram sorologia confirmada para infecção por *Leishmania infantum*, em áreas de vegetação preservada ou semi-preservadas. No total foram coletados 86 espécimes de flebotomíneos, sendo 60 fêmeas e 26 machos. A identificação foi realizada utilizando a classificação proposta por Galati (2003), tendo sido identificadas as seguintes espécies: *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Evandromyia cortelezzi*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Nyssomyia whitmani*, *Brumptomyia* sp., *Psathyromyia lutziana*, e *Pressatia* sp.. Cinco fêmeas da espécie *Lu. longipalpis* estavam infectadas por *Leishmania braziliensis*. Apesar do pequeno número de espécimes coletados, verificou-se uma grande diversidade de espécies na área de estudo. Ademais, o encontro de espécimes de *Lu. longipalpis* naturalmente infectados com *Leishmania braziliensis*, aponta para a necessidade de avaliação da competência vetorial uma vez que, não há relato em literatura dessa interação natural entre essas espécies.

Palavras-chave: Leishmaniose. Lavras. Análise molecular. Vetor. Parasito.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease that affects a large part of the world population and it's caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Leishmaniasis may manifest in its integument form, causing dermatological lesions with different clinical characteristics or in its viscerotropic, potentially fatal form. The different species of *Leishmania* are transmitted by hematophagous dipterans of the family Psychodidae, also known as phlebotomines. Knowing the phlebotominal fauna of a region is of fundamental importance to guide the actions in health surveillance related to the prevention and control of leishmaniasis. Considering cases of human tegumentary leishmaniasis and human and canine visceral leishmaniasis have been reported for the municipality of Lavras, this study aimed to verify the presence of sandflies and their natural infection by different species of the genus *Leishmania*. Then, collections were systematized using HP-type, light traps were carried out between February 2016 and March 2017. Traps were installed in eight residences that had dogs confirmed serology for *Leishmania infantum* infection in areas of preserved vegetation or Semi-preserved. A total of 86 specimens of sand flies were collected, 60 females and 26 males. The identification was performed using the classification proposed by Galati (2003), and the following species were identified: *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Evandromyia cortelezzi*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Nyssomyia whitmani*, *Brumptomyia* sp., *Psathyromyia lutziana*, and *Pressatia* sp. Five females of the *Lu longipalpis* species were infected by *Leishmania braziliensis*. Despite the small number of specimens collected, there was a great diversity of species in the study area. In addition, the encounter of specimens of *Lu. longipalpis* naturally infected with *Leishmania braziliensis*, shows the need to evaluate vector competence since there is no literature report of this natural interaction between these species.

Key-words: Leishmaniasis. Lavras. Molecular analysis. Vector. Parasite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> nos hospedeiros definitivos e intermediários	14
Figura 2- Localização do município de Lavras-MG.....	24
Figura 3- Quintal da residência onde foi realizado o estudo piloto.	25
Figura 4- Localização das casas onde foram realizadas as coletas, no período de maio de 2016 a março de 2017.	26
Figura 5- Pontos de coleta da área de vegetação.	27
Figura 6-Armadilha Shannon, instalada nas áreas de vegetação.	27
Figura 7- Localização da coleta de conveniência	28
Figura 8- Curva de acumulação de espécies de flebotomíneos coletados no período de fevereiro de 2016 a março de 2017, no município de Lavras, MG.	33
Figura 9--Resultado da PCR de 60 flebotomíneos coletados	35
Figura 10- Resultado da PCR RFLP dos cinco flebotomíneos positivos; as <i>Leishmanias</i> infectantes eram todas da espécie <i>Leishmania braziliensis</i>	36

LISTA DE ABREVIACÕES

LT leishmaniose tegumentar

LV leishmaniose visceral

ATPaseadenosinatrifosfatases

pHpotencial Hidrogeniônico

PCR Reação em cadeia da polimerase

RFLP Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição

DNA ácido desoxirribonucleico

CWA clima temperado húmido com Inverno seco e Verão quente

DPP Plataforma de Duplo Compartilhamento

ELISA Ensaio de imunoadsorção enzimática

SUMÁRIO

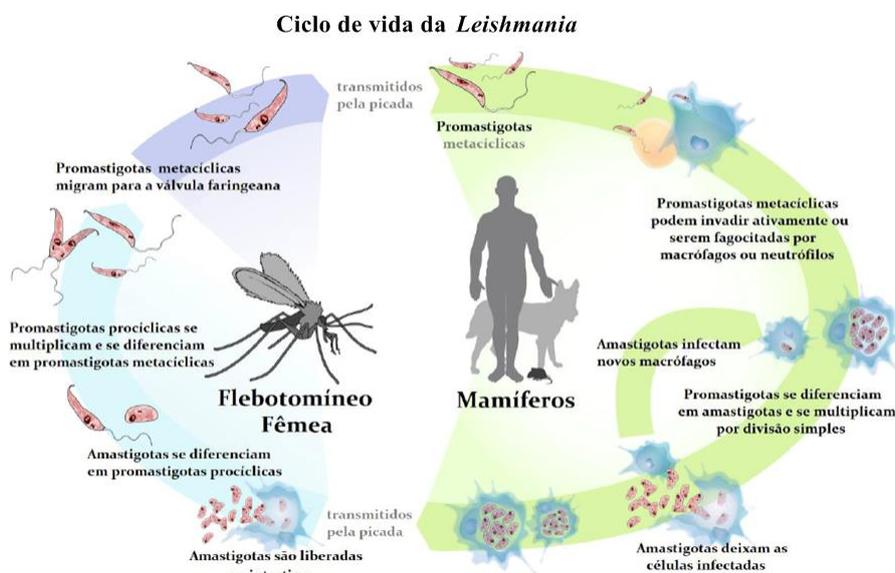
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	16
2.1.1	Leishmaniose tegumentar	16
2.1.2	Leishmaniose visceral.....	17
2.2	O PARASITO	18
2.3	FLEBOTOMÍNEOS.....	19
2.4	DETECÇÃO MOLECULAR DE INFECÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS POR <i>LEISHMANIA</i>	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	ÁREA DE ESTUDO.....	24
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	24
4.2.1.1	Coleta de flebotomíneos	25
4.2.1.1.1	Estudo piloto.....	25
4.2.1.1.2	Coletas sistematizadas	25
4.2.1.2	PROCESSAMENTO DOS FLEBOTOMÍNEOS	28
4.2.1.2.1	Identificação morfológica das espécies de flebotomíneos...29	
4.2.2.	Avaliação da infecção natural de flebotomíneos por espécies de <i>Leishmania</i>	30
4.2.3	Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> RFLP.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS	32

5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> ENCONTRADAS PARASITANDO FLEBOTOMÍNEOS.....	36
6 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
APÊNDICE A- ARTIGO 1	47

1 INTRODUÇÃO

Consideradas doenças negligenciadas, as leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, organismos eucarióticos que possuem um ciclo de vida complexo (Figura 1), composto por dois estágios principais: promastigotas, encontradas no intestino do flebotomíneo (vetor), e amastigotas, forma intracelular obrigatória de células do sistema mononuclear fagocitário (CHANCE et al., 1985).

Figura 1- Ciclo de vida da *Leishmania* nos hospedeiros definitivos e intermediários



Fonte: Canal Ciência (2011).

A doença é dividida e caracterizada em dois grupos: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) (PEARSON & SOUSA, 1996). A LT é subdividida em: cutânea, muco cutânea, e, cutânea difusa (OMS, 2015). ALVou calazar é o tipo mais grave da doença, considerada potencialmente fatal (GONTIJO & MELO, 2004).

As leishmanioses cutânea e mucosa, nas Américas, tiveram uma incidência, em 2014, de 19,76 casos por 100.000 habitantes, em 16 países

endêmicos. Sendo que, 75% dos casos foram relatados pelo Brasil (20.418 casos), Colômbia (11.586 casos) e no Peru (6.231 casos). Para a Leishmaniose Visceral, 12 países foram endêmicos, nas Américas, sendo o Brasil classificado como um país com transmissão em expansão de acordo com o cenário epidemiológico. Dos 48.720 casos reportados no período de 2001 a 2014, 96,42% foram registrados no Brasil (OPS, 2016).

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, e subfamília Phlebotominae e possuem grande importância na manutenção do ciclo de transmissão de *Leishmania*, uma vez que são os principais vetores do protozoário (MARTINS et al., 1977; YOUNG & DUNCAN, 1994). O estudo das espécies de flebotomíneos, bem como, a relação entre o mesmo, o protozoário e os hospedeiros são de fundamental importância para a proposição de medidas de controle que visem reduzir a expansão da leishmaniose (ALMEIDA et al., 2010).

Com relação ao município de Lavras, até o ano de 2013, não havia registros de casos autóctones de leishmaniose visceral ou de presença de flebotomíneos. A partir da realização no inquérito sorológico canino, verificou-se a ocorrência de casos de LVC, com uma prevalência de até 20%, em algumas regiões do município, segundo dados da vigilância epidemiológica.

Considerando a importância do conhecimento da distribuição das espécies de flebotomíneos para melhor entendimento das relações epidemiológicas relacionadas às leishmanioses, o presente estudo teve por objetivo investigar a fauna flebotomínica e sua infecção natural por *Leishmania* spp. no município de Lavras – MG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose

Diferentes formas de classificação da leishmaniose foram propostas (PEARSON & SOUSA, 1996). Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs a divisão em quatro tipos: forma cutânea que causa úlceras na pele, geralmente em áreas expostas como face, braços e pernas; forma cutânea difusa que produz lesões disseminadas; forma muco cutânea em que as lesões podem destruir parcialmente ou totalmente as membranas mucosas do nariz, boca e garganta; e, a forma visceral que é caracterizada por febre, perda de peso, anemia, aumento de volume do fígado e do baço. Contudo é mais utilizado dividir e caracterizar as leishmanioses em dois grupos: a Leishmaniose Tegumentar (LT) que engloba os tipos: cutânea, cutânea difusa e muco cutânea e a Leishmaniose Visceral (LV) (BARATA et al., 2004; CRISTALDO, 2003; DIAS et al., 2007; GALATI; NUNES; PELISSARI et al., 2011).

2.1.1 Leishmaniose tegumentar

O primeiro relato de leishmaniose tegumentar no Brasil aconteceu em 1827 e foi registrado no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica, que está citado em um livro intitulado “Antiguidad de lasyphilis em elPerú” (CAMARGO & BARCINSKI, 2005).

Em 1895, Moreira, relatou a existência do botão endêmico dos países quentes, chamando “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra” e em 1909, Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias em São Paulo, confirmando as formas amastigotas de *Leishmania* em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas (MOREIRA, 1895).

Gaspar Vianna, em 1911, ao descrever um caso de leishmaniose cutânea disseminada de um paciente de Paraíba do Sul, identificou o parasito

como *Leishmania brasilienses*, nome corrigido posteriormente por Alfredo da Mata, em 1916, para *L. braziliensis* (FURUSAWA & BORGES, 2014). Em 1961, Pessoa, propôs a subdivisão da *L. braziliensis* em *guyanensis*, *peruviana*, *mexicana* e *pifanoi*, de acordo com as formas clínicas encontradas em pacientes de diferentes regiões (PESSOA, 1961).

Os números de casos notificados, no Brasil, aumentaram a partir da década de 80, variando de 3000 em 1980 a 37710 em 2001 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), sendo que, atualmente, tem-se registro de LT em todos os Estados do país (BASANO & CAMARGO, 2004).

A doença apresenta um caráter multifacetado relacionado a diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas, seu padrão de transmissão e da relação parasito/hospedeiro (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MARZOCHI, 1989). A LT é, então, subdivida em: cutânea que causa úlceras na pele, geralmente em áreas expostas como face, braços e pernas; cutânea difusa que produz lesões disseminadas; muco cutânea em que as lesões podem destruir parcialmente ou totalmente as membranas mucosas do nariz, boca e garganta (OMS, 2015).

2.1.2 Leishmaniose visceral

O primeiro relato de leishmaniose visceral, no Brasil, foi registrado em 1934, quando Penna, em estudo, encontrou amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que foram a óbito com suspeita de febre amarela (GONTIJO & MELO, 2004). O primeiro surto da doença ocorreu 20 anos depois deste relato, em Sobral, cidade do estado do Ceará (DEANE, 1956). No período de 1980 a 1986, ocorreu uma epidemia de LV no estado do Piauí atingindo principalmente menores de cinco anos e adultos com mais de 40 anos com um total de 1509 casos (COSTA, 1990).

Na década de 90, noventa por cento dos casos notificados de leishmaniose visceral ocorreram em áreas rurais da Região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), quadro diferente do atual, em que

podemos observar um aumento de casos em áreas urbanas(COSTA, 2005). Desde 1990 até o ano de 2014, os estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul tiveram um incremento no quantitativo de número de casos (PORTAL DA SAÚDE, 2014).

As apresentações clínicas da LV variam de quadros assintomáticos, que constituem a maioria dos casos, até formas clássicas caracterizadas por febre, hepatoesplenomegalia, anemia, manifestações hemorrágicas, linfadenomegalia e perda de peso com progressão para desnutrição (BADARO et al., 1986).

2.2 O parasito

Leishmania é um protozoário que possui a seguinte posição taxonômica (LEVINE et al., 1980): Reino: Protista (Haeckel, 1866); Sub-reino: Protozoa (Goldfuss, 1817); Filo: Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963); Subfilo: Mastigophora (Deising, 1866); Classe: Zoomastigophorea (Calkins, 1909); Ordem: Kinetoplastida (Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976);Subordem: Trypanosomatina (Kent, 1880); Família: Trypanosomatidae (Dofein, 1901, emend. Grobben 1905); Gênero: *Leishmania*(Ross, 1903).*Leishmania* é classificada, taxonomicamente, de acordo com a sua localização no aparelho digestivo de vetor, assim sendo, aquelas que aderem à porção anterior e média do intestino são do subgênero *Leishmania* e aquelas que possuem uma fase de divisão que se aderem ao intestino posterior são do subgênero *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1987).

O gênero compreende cerca de 31 espécies sendo que destas 20 são patogênicas para os humanos (ASHFORD, 2000) todas com especificidade variável pelo hospedeiro (CHANCE, 1985).

No Brasil são encontradas as seguintes espécies: *L. amazonensis*, *L. forattinii*, *L. infantum*, *L. braziliensis*,*L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenbergi*, *L. panamensis*, *L. shawi*, *L. utingensis*,*L. enrietti*, *L.deanei*,

sendo que dessas, *L. forattinii*, *L. utingensis*, *L. enrietti* e *L. deanei* ainda não foram encontradas infectando humanos (AKHOUNDI et al., 2016).

O protozoário é um parasito intracelular obrigatório e se reproduz por divisão binária (LAISON et al., 1987). Os flebotomíneos são infectados ao ingerirem macrófagos contendo amastigotas, durante o repasto sanguíneo. As amastigotas são formas ovaladas e com presença de um flagelo curto interiorizado. Essas formas se diferenciam em promastigotas procíclicas flageladas e se ligam ao epitélio no trato digestivo, onde se transformam na forma metacíclica infectiva. Esta última desliga-se do epitélio e migra para a faringe e a cavidade bucal do inseto. Ao picar um hospedeiro vertebrado, os flebotomíneos passam a regurgitar o material aspirado, assegurando a deposição de formas infectantes no mesmo. Essas são internalizadas por fagócitos, principalmente nos macrófagos, onde permanecem nos fagolisossomos, sobrevivendo graças a uma ATPase transportadora de próton que mantém o pH dentro da vesícula em torno de 6,5. Nos fagolisossomos se transformam em amastigotas que se dividem rapidamente por fissão binária, levando ao rompimento do macrófago e, assim, a disseminação da infecção (BIBLIOTECA DE MANGUINHOS, 2015; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; SOUZA, 2004).

2.3 Flebotomíneos

Popularmente conhecidos como mosquitos-palha, cangalhinhas e asa-dura (LAINSON & SHAW, 1978), os flebotomíneos, são insetos de grande importância para a saúde pública uma vez que estão envolvidos na transmissão de patógenos, sobretudo os do gênero *Leishmania* (FONSECA; BERMÚDEZ; DESMOULIÈRE, 2010). Pertencem a ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, e subfamília Phlebotominae. Diversas classificações para os flebotomíneos foram propostas desde o século 17, sendo que atualmente a subfamília Phlebotominae é subdividida

em seis gêneros, sendo eles: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* encontrados no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* encontrados no Novo Mundo (AKHOUNDI et al., 2016).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos cujo ciclo compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto (BRAZIL & BRAZIL, 2003). As larvas são muito ativas se deslocando rapidamente em busca de alimento, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica (SHERLOCK, 2003). São pequenas medindo cerca de 12mm, claras e vermiformes, possuem tempo de desenvolvimento médio de 18 dias podendo ser prolongado por meses, caso as condições sejam desfavoráveis como, por exemplo, em caso de clima frio e seco (YOUNG & DUNCAN, 1994).

Os adultos têm cerca 2,5 mm, corpo altamente piloso, cor amarelada ou castanha. Realizam voo saltado e durante o pouso mantem as asas em posição vertical, possuem hábitos crepusculares e se abrigam em locais úmidos e escuros como toca de animais, troncos de árvores e folhas caídas no solo (ALEXANDER et al., 1992; FORATTINI, 1973). As fêmeas e os machos são diferenciados a partir dos últimos segmentos abdominais, onde são formadas as genitálias e também pelas probóscides, uma vez que, as fêmeas a possuem adaptadas para realizar o repasto sanguíneo (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Os adultos de ambos os sexos se alimentam de soluções açucaradas como sucos vegetais, néctar de flores e frutos, através de sucção (ALEXANDER & USMA, 1994; SHERLOCK & SHERLOCK, 1972). As fêmeas são, também, hematófagas necessitando de sangue animal ou humano para a maturação de seus ovários. Algumas espécies realizam apenas um repasto sanguíneo entre as posturas, mas há aquelas que o fazem diversas vezes em um ciclo de ovoposição, o que resulta em maior poder de transmissão de micro-organismos pelo inseto (BRAZIL & BRAZIL, 2003; SHERLOCK, 2003).

No Brasil, diversos estudos foram realizados com os flebotomíneos com a finalidade principal de esclarecer aspectos relacionados

à epidemiologia das leishmanioses (AGUIAR et al., 1996; AZEVEDO et al., 2008; CHRISTENSEN et al., 1982; OGAWA et al., 2016; PAULA et al., 2013). Existem mais de 900 espécies de flebotomíneos descritos no mundo, sendo que 500 ocorrem na região Neotropical (GALATI, 2011; SHIMABUKURO; TOLEZANO).

A chave mais atual utilizada para a classificação dos flebotomíneos é encontrada no livro intitulado “Flebotomíneos do Brasil” de Rangel e Lainson e foi proposta por Galati (2003), esta classificação possui uma revisão completa e reorganização da subfamília Phlebotominae (AKHOUNDI et al., 2016).

Até o momento, sabe-se que as espécies envolvidas na transmissão da LV no Brasil são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo que *Lu. longipalpis* tem ampla distribuição geográfica, enquanto *Lu. cruzi* é incriminado como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A LT tem como vetores no país, as espécies: *Lu. migonei*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. Intermedia*, *Lu. Flaviscutellata* e *Lu. wellcomei* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.4 Detecção molecular de infecção de flebotomíneos por *Leishmania*

A biologia molecular tem modificado a forma de investigação epidemiológica, diagnóstico e controle de doenças (CAVALCANTI et al., 2008). Relatos do uso de biologia molecular em estudos relacionados às leishmanioses começaram há cerca de 46 anos, com o isolamento e caracterização do DNA cinetoplástico de uma espécie de *Leishmania* (SIMPSON & SILVA, 1971).

Atualmente, metodologias como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que consiste em realizar ciclos repetidos de desnaturação, anelamento e extensão de uma sequência alvo juntamente com os iniciadores, visando à síntese *in vitro* de milhões de cópias de um determinado segmento de DNA

na presença da enzima DNA polimerase (SAIKI et al., 1985) têm sido amplamente utilizadas para detectar precisamente e identificar *Leishmania* em flebotomíneos (BARKER, 1989; SILVA & GRUNEWALD, 1999).

A positividade de flebotomíneos com *Leishmania*, quando realizada a técnica de PCR, é muito mais alta quando comparada a positividade utilizando método de dissecação, apontando para uma maior sensibilidade da técnica molecular (ROSSI et al., 2008).

Diversos estudos utilizando técnicas de PCR foram realizados a fim de pesquisar o DNA de *Leishmania* spp. (AZIZI et al., 2016; BRAVO-BARRIGA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017; GIANTSIS et al., 2017), sendo que o conhecimento do número de flebotomíneos naturalmente infectados, bem como, da espécie de *Leishmania* infectante é de fundamental importância nos estudos da capacidade vetorial e da epidemiologia das leishmanioses (MICHALSKY et al., 2002).

Para a identificação das espécies de *Leishmania* a técnica PCR RFLP utilizando a enzima de restrição *Hae III* combina alta sensibilidade em detectar *Leishmania* e capacidade de identificar as espécies relevantes (SCHÖNIAN et al., 2003), sendo amplamente utilizada (ANDRADE et al., 2006; VOLPINI et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi investigar a fauna flebotomínica no município de Lavras-MG e sua infecção natural por parasitos do gênero *Leishmania*.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Identificar as espécies de flebotomíneos presentes no município de Lavras – MG.
- 3.2.2 Verificar a ocorrência de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos capturados;
- 3.2.3 Identificar as espécies de *Leishmania* encontradas parasitando flebotomíneos na área de estudo;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Lavras é um município do sul Minas Gerais, localizado na região de Campo das Vertentes há uma altitude de 919m, latitude de 21° 14' 43 sul e longitude 44° 59' 59 oeste (Figura 2). Possui cerca de 100 mil habitantes, é uma cidade universitária, com localização privilegiada estando, em linha reta, a apenas 184 km de Belo Horizonte, 262 km do Rio de Janeiro e 307 km de São Paulo. O clima da cidade é Cwa, ou seja, subtropical de inverno seco com temperaturas inferiores a 18°C e verão quente com temperaturas superiores a 22°C (DANTAS, 2007).

Figura 2- Localização do município de Lavras-MG.

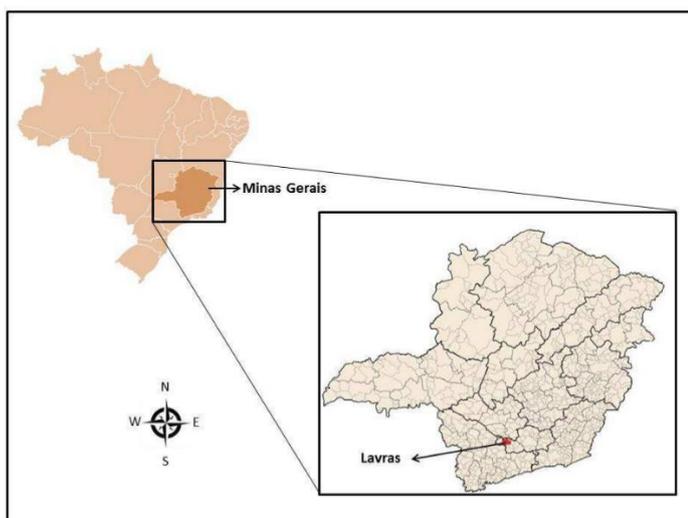


Figura 1: Mapa do Brasil, com ênfase ao estado de Minas Gerais, onde está localizado o município de Lavras. Fonte: Barçante et al., 2015.

4.2 Delineamento do estudo

4.2.1 Identificação das espécies de flebotomíneos

4.2.1.1 Coleta de flebotomíneos

4.2.1.1.1 Estudo piloto

No período de 17 de fevereiro a 09 de março de 2016, foram instaladas armadilhas luminosas automáticas HP (PUGEDO et al., 2005) adaptada do modelo armadilha CDC (Centers for Disease Control), no peridomicílio de uma residência em que havia cachorros, pombos, patos e galinhas no quintal (Figura 3).

Figura 3- Quintal da residência onde foi realizado o estudo piloto.



Fonte: Do autor (2016).

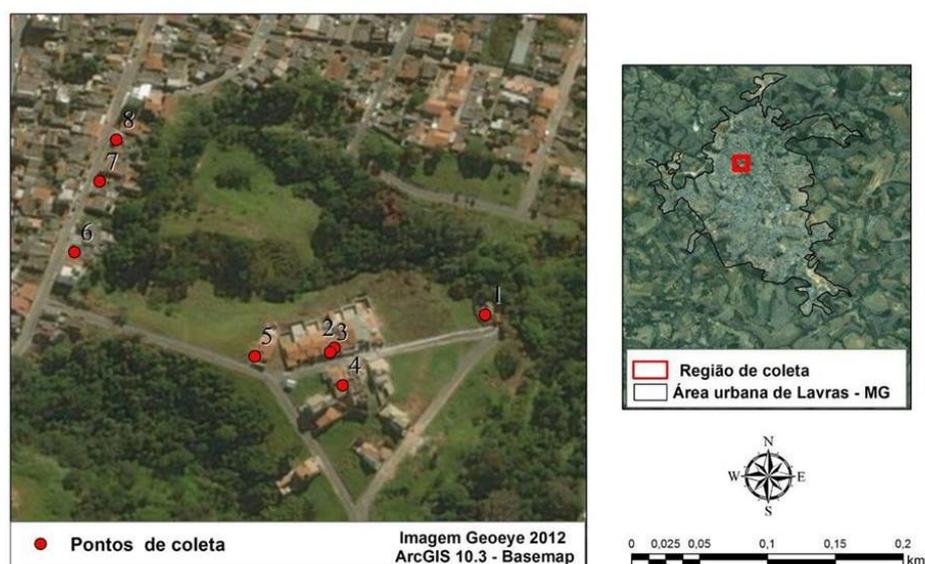
As armadilhas (três) foram instaladas às 18 horas e retiradas às 06 horas, do dia seguinte, durante três dias consecutivos, resultando em um esforço amostral de 36 horas por ciclo de coleta.

4.2.1.1.2 Coletas sistematizadas

As coletas sistematizadas foram realizadas nos bairros com maior incidência de LVC, após realização do inquérito sorológico canino. Foram selecionadas oito residências para instalação mensal das armadilhas

luminosas automáticas HP (PUGEDO et al., 2005) adaptada do modelo armadilha CDC (Centers for Disease Control). Estas foram instaladas no peridomicílio de casas que abrigavam cães considerados positivos, pelos exames de DPP® e ELISA (Figura 4). As armadilhas foram instaladas no período de maio de 2016 a março de 2017, mensalmente, por três dias consecutivos. Participaram do estudo inicialmente oito residências sendo que três desistiram ao longo do mesmo.

Figura 4- Localização das casas onde foram realizadas as coletas, no período de maio de 2016 a março de 2017.



Fonte: Do autor (2016).

4.2.1.1.3 Coletas em área de vegetação

Nas áreas de vegetação preservadas ou semi-preservadas dos bairros Jardim Klintiana e Jardim Glória (Figura 5) foram realizadas três coletas, utilizando a armadilha de Shannon (Figura 6), perfazendo um esforço amostral de 22 horas. Para tanto era incidida uma luz sobre a armadilha que atraía diversos insetos, os mesmos ficavam em repouso sobre o tecido.

Quando o inseto em repouso era um flebotomíneo, utilizando o capturador manual de Castro (BRASIL, 1996), o mesmo era coletado.

Figura 5- Pontos de coleta da área de vegetação.



Legenda: Circulo vermelho- Jardim Glória; Circulo Verde – Jardim Klintiana; Setas em vermelho – Local de instalação da Shannon. Fonte: Tarcísio (2017).

Figura 6-Armadilha Shannon, instalada nas áreas de vegetação.



Fonte: Do autor (2016).

4.2.1.1.4 Coleta de conveniência

Foi realizada a colocação de armadilha luminosa tipo HP, por três dias consecutivos, no peridomicílio do caso humano de leishmaniose visceral (Figura 7).

Figura 7- Localização da coleta de conveniência



Legenda: Circulo laranja- Área do bairro Morada do Sol II; Setas em vermelho – Pontos de coleta. Fonte: Tarcísio (2017).

4.2.1.2 Processamento dos flebotomíneos

As redes das armadilhas retiradas das casas e o capturador manual de Castro foram encaminhados para o Laboratório de Biologia Parasitária (Biopar), da Universidade Federal de Lavras, onde foram armazenados em congelador a fim de sacrificar os insetos. Posteriormente, os mesmos passaram por triagem, utilizando estereoscópio binocular para identificar, a

partir da porção final do abdômen, nos três últimos segmentos, onde se formam a genitália, as fêmeas e os machos.

As fêmeas foram transferidas para microtubo e armazenadas em freezer -20°C até o momento da dissecação, montagem e posterior realização da extração de DNA. Os machos foram armazenados em tubos contendo álcool 70% para posterior preparação, montagem e identificação.

4.2.1.2.1 Identificação morfológica das espécies de flebotomíneos

No Laboratório de Biologia parasitária (Biopar) os machos foram imersos em solução de hidróxido de potássio a 10% por 24 horas. Posteriormente, foram colocados em uma solução de ácido acético 10% por 20 minutos em seguida em ácido acético 100%. Logo depois os espécimes foram alocados em álcool 70% por 15 minutos, álcool 80% por mais 15 minutos, álcool 90% por 15 minutos e por fim álcool absoluto, 15 minutos. Após este processo, os machos foram imersos em Eugenol por 24 horas (SARAIVA, 2008). Em seguida os mesmos foram montados em lâmina com Bálsamo do Canadá. Para a identificação específica dos flebotomíneos foi realizada observação dos caracteres morfológicos internos e externos, através de microscopia ótica, seguindo a chave e a classificação proposta por Galati (2003).

As fêmeas foram levadas ao Grupo de estudos em leishmanioses do Centro de Pesquisa René-Rachou – FIOCRUZ/MG para identificação e análise molecular. Para identificação foram dissecadas em uma lâmina contendo PBS e depois alocadas em Berlese (LANGERON, 1949, modificada) “overnight” para clarificar. Para a identificação foi utilizada a cabeça para a visualização do cibário e os quatro segmentos finais, no 8º tergito, para a visualização da espermateca, seguindo a chave de Galati (2003).

4.2.2. Avaliação da infecção natural de flebotomíneos por espécies de *Leishmania*

O DNA das fêmeas de flebotomíneos foi extraído utilizando o kit GenraPuregene(Qiagen, EUA), seguindo o protocolo de Quaresma et al (2011) modificado.

As fêmeas de flebotomíneos foram maceradas em 300µL de solução delise celular e à mistura foi adicionado 1,5 µL de proteinase K. A solução foi homogeneizada em vortex e incubada a 55° C overnight. Após o período de incubação, foi adicionado 1,5µL de RNase à solução, que foi homogeneizada em vortex e incubada a 37° C por trinta minutos. Posteriormente as amostras foram incubadas por três minutos no gelo e adicionados 300µL de solução de precipitação de proteínas. Os tubos foram agitados por 20 segundos em alta velocidade seguidos de centrifugação por três minutos a 13000 x g, sendo a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se 300µL de isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente, seguida de outra centrifugação por três minutos a 13000 x g. Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo secado invertido contra um papel absorvente em capela. Adicionou-se etanol 70% ao tubo já seco passou-o no vortex, em seguida realizou-se outra centrifugação a 13000 x g por quatro minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado invertido em um papel absorvente para secar. Ao final, adicionou-se 30µL de solução de hidratação de DNA e passou-se o tubo nos vortex. As amostras foram incubadas a 65° por uma hora e posteriormente deixadas a temperatura ambiente overnight.

Para PCR dirigida ao Internal Transcribed Spacer I (ITS I), as amostras foram aquecidas a 37°C por 20 minutos, em seguida 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 primers (LITSR:5´CTGGATCATTTTCCGATG3´eL5.8S:5´

TGATACCACTTATCGCACTT3') a 10µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase a 10U/ µL, 1,25 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 12,25 µL de H₂O deionizada 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.

As amostras foram então submetidas à eletroforese em um gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio (10mg/mL) um padrão de pesomolecular de 100 pares de base, 20 µg de DNA extraído de formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75) como controle positivo e os reagentes da PCR como controle branco.

4.2.3 Identificação das espécies de *Leishmania* RFLP

Para a identificação da espécie de *Leishmania* os produtos positivos da PCR foram digeridos com *HaeIII* (10U/µL). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 mL, contendo 1µL de *HaeIII* (10U/mL), 1,5 mL de tampão da enzima, 2,5 mL 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 os seguintes perfis de *Leishmania*: *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das espécies de flebotomíneos

Durante todo o período de coleta foram capturadas 60 fêmeas e 26 machos de nove diferentes espécies de flebotomíneos. Em função da perda de algumas estruturas taxonômicas essenciais para a identificação, foi possível chegar até o nível de espécie para 38 fêmeas (Tabela 1).

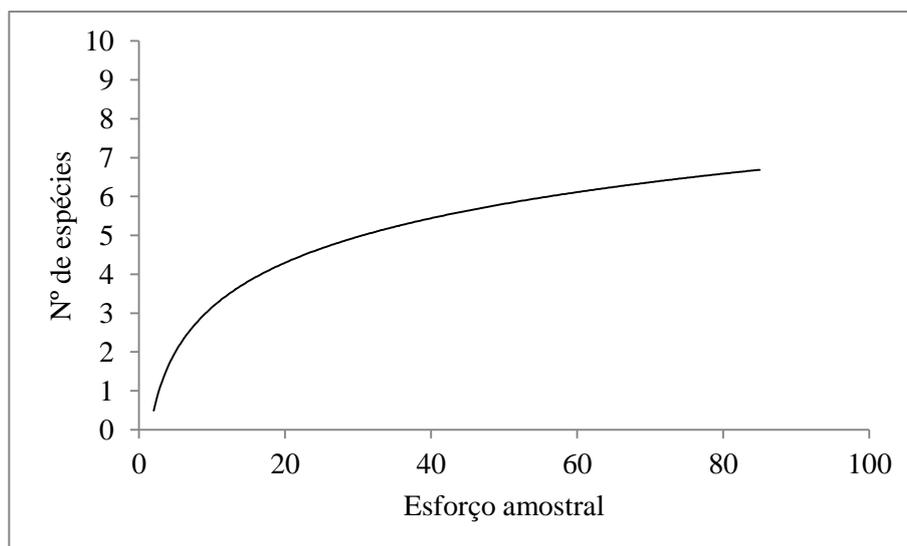
Tabela 1- Espécies de flebotomíneos capturadas no município de Lavras-MG, durante o período de fevereiro de 2016 a março de 2017.

Espécie	Macho	Fêmea	Abundância Relativa	Total
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	22	21	0,67	43
<i>Migonemyia migonei</i>	2	8	0,16	10
<i>Evandromyia cortelezzi</i>	0	3	0,05	3
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	2	0,03	2
<i>Ev. sallesi</i>	1	1	0,03	2
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	1	0,01	1
<i>Ev. lenti</i>	0	1	0,01	1
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1	0	0,01	1
<i>Pressatia</i> sp.	0	1	0,01	1
Total	26	38	-	64

Fonte: Do autor (2017)

No presente estudo, foram coletados 86 flebotomíneos pertencentes a nove diferentes espécies. A riqueza e a diversidade de espécies de uma determinada região dependem de vários fatores, dentre eles do esforço amostral. Neste sentido, as curvas de acumulação de espécies permitem avaliar o quanto um estudo se aproxima de capturar todas as espécies do local. De acordo com a Figura 8 verifica-se um incremento no número de espécies a cada esforço amostral. A curva ascendente, sem estabilização indica que a riqueza total de espécies ainda não foi obtida, havendo, portanto, a necessidade de novos estudos para o conhecimento da fauna flebotomínica da região de estudo.

Figura 8- Curva de acumulação de espécies de flebotomíneos coletados no período de fevereiro de 2016 a março de 2017, no município de Lavras, MG.



Fonte: Do autor (2017).

À exceção de *Lu. longipalpis*, que foi a espécie mais abundante verificou-se uma baixa abundância relativa da maioria das espécies de flebotomíneos do município de Lavras-MG (Tabela 1). Apesar disso, de acordo com a Figura 8, verificou-se uma diversidade importante, uma vez que o número de espécies encontradas corresponde a 7,21% do total de 97 espécies de flebotomíneos já registradas em todo o estado de Minas Gerais (ANDRADE & DANTAS-TORRES, 2010; ANDRADE & GALATI, 2012; BARATA et al. 2012).

Lutzomyia longipalpis foi a espécie com maior abundância relativa (0,67) dentre os flebotomíneos identificados (Tabela 1). Esta espécie é caracterizada por uma elevada adaptabilidade a ambientes antrópicos, sendo frequentemente encontrada no meio urbano (MICHALSKY et al., 2011). No Brasil, esta é a espécie mais importante no ciclo de transmissão de *Leishmania infantum*, responsável pela forma viscerotrópica da doença e

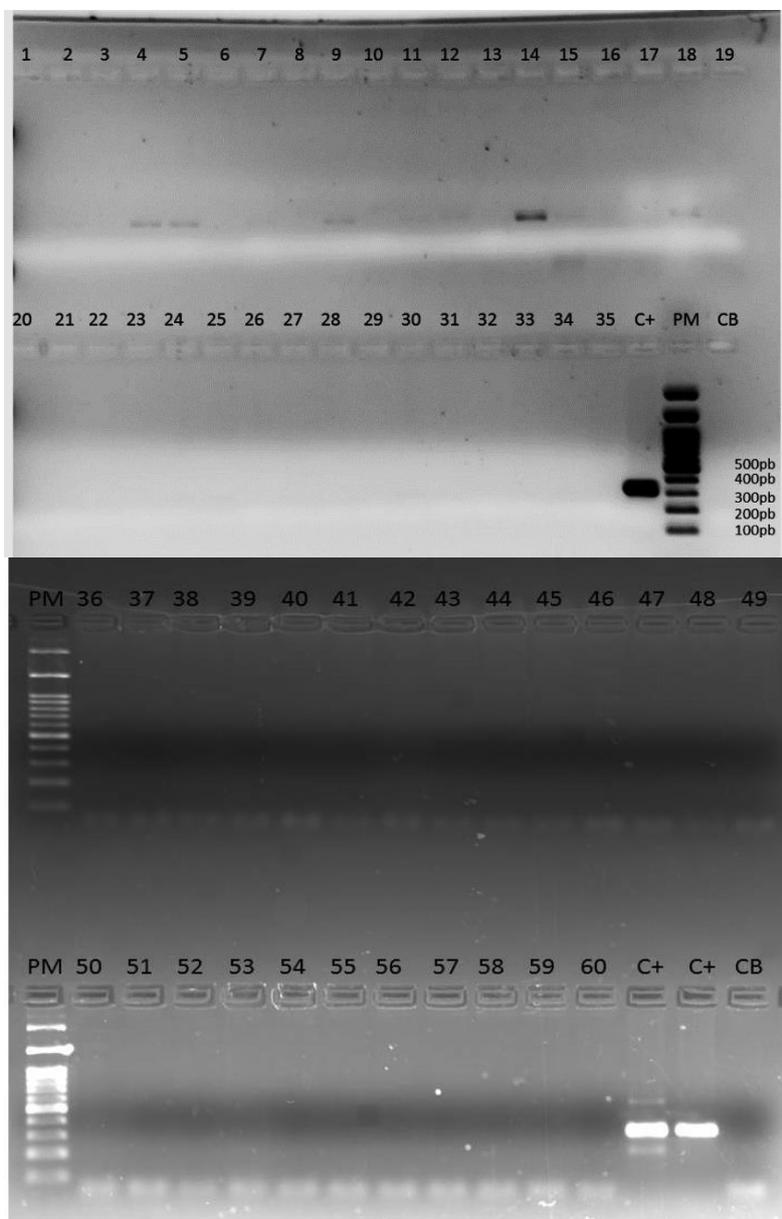
consequentemente a forma clínica mais grave de leishmaniose (GONTIJO & MELO, 2004; LAINSON & RANGEL, 2005).

Com relação às demais espécies encontradas merecem atenção: *Ev. sallesi* descrita como vetor potencial de *Leishmania infantum*; *Migonemyia migonei* descrita como vetor potencial de *Leishmania infantum*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis* e *Ny. whitmani* descrita como vetor comprovado da *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania shawi* e provável da *Leishmania lainsoni* (AKHOUNDI et al., 2016).

Durante a realização do presente estudo, foi identificado o primeiro relato autóctone de infecção natural humana por *Leishmania infantum*, no município de Lavras – MG. A fim de conhecer a fauna flebotomínica da área do caso, localizada no bairro Morada do Sol II, foi realizada a colocação de armadilha luminosa tipo HP, por três dias consecutivos, no peridomicílio do caso. Nesta coleta de conveniência foram identificados espécimes de *Evandromyia sallesi* e *Pressatiasp.*. Não foram identificados flebotominíneos da espécie *Lu. longipalpis*. Estes dados apontam para a necessidade de novas coletas na região do caso humano, a fim de se conhecer a epidemiologia da LV humana e os vetores envolvidos em sua transmissão.

Com relação à infecção natural de flebotomíneos por parasitos do gênero *Leishmania*, à análise molecular por utilizando PCR, verificou-se que das 60 fêmeas capturadas cinco (8,33%) foram positivas para a infecção por *Leishmania* (Figura 9). As fêmeas positivas (número 4, 5, 9,14 e 18) eram todas da espécie *Lutzomyia longipalpis*.

Figura 9--Resultado da PCR de 60 flebotomíneos coletados

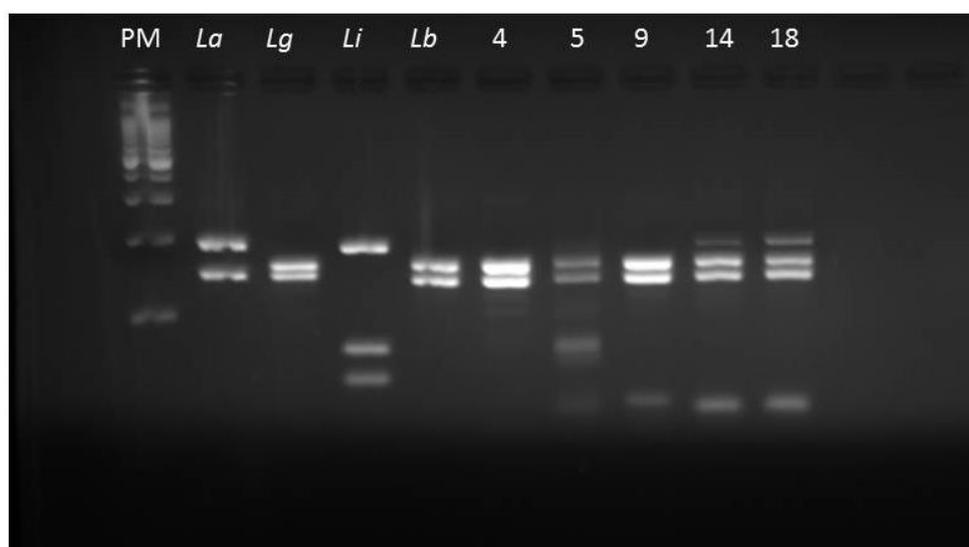


Legenda: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados da reação de PCR realizada com fêmeas de flebotomíneos coletadas. PM - peso molecular de 100pb; C+ - controle positivo de *L. infantum*; 1 a 60 - amostras de flebotomíneos; CB - controle branco. Fonte: Do autor (2016).

5.2 Identificação das espécies de *Leishmania* encontradas parasitando flebotomíneos

As cinco amostras positivas foram então submetidas à PCR RFLP para identificação da espécie de *Leishmania* (Figura 10). Segundo essa análise os insetos estavam infectados com *Leishmania braziliensis*.

Figura 10- Resultado da PCR RFLP dos cinco flebotomíneos positivos; as *Leishmanias* infectantes eram todas da espécie *Leishmania braziliensis*.



Legenda: Gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados da reação de RFLP realizada com as cinco fêmeas de flebotomíneos positivas para a infecção. PM - peso molecular; La- *Leishmania amazonensis*; Lg- *Leishmania guyanensis*; Li - *Leishmania infantum*, Lb- *Leishmania braziliensis*; 4, 5, 9, 14, 18 - amostras de flebotomíneos. Fonte: Do autor (2016).

Não há relatos em literatura da infecção de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania braziliensis*. Esta espécie é relatada como vetor da *Leishmania infantum* e da *Leishmania wellcomei* (SHARMA; SINGH,

2008). *Leishmania braziliensis* é comumente encontrada infectando *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia (N.) whitmani* (RANGEL; LAINSON, 2009).

A incriminação de determinados vetores comprovados ou potenciais para determinada *Leishmania* é uma questão controversa (AKHOUNDI et al., 2016), há, no entanto, cinco critérios estabelecidos para determinar uma dada espécie como vetor, sendo eles: a observação de dados epidemiológicos, o comportamento alimentar do flebotomíneo no hospedeiro animal, o isolamento dos parasitos promastigotas dos flebotomíneos, ocorrência do ciclo de vida completo do parasito no vetor e a transmissão experimental do parasito através do repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK et al., 1986). A detecção, por meio de PCR, do DNA de *Leishmania* no inseto foi um critério adicionado aos parâmetros citados acima, sendo que este, isoladamente, não é suficiente para incriminar uma espécie como vetor (AKHOUNDI et al., 2016).

O presente trabalho aponta para a necessidade de estudos que comprovem a competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* na transmissão da *Leishmania braziliensis*.

A diversidade de espécies encontradas no município, o número de casos de cães positivos e o caso notificado de uma paciente humana com LV e LT apontam para um grave problema de saúde pública que merece atenção por parte dos órgãos competentes e da população. É preciso que sejam tomadas medidas profiláticas para que a cidade não se torne uma área endêmica para LV humana.

6 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínica, da área de estudo localizada no município de Lavras – MG apresenta uma grande diversidade de espécies, sendo o *Lutzomyia longipalpis* a espécie mais abundante nas áreas de estudo. A técnica de PCR convencional foi capaz de detectar a infecção natural *Lu. longipalpis* por *Leishmania braziliensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G. M. et al. Ecology of sandflies in Serra do Mar, Itaguaí, state of Rio de Janeiro, Brazil. I - Sandfly fauna and prevalence of the species in collections sites and method of capture. **Caderno de Saúde Pública**, v.12, n.2, p.195-206, 1996.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.1-40, 2016.

ALEXANDER B. et al. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Northern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.387-395, 1992.

ALEXANDER, B.; USMA, M. C. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.88, p.543-549, 1994.

ALMEIDA, P.S. et al. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.54, p.304-310, 2010.

ANDRADE, A. J.; DANTAS-TORRES, F. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, v.39, p.115-123, 2010.

ANDRADE, A.J.; GALATI, E. A. B. A New Species of *Evandromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) From Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.49, p.445-450, 2012.

ANDRADE, H. M. et al. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.4, p.231-238, 2006.

ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v.30, n. 13, p.1269-1281, 2000.

AZEVEDO, A. C et al. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous

Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.8, 2008.

AZIZI, K. et al. Molecular detection of *Leishmania* parasites and host blood meal identification in wild sand flies from a new endemic rural region, south of Iran. **Pathogens and Global Health**, v.110, n.8, p.303-309, 2016.

BADARO, R. et al. New Perspectives on a Subclinical Form of Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.6, p.1003-1011, 1986.

BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p.481-487, 2004.

BARATA, R.A.; MEIRA, P.C. L. S.; CARVALHO, G. M. L. *Lutzomyia diamantinensis* sp. nov., a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae) from a quartzite cave in Diamantina, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, p.1006-1010, 2012.

BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, v.99, p.125-146, 1989.

BARÇANTE, T. A. et al. First report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz, Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in Southern Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.40, n.2, p 412-414, 2015.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BIBLIOTECA DE MANGUINHOS (Rio de Janeiro). Fiocruz. **Série Doenças: Leishmaniose**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/bibmang/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infol=102&sid=106>>. Acesso em: 24 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento leishmaniose visceral (calazar)**. Brasília: Ministério da Saúde, 1996. 85p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF, 2010, 180 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2012. Leishmaniose Visceral Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de

- Notificação - Sinan Net. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0205.def>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- BRASIL. Portal da Saúde, 2014. **LV-Casos**. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/20/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- BRAVO-BARRIGA, D. et al. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: Update on distribution and risk factors associated. **Acta Tropica**, v.164, p.414-424, 2016.
- BRAZIL P. P.; BRAZIL B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003. p. 257–274.
- CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A.. Leishmanioses, feridas bravas e Kalazar. Disponível em: <https://www.ufpe.br/biolmol/PQI-PATOS-10dez2005/Pagina_curso_leish_Patos/Downloads/leishmanioses-texto_curto.pdf>. Acesso em: 19 out. 2016.
- CARVALHO, G. M. et al. Molecular Detection of *Leishmania* DNA in Wild-Caught Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From a Cave in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.54, n.1, p.196-203, 2017.
- CAVALCANTI M. P. et al. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia tropical**, v.31, n.1, p1-14, 2008
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Disease**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>>. Acesso em: 19 out. 2016.
- CHANCE, M. L. et al. The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.72, n.6, p.93-110, 1985.
- CHRISTENSEN, H. A. et al. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the central Amazon of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.31, n.2, p.239-242, 1982.
- COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde pública**, v.24, n. 5, p.361-72, 1990.

- COSTA, J. M. L.. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p.3-17, 2005.
- DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G.; FERREIRA E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciências e agrotecnologia**, v.31, p. 1862-1866, 2007.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **Hospital**, v.47, p75-87, 1955a.
- DIAS et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.49-52, 2007.
- FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, [S.l.], v. 2, n. 3, p.47-57, 2012.
- FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. Colaboração para o conhecimento do histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. **Revista de Patologia Tropical**, v.43, n.1, p. 7-25, 2014.
- FONSECA, F. O. R.; BERMÚDEZ, E. G. C.; DESMOULIÉRE, S. J. M.. Distribuição de flebotomíneos (Diptera: Psychodidea) na amazônia legal através de técnicas de informática e geoprocessamento. **Caminhos de Geografia**, v. 11, n. 36, p.142-149, 2010.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Ed. Blücher, 1973. 658p.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; CRISTALDO, G.. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil / Ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral and cutaneous leishmaniosis focus in the Serra da Bodoquena and in an adjacent area of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 2, p.235-261, 2003.
- GALATI, E.A.B. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E.F. & LAINSON, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003. p. 23-51.
- GIANTSIS, I. A. et al. Direct Multiplex PCR (dmPCR) for the Identification of Six Phlebotomine Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae), Including

Major *Leishmania* Vectors of the Mediterranean. **Journal of Economic Entomology**, v.110, n,1, p.245-249, 2017.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L.R.de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p.71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N.. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p.338-349, 2004.

KILLICK-KENDRICK, R. et al.The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. In: RIOUX, J.A. **Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Application Éco-épidémiologiques** , 1986.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, p811-827, 2005.

LAINSON, R; SHAW, J..Evolution, classificationandgeographical distribution the leishmaniasis.**Academic Press Inc.** 1987; p.1-20.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiologyandecologyofleishmaniasis in LatinAmerica.**Nature**, v. 22, n. 273, p. 595-600, 1978.

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

LEVINE et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa.**The Journal of Protozoology**, v.27, n. 1, p37-58, 1980.

MARTINS, A. V.; SILVA, J.; FALCÃO, A. L. Estudos sobre os flebótomos do estado de Minas Gerais. XIII: descrição do Macho e redescrição de fêmea de *Lutzomyia misionensis*(Castro,1960) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.96, p.75-79, 1977.

MARZOCHI, M. C. A. **A leishmaniose tegumentar no Brasil**. In Grandes Endemias Brasileiras, Universidade de Brasília, Brasília.1989.

MICHALSKY, E. M. et al. 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**, v.44, p.255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M. et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotômíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.1, p.58-62, 2011.

MOREIRA, J. Distribuição geográfica. **Gazeta Médica**, Bahia, 1895.

OGAWA, G. M. et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.25, n.1, p.61-68, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/about_disease/en/>. Acesso em: 22 set. 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas**. Washington, DC; PAHO; 2016.

PAULA, M. B. et al. Survey of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, 2003-2004. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.55, n.2, p.85-89, 2013.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A. Q..Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease**, v. 22, n. 1, p.1-13, 1996. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/22/1/1.long>>. Acesso em: 19 out. 2016.

PELISSARI, Daniele Maria et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p.107-110, 2011.

PESSOA, S. B. Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, v.26, n.87, p.41-50, 1961.

PUGEDO H. et al. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.70-72, 2005.

QUARESMA P.F. 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**, v.105, p.579-585, 2011.

RANGEL, E. F. et al. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.3, p.373-374, 1985.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.7, p.937-954, 2009.

ROSSI E. et al. 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**, v.105, p.158-165, 2008.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, n.4732, p.1350-1354, 1985.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p.349–358, 2003.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v.45, n.4, p.255-272, 2008.

SHERLOCK, I.A.; SHERLOCK, V.A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. **Revista Brasileira de Biologia**, v.32, p.209-217, 1972.

SHERLOCK, I. A. A importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2003. p. 15- 21.

SHIMABUKURO, P. H. F.; TOLEZANO, J. E.; GALATI, E. A. B. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, São Paulo, v. 51, n. 27, p.399-441, 2011.

SILVA, O. S.; GRUNEWALD, J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (Viannia) infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.579-582, 1999.

SIMPSON, L.; SILVA, A. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *Leishmania tarentolae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 56, n.3, p.443-458, 1971.

SOUZA, P. R. K. de. *Leishmania* spp: Mecanismos de infecção e evasão da resposta imune. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 2, n. 3, p 56-59, 2004.

VOLPINI, A. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n.1, p.31-37, 2004.

VANEYS, G. J. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmani* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.51, n. 1, p.133-142, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1565128>>. Acesso em: 18 out. 2016.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. 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**, v.54, p.104-140, 1994.

APÊNDICE A- Artigo 1

Título: Molecular characterization of natural infection of *Lutzomyia longipalpis* with *Leishmania braziliensis*

Revista para submissão: Parasites & Vectors

Fator de impacto: 3.234

Molecular characterization of natural infection of *Lutzomyia longipalpis* with *Leishmania braziliensis*.

Joseane Camilla de Castro¹.
e-mail: josecastronutricionista@gmail.com

Tarcisio de Freitas Milagres².
e-mail: tarcisiosou@hotmail.com

Célia Maria Ferreira Gontijo³.
e-mail: gontijo@cpqrr.fiocruz.br

Felipe Dutra Rêgo⁴.
e-mail: felipedutra@cpqrr.fiocruz.br

Ana Paula Peconick⁵.
e-mail: anappeconick@gmail.com

Thales Augusto Barçante⁶.
e-mail: thales.barçante@dsa.ufla.br

Joziana Muniz de Paiva Barçante⁶. Autor Correspondente
e-mail: joziana@dsa.ufla.br.

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras.

³Grupo de estudos em leishmaniose, Centro de Pesquisas René Rachou

⁴ Grupo de estudos em leishmaniose, Centro de Pesquisas René Rachou

⁵ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras.

⁶ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras.

RESUMO

Introdução: As leishmanioses são doenças negligenciadas que atingem grande parte da população mundial causando graves danos à saúde. São causadas por parasitos do gênero *Leishmania* que tem como vetor as fêmeas de flebotomíneos, vivendo alternadamente nesses insetos e em hospedeiros vertebrados. A doença é dividida em dois tipos principais: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral que é o tipo mais grave da doença considerada potencialmente fatal. Para a proposição de medidas eficazes no controle da doença é de extrema importância o conhecimento das relações epidemiológicas que envolvem o parasito, o vetor e seus hospedeiros reservatórios. O presente estudo teve por objetivo investigar a fauna flebotomínica de Lavras, Minas Gerais, Brasil, e através de análise molecular, verificar a ocorrência de infecção dos insetos capturados por *Leishmania* spp.

Resultados: Foram capturadas 60 fêmeas de flebotomíneos das seguintes espécies: *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Evandromyia cortelezzi*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Pressatia* sp. e *Brumptomyia* sp. mostrando uma grande diversidade de espécies no município. A espécie mais abundante foi o *Lutzomyia longipalpis* sendo que cinco destes foram positivos para a presença de DNA de *Leishmania*, sendo elas da espécie *Leishmania braziliensis*.

Conclusões: Não há relatos na literatura da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania braziliensis*, há necessidade de estudos que ratifique a competência vetorial do *Lu.longipalpis* na transmissão de *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose; competência vetorial; flebotomíneos; parasito.

Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* [1] que são transmitidos através da picada de fêmeas de flebotomíneos [2]. O primeiro relato de leishmaniose tegumentar no Brasil ocorreu em 1895, quando Moreira descreveu pela primeira vez, a existência do botão endêmico dos países quentes, chamando “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. Em 1909, Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias em São Paulo, confirmando as formas de amastigotas em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas [3]. A leishmaniose visceral foi relatada pela primeira vez em 1934, quando Penna encontrou amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que foram a óbito com suspeita de febre amarela [4].

O agente etiológico das leishmanioses possui a seguinte posição taxonômica [5]: Reino: Protista; Sub-reino: Protozoa; Filo: Sarcomastigophora; Subfilo: Mastigophora; Classe: Zoomastigophorea; Ordem: Kinetoplastida; Subordem: Trypanosomatina; Família: Trypanosomatidae; Gênero: *Leishmania* [1]. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção do hospedeiro, o mesmo poderá desenvolver dois tipos distintos da doença, sendo eles: a Leishmaniose Tegumentar (LT) que engloba os tipos: cutânea, cutânea difusa e muco cutânea ou a Leishmaniose Visceral (LV) [6-9].

No Brasil, as seguintes espécies do protozoário foram identificadas como causadoras de leishmaniose: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (L.) forattinii*, *Leishmania (V.) lindenbergi*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) utingensis*, *Leishmania enrietti* e *Leishmania infantum* [10].

Popularmente conhecidos como mosquitos-palha, cangalhinhas ou asa-dura [11], os flebotomíneos são insetos de grande importância para a saúde pública uma vez que estão envolvidos na transmissão de patógenos, sobretudo os do gênero *Leishmania* [2]. Existem mais de 900 espécies de flebotomíneos descritos no mundo, sendo que 500 ocorrem na região Neotropical [12]. Cabe ressaltar que o papel vetorial de cada espécie dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino do vetor.

Os flebotomíneos são divididos em oito subtribos, sendo elas: Idiophlebotomina, Hertigiina, Phlebotomina, Sergentomyiina, Australophlebotomina, e Brumptomyiina, Lutzomyiina, e Psychodopygina. Destaque é dado para as subtribos Lutzomyiina composta pelos gêneros *Lutzomyia*, *Migonemyia* e *Pintomyia* e para Psychodopygina composta pelos gêneros *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Trichophoromyia* e *Viannamyia* por serem compostas por flebotomíneos vetores [13-14].

Os vetores são dípteros holometábolos, se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição, medem cerca de 2,5 mm de comprimento, tem cor amarela ou castanha e realizam voo saltado mantendo a asa ereta quando em repouso [15]. A distribuição dos insetos é influenciada por uma gama de fatores, como, por exemplo, vegetação, luminosidade, precipitação pluviométrica e presença de hospedeiros vertebrados [16]. Apenas as fêmeas são hematófagas, uma vez que, necessitam de sangue animal ou humano para maturação de seus ovários [17].

Há uma grande complexidade na relação do parasito com os vetores e hospedeiros fazendo-se necessário o estudo da fauna flebotomínica e perspectivas ecológicas de cada área para que sejam empregadas medidas de controle eficazes com o intuito de reduzir a expansão da leishmaniose [18].

Frente aos dados e a este grave problema de saúde pública, ainda negligenciado, verificou-se a necessidade da realização de estudos que investiguem além dos casos humanos e caninos, a fauna flebotomínica, uma vez que, este inseto é o vetor que mantém o ciclo de transmissão da *Leishmania*. Para tanto o presente estudo teve por objetivo investigar a fauna

flebotômica no município de Lavras-MG, e sua infecção natural por *Leishmania* spp.

Métodos

Área de estudo

Lavras é um município do sul Minas Gerais (Figura 1), localizado a uma altitude de 919 m, latitude de 21° 14' 43 sul e longitude 44° 59' 59 oeste. Possui cerca de 100 mil habitantes. É uma cidade universitária, com localização privilegiada, estando, em linha reta, a apenas 184 km de Belo Horizonte (capital de Minas Gerais), 262 km do Rio de Janeiro e 307 km de São Paulo. Segundo a classificação de Köppen, o clima da cidade é Cwa, ou seja, subtropical de inverno seco com temperaturas inferiores a 18°C e verão quente com temperaturas superiores a 22°C [19].

Coletas

No período de fevereiro a março de 2017, foram instaladas armadilhas luminosas automáticas HP [20] adaptada do modelo armadilha CDC (Centers for Disease Control), no peridomicílio de residências, nos bairros com maior incidência de leishmaniose visceral canina, após realização do inquérito sorológico canino (Figura 2). As armadilhas eram instaladas às 18 horas e retiradas às 06 horas, do dia seguinte, durante três dias consecutivos, resultando em um esforço amostral de 36 horas por ciclo de coleta. Adicionalmente, foram utilizadas armadilhas tipo Shannon nas áreas de vegetação dos bairros e instalação de armadilhas luminosas tipo CDC no peridomicílio da residência do primeiro caso humano de leishmaniose visceral.

Identificação das espécies de flebotomíneos

As fêmeas foram levadas ao Grupo de estudos em leishmanioses do Centro de Pesquisa René-Rachou – FIOCRUZ/MG para identificação e análise molecular. Para identificação foram dissecadas em uma lâmina contendo PBS e depois alocadas em Berlese [21] overnight para clarificar. Para a identificação foi utilizada a cabeça para a visualização do cibário e os

quatro segmentos finais, no 8º tergito, para a visualização da espermateca, seguindo a chave de Galati [6].

Extração do DNA das fêmeas

O DNA foi extraído utilizando o kit Gentra Puregene (Qiagen, EUA), seguindo o protocolo de Quaresma et al. (2011) modificado.

As fêmeas de flebotomíneos foram maceradas em solução de lise celular e à mistura adicionado proteinase K. A solução foi homogeneizada em vortex e incubada a 55° C overnight. Após o período de incubação, foi adicionado RNase à solução, que foi homogeneizada em vortex e incubada a 37° C por trinta minutos. Posteriormente as amostras foram incubadas por três minutos no gelo e adicionado a solução de precipitação de proteínas. Os tubos foram vortexados seguido de centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente, seguida de outra centrifugação. Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo secado invertido contra um papel absorvente em capela. Adicionou-se etanol 70% ao tubo já seco passou-o no vortex, em seguida realizou-se outra centrifugação. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado invertido em um papel absorvente para secar. Ao final, adicionou-se a solução de hidratação de DNA e passou-se o tubo nos vortex. As amostras foram incubadas a 65° por uma hora e posteriormente deixadas a temperatura ambiente overnight.

PCR dirigida ao Internal Transcribed Spacer I (ITS I)

Para o PCR foram utilizados os seguintes primers LITSR:5´CTGGATCATTTCCTCGATG3´eL5.8S:5´TGATACTTATCGCACTT3´, dirigidos a região intergênica do DNA de *Leishmania*. 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 foram utilizados como controle positivo as cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

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, 300-350 pares de base, utilizando o peso molecular (PM) de 1Kb.

Identificação das espécies de *Leishmania* por PCR RFLP

Para a identificação da espécie de *Leishmania* os produtos positivos da PCR foram digeridos com *HaeIII*(10U/ μ L). Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com os seguintes perfis de *Leishmania*: *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum*(MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

Resultados

Foram capturadas 60 fêmeas, das seguintes espécies:*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Atunes & Coutinho, 1939),*Migonemyia migonei* (França, 1920), *Evandromyia cortezezzii* (Brethes, 1923), *Ev. lenti*(Mangabeira, 1938), *Ev. sallesi*(Galvão & Coutinho, 1939),*Pressatia* sp. (Mangabeira, 1942) e *Brumptomyia* sp. (França and Parrot, 1921). A espécie com maior abundância relativa foi *Lutzomyia longipalpis*(Figura 3).

À análise molecular por PCR, cinco *L. longipalpis* mostraram-se positivas para infecção por *Leishmania* (Figura 4).Em PCR RFLPfoi identificada que a espécie infectante para os insetos foi *Leishmania braziliensis* (Figura 5).

Discussão

No município de Lavras-MG, desde 2013, a Vigilância Ambiental da Secretaria Municipal de Saúde em parceria com a Universidade Federal de Lavras, realiza testes sorológicos para verificar a resposta humoral de cães para *Leishmania* sendo encontrados locais com prevalência de 20% de leishmaniose visceral canina. Foi, ainda, notificado durante o estudo, o primeiro caso humano de leishmaniose visceral.

Há uma grande diversidade de espécies de flebotomíneos na cidade sendo *Lutzomyia longipalpis* o mais encontrado. Esta espécie é comprovadamente vetor *L. amazonensis*, *L. infantum*, e *L. wellcomei*[22, 23] e no Brasil, é a mais importante no ciclo de transmissão de *Leishmania infantum*, responsável pela forma viscerotrópica da doença e conseqüentemente a forma clínica mais grave de leishmaniose [4, 24].

No presente trabalho foi encontrada a espécie *Leishmania braziliensis* infectando naturalmente *Lutzomyia longipalpis*, sendo este o primeiro relato dessa infecção. Os flebotomíneos e *Leishmania* apresentam uma história evolutiva que resultou em estreita relação e distribuição semelhante com conseqüente coevolução das espécies [25] o que faz com que o parasito seja restrito aos vetores que são capazes de transmiti-los[26]. Para incriminar uma espécie como vetor vários parâmetros devem ser abordados entre eles: a capacidade do inseto de se infectar com as mesmas espécies encontradas em humanos, a capacidade de manter a infecção parasitária em condições laboratoriais, a presença do mesmo onde ocorre os casos humanos de leishmaniose, a taxa de infecção natural por *Leishmania*, a transmissão do parasito para um hospedeiro durante o repasto sanguíneo [27, 28].

Diversas espécies de *Leishmania* podem ser transmitidas por diferentes vetores [29], 31 espécies diferentes de flebotomíneos foram descritas como potenciais vetores de *Leishmania braziliensis*, destas apenas 15 são comprovadamente vetores entre eles: *Lutzomyia (N.) whitmani* e *Lutzomyia intermedia* são os mais citados[22, 30].

É necessário, entanto, o estudo da competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* na transmissão de *Leishmania braziliensis*, a partir da análise dos cinco critérios, dado que, o trabalho encontrou relação de infecção natural entre estas espécies.

Conclusão

Foram encontradas oito espécies diferentes de flebotomíneos noperidomicílio e área de vegetação em Lavras, sendo a maioria delas *Lutzomyia longipalpis*. Cinco espécimes estavam infectados com *Leishmania braziliensis*. A infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania braziliensis* é um novo achado, a partir do qual se mostra necessário o estudo da competência vetorial deste inseto na transmissão dessa espécie de *Leishmania*.

Abbreviations

DPP: Dual Path Platform; PBS: phosphate buffered saline; DNA: Deoxyribonucleic acid; PCR: Polymerase chain reaction; RFLP: Restriction length fragment polymorphisms;

Acknowledgements

We especially thank Beatriz Mendonça for help with installation of traps.

Funding

We thank the Founding of amparo to the research of Minas Gerais for funding and support Funding bodies played no role in study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication. The contents of this publication are the sole responsibility of the authors.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

Authors' contributions

JCC and TFM were responsible for field collection, JCC and CMFG were responsible for molecular analysis, TAB and JMPB H were responsible for writing the project and acquiring the funding; all authors contributed substantially to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Referências

1. Ross R. Further Notes on Leishmania's bodies. *BMJ*. 1903;11:1401.
2. Fonseca FOR, Bermúdez EGC, Desmoulière SJM.. Distribuição de flebotomíneos (Diptera: Psychodidea) na amazônia legal através de técnicas de informática e geoprocessamento. *Caminhos de Geografia*. 2010;11:142-149.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2010.
4. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Brasi Epi*. 2004;7:338-349.
5. Levine ND , Corliss JO , Cox FE , Deroux G , Grain J , Honigberg BM et al. Newly Revised Classification of the Protozoa. *J Protozool*. 1980;27:37-58
6. Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área

- adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil / Ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral and cutaneous leishmaniosis focus in the Serra da Bodoquena and in an adjacent area of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Patol. Trop.* 2003;32:235-261.
7. Barata RA, Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paula EV, et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004;99:481-487.
 8. Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Paula KM, Gonçalves CM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007;40:49-52.
 9. Pelissari DM, CechinelMP, Sousa-Gomes ML, Lima Júnior FEF. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2011;20:107-110.
 10. Pelissari DM, CechinelMP, Sousa-Gomes ML, Lima Júnior FEF. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2011;20:107-110.
 11. Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature.* 1978;22:595-600.
 12. Shimabukuro PHF, Tolezano JE, Galati EAB. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Pap. Avulsos de Zool. (São Paulo).* 2011;51:399-441.
 13. Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.
 14. Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir Malariol Saneam Amb* 1995; 35:133-142.
 15. Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 207- 255.
 16. Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Pova 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.
 17. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais: I Aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81:431-438.

18. 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.
19. Dantas AAA, Carvalho LG, Ferreira E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. *Ciênc agrotec.* 2007;31: 1862-1866.
20. Puggedo H. et al. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *ReviSoc Bras Med Trop.* 2005;38:70-72.
21. Langeron M. Précis de microscopie. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine Saint-Germain, Paris 1949.
22. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016, 10: 1-40.
23. Sharma U, Singh S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis.* 2008,45:255-72.
24. 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, 110:811-827.
25. Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmaniae* and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot.* 1985; 78: 747–755.
26. Ready PD, Pesson B. Hibridação, introgressão e distribuição de traços vetoriais. *International Symposium on Phlebotomine Sandflies III*, 1999; Montpellier, França.
27. Oliveira EF, Oshiro ET, Fernandes WS, Murat PG, Medeiros MJ, Souza AI et al. Experimental infection and transmission of Leishmania by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11: 1-23.
28. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990;4: 1–24.
29. Quaresma PF, Carvalho GML, Ramos MCN, Andrade-filho JD. Natural de Leishmania sp. Reservatórios e identificação de fonte alimentar de sanduíche de flebotomíneos no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012, 107:480-485.
30. 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.