

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Catieli Gobetti Lindholz

**Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos  
(Diptera: Psychodidae), infectadas por *Leishmania* spp., na localidade Praia das  
Pombas, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil.**

Porto Alegre - Brasil

2015

Catieli Gobetti Lindholz

**Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos  
(Diptera: Psychodidae), infectadas por *Leishmania* spp., na localidade Praia das  
Pombas, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador:** Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Porto Alegre - Brasil

2015

Catieli Gobetti Lindholz

**Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos  
(Diptera: Psychodidae), infectadas por *Leishmania* spp., na localidade Praia das  
Pombas, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovada em: 27 de Março de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Roberta Pinto Utz

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Onilda Santos da Silva

Porto Alegre

2015

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Roselei Gomes Gobetti por ser essa mulher alegre, guerreira e apaixonada pela vida, pelo amor, apoio, dedicação e compreensão nas minhas escolhas. Por me amparar nos momentos de indecisão, e principalmente, impulsionar meus planos com tuas orações e pensamentos positivos: te amo mãe!

Ao meu pai Antonio Eloir Lindholz, um homem batalhador, honesto, companheiro. Graças aos valores passados por ti, e a tua compreensão, amor e dedicação eu estou encerrando mais esta etapa na minha vida... Obrigada por ser o melhor pai do mundo!

Ao meu irmão Alan Gobetti Lindholz, meu espelho e melhor amigo, pelo companheirismo, carinho e amizade. Obrigada por existir, e me ensinar que a maneira mais justa e linda de se multiplicar as coisas, é simplesmente compartilhando!

Às minhas avós, Ana Maria Lindholz e Marlei Gomes Gobetti, pelo carinho, atenção e cuidado que sempre dedicaram a mim.

Aos meus amigos, próximos ou distantes, pela atenção, confiança, carinho, conversas, risadas, cervejas... Em especial à Sarjah Geyger Chedid, minha irmã de alma e coração, pelo compartilhamento de tantas vivências enriquecedoras, pelas conversas reflexivas, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio que sempre somou nas minhas conquistas... E à Daniele Davila pelo carinho, amizade sincera, risos renovadores, e pelo exemplo de disciplina e garra no alcance dos objetivos! Vocês duas foram e são fundamentais na minha vida, são as irmãs que eu não tive!

Ao meu orientador, Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira pela oportunidade, confiança e dedicação na realização deste trabalho. Mesmo com todas as adversidades estamos concluindo esta etapa, e sempre terás meu orgulho e gratidão!

À minha co-orientadora, Dra. Eliane Romanato Santarém pela disponibilidade, atenção e pelo seu sorriso sempre brando ao me guiar e orientar, principalmente nos momentos iniciais desta caminhada.

À professora Dr<sup>a</sup>. Alessandra Loureiro Morassutti, com sua postura atenciosa, calma e ética de trabalhar as dificuldades, pela atenção, disposição e paciência dedicadas ao desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Aramburu da Silva pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas e amigos do Grupo de Biologia Parasitária e Parasitologia Biomédica da PUCRS: Joana Borges, Vivian Favero, Vanessa Fey, Carla Muller, Bianca Cognato, Angélica Ramirez, Carolina Veríssimo e a todos os alunos de iniciação científica pelo aprendizado e agradável convívio ao longo desse período, e em especial a Renata Russo, pela amizade, sinceridade e compreensão, principalmente nos momentos conflitantes na conclusão desta etapa da minha vida.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma maneira participaram deste processo, e contribuíram para que este momento estivesse acontecendo hoje... Obrigada a todos vocês!

*“Aquele que quer aprender a voar um dia precisa primeiro aprender a ficar de pé, caminhar, correr, escalar e dançar; ninguém consegue voar só aprendendo vôo.”*

*Friedrich Nietzsche*

## Resumo

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp., observados nas formas promastigota (flagelada, extracelular) nos hospedeiros invertebrados, e forma amastigota (ausência de flagelo, intracelular obrigatório) nos vertebrados. Atualmente, estas doenças encontram-se distribuídas em 88 países nas Américas, África, Índia, Ásia e Mediterrâneo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 500 mil novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 1,5 milhões de novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorram anualmente, sendo considerada uma das doenças infecto-parasitárias de maior incidência mundial. Transmitidas no momento do repasto sanguíneo pelas fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), as Leishmanioses se mostram em expansão em todas as regiões brasileiras, colocando o país entre os cinco mais afetados no mundo. No Brasil, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de esclarecer as espécies responsáveis pela transmissão de *Leishmania* spp., e conseqüentemente, apontar áreas de importância à saúde pública. A LTA chegou a capital do RS em 2002 e ainda são escassos os estudos de espécies transmissoras neste Estado. Este estudo teve como objetivo investigar as espécies de flebotomíneos ocorrentes em uma localidade rural no distrito de Itapuã, município de Viamão, região metropolitana de Porto Alegre, e verificar, a presença de DNA de *Leishmania* spp. nas fêmeas capturadas. As capturas foram realizadas com armadilhas luminosas tipo CDC (Center for Diseases Control) em ambiente intradomiciliar, peridomiciliar e mata, a fim de verificar possíveis diferenças populacionais e/ou específicas entre os locais. As capturas ocorreram durante três noites consecutivas, no período de Maio de 2013 a Abril de 2014. Os flebotomíneos coletados foram identificados taxonomicamente e as fêmeas foram agrupadas em *pools* de cinco indivíduos cada, de acordo com espécie. Um total de 516 flebotomíneos foi capturado, pertencentes às espécies *Lutzomyia neivai* (37,2%), *Lutzomyia migonei* (34,5%), *Lutzomyia fischeri* (21,7%), e *Lutzomyia lanei* (6,5%). Para extração de DNA foram utilizadas 245 fêmeas. Foram amplificados fragmentos de 120 pares de bases referentes à região conservada do kDNA de *Leishmania* em amostras de *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia fischeri* e *Lutzomyia migonei*.

**Palavras-chave:** Flebotomíneos, *Lutzomyia* spp., *Leishmania* spp. Leishmanioses, Viamão.

## **Abstract**

The Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp., observed in the promastigote forms (flagellated, extracellular) in invertebrate hosts, and amastigote forms (no scourge, intracellular required) in vertebrates. Nowadays, these diseases are distributed in 88 countries in the Americas, Africa, India, Asia and the Mediterranean. According to the World Health Organization, 500.000 and 1.5 million new cases, respectively of Visceral Leishmaniasis and Cutaneous Leishmaniasis occur annually, and considered one of the infectious and parasitic diseases of major global impact. Transmitted at the moment the blood feeding by the female sandflies (Diptera: Psychodidae), Leishmaniasis is the shown to expand in all regions of Brazil, placing the country among the five most affected in the world. In Brazil, many studies have been carried out to elucidate the species responsible for the transmission of *Leishmania* spp., and consequently, prescribe important areas of to public health. However, these approaches are uncommon in the Rio Grande do Sul state. This study aimed to investigate the sandfly species occurring in a rural area in Itapuã district, city of Viamão, metropolitan region of Porto Alegre, and verify the presence of DNA of *Leishmania* spp. in captured females. The collections were carried out with CDC light traps in intradomicile, peridomicile and forest remnants to verify possible population or species differences among the sites. The captures occurred for three consecutive nights, from May 2013 to April 2014. The sandflies were identified and females were grouped in pools of five animals each, according to the species. A total of 516 phlebotomines were captured, pertaining belonging to the *Lutzomyia neivai* (37.2%), *Lutzomyia migonei* (34.5%), *Lutzomyia fischeri* (21.7%), and *Lutzomyia lanei* (6.5%). For DNA extraction, 245 females were used. Fragments of 120 bp of conserved region of *Leishmania* kinetoplast were amplified from samples of *Lutzomyia neivai*, *L. fischeri* and *L. migonei*.

**Key words:** Phlebotomines, *Lutzomyia* spp., *Leishmania* spp., Leishmaniasis, Viamão.



## Lista de Figuras

Figura 1: Lesão de Leishmaniose Mucocutânea .....	4
Figura 2: Paciente com quadro de Leishmaniose Visceral.....	5
Figura 3: Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. coradas pelo Giemsa visualizadas em microscópio óptico.....	7
Figura 4: Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. coradas pelo Giemsa visualizadas em microscópio óptico.....	7
Figura 5: Ciclo de Transmissão de <i>Leishmania</i> spp. ....	9
Figura 6: Fêmea de Flebotomíneo visualizada em lupa com aumento de 40 X.....	12
Figura 7: Ilustração de macho e fêmea de flebotomíneos.....	13

## **Lista de abreviações**

LV - Leishmaniose Visceral

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

WHO - World Health Organization

MS – Ministério da Saúde

SMS – Secretaria Municipal de Saúde

SES – Secretaria Estadual de Saúde

CDC- Center for Disease Control and Prevention

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

DNA- Ácido desoxiribonucleico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido ribonucléico

ANOVA – Análise de Variância

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

## Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Leishmanioses.....	2
1.1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	4
1.1.2 Leishmaniose Visceral (LV).....	5
1.2 Agente etiológico <i>Leishmania</i> spp.....	6
1.3 Reservatórios.....	7
1.4 Ciclo de transmissão.....	8
1.5 Flebotomíneos.....	9
1.5.1 Flebotomíneos Breve histórico taxonômico.....	9
1.5.2 Flebotomíneos: Morfologia.....	10
1.5.3 Flebotomíneos: Alimentação.....	13
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 OBJETIVO GERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4 ARTIGO.....	17
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
6. REFERÊNCIAS.....	35

## 1. Introdução

### 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários unicelulares do gênero *Leishmania* spp., podendo ser observados nas formas promastigotas (flageladas) no trato digestivo e probóscida dos hospedeiros invertebrados, e forma amastigota (ausência de flagelo livre), como parasitos obrigatórios nas células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (Neves *et al.* 1997).

Estas infecções podem se manifestar com diferentes quadros clínicos, podendo causar doença visceral (Leishmaniose Visceral Americana, LV), ou variadas manifestações tegumentares (Leishmaniose Tegumentar Americana, LTA). Tal riqueza de apresentações clínicas se deve a fatores relacionados ao hospedeiro, ao grande número e diversidade de agentes envolvidos em infecções humanas, e ao local de ocorrência. As espécies de maior importância epidêmica no Brasil são *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* (Schriefer *et al.* 2005).

Os hospedeiros invertebrados parecem estar restritos a flebotomíneos hematófagos pertencentes à família Psychodidae (Ximenes *et al.* 2007), os quais até o momento são considerados os vetores específicos de *Leishmania* spp., e apresentam alto grau de complexidade em termos de ecologia e epidemiologia, uma vez que os ciclos zoonóticos apresentam características bastante particulares, dependendo da região onde ocorrem (Scodro *et al.* 2008; Ministério da Saúde, 2011). Apesar disso, a ocorrência de outros modelos de transmissão, tais como mordidas de cães infectados, transmissão transplacentária e sexual, ou pela picada de carrapatos, têm sido alvo de discussão em diversos estudos (Dantas-Torres *et al.* 2010; Chen *et al.* 2014; Campos & Costa 2014; Golçalves *et al.* 2014).

Os hospedeiros vertebrados incluem grande diversidade de mamíferos, tanto silvestres quanto domésticos. Cerca de 20 espécies já foram descritas com infecções por *Leishmania* e embora estas sejam mais numerosas em canídeos e roedores, hospedeiros edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas, incluindo nestes últimos o homem (World Health Organization, 2015). A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre através da picada das fêmeas de flebotomíneos, quando formas promastigotas infectantes são inoculadas no momento do repasto sanguíneo (Neves *et al.* 1997).

Atualmente, as leishmanioses encontram-se com ampla distribuição nas Américas, África, Índia, Ásia e Mediterrâneo (WHO, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde, estas patologias são endêmicas em 88 países, com estimativas de 500 e 1,5 milhões de novos casos anuais de LV (MS, 2011) e LTA, respectivamente, colocando esta entre as doenças infecto-parasitárias de maior incidência mundial. No Brasil, estas manifestações têm sido diagnosticadas em todos os Estados, evidenciando a rápida expansão e adaptação do protozoário e seus vetores (MS, 2013). Das 12 espécies de *Leishmania* neotropicais causadoras de doenças em humanos, sete ocorrem em território brasileiro, sendo que cinco destas são endêmicas (Pimenta *et al.* 2003).

Essa riqueza também se estende aos seus vetores, sendo que nas Américas, até 1994 (Young & Duncan, 1994), cerca de 400 espécies e subespécies haviam sido descritas para o gênero *Lutzomyia*, e destas, 229 foram encontradas no Brasil (Rangel & Lainson, 2003). Tais características colocam o país entre os cinco mais afetados por Leishmanioses mundialmente (MS, 2011).

Diversos trabalhos vêm abordando a ecologia e epidemiologia dos flebotomíneos (Silva, 2000; Resende *et al.* 2006; Chen *et al.* 2014; Silva *et al.* 2014), uma vez que o conhecimento da biologia desses insetos colabora no entendimento das relações interespecíficas e com o habitat, e na transmissão das *Leishmanias* em determinada área. Porém, em algumas regiões do sul do país pouco se relatou sobre a ocorrência destes vetores.

O Estado do Rio Grande do Sul teve seus primeiros casos de LTA no início da década de 80, quando casos autóctones foram registrados no noroeste do Estado. Anos depois, em 2001, o primeiro caso da periferia da capital Porto Alegre foi notificado à Secretaria Estadual de Saúde (Razera *et al.*, 2005). Após investigação epidemiológica o caso foi confirmado, e a região passou a ser considerada como “área de risco de transmissão de Leishmaniose Cutâneo-Mucosa” (Secretaria Municipal de Saúde, 2002).

Em 2008, houve registro dos primeiros casos autóctones de LV em cães, e em 2009 a doença foi notificada em humanos, quando o Estado passou a ser considerado área de transmissão também para LV (Secretaria Estadual da Saúde, 2011).

Entretanto, estudos sobre a distribuição geográfica, prevalência das espécies, detecção e identificação de flebotomíneos naturalmente infectados, além da caracterização dos agentes etiológicos através de técnicas de biologia molecular ainda são escassos no Estado do Rio Grande do Sul. Estes conhecimentos, aliados a medidas

sócio-educativas, sanitárias e ambientais, são importantes no sentido de prevenir e controlar estas doenças em áreas de endemismo.

### 1.1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, caracterizada pela presença de lesões ulcerosas indolores, lesões em nódulos ou ainda lesões cutaneomucosas, que atingem regiões nasofaríngeas simultaneamente, ou após uma infecção cutânea inicial, podendo ser fatal pelo acometimento secundário do sistema respiratório (Neves *et al.* 1997). Sua importância também é devida a alta incidência e ampla distribuição geográfica, e pelo risco de assumir formas que resultam em lesões desfigurantes, e conseqüentemente, o sofrimento causado por estas, que reflete nos campos social e econômico, uma vez que, em grande parte dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (Center for Disease Control and Prevention, 2015) (Figura 1).

**Figura 1: Lesão Leishmaniose Mucocutânea**



Fonte: Zea *et al.* 2009

No Brasil, a doença é documentada desde 1855, porém os registros cresceram abruptamente a partir de 1908, com a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil (São Paulo), onde numerosos casos foram notificados, em especial em Bauru, quando a síndrome clínica tornou-se conhecida como úlcera-de-Bauru. Em 1909, Lindemberg, Carini e Paranhos identificaram o parasito causador desta patologia, mas somente em 1920 Cerqueira e Beurepaire-Aragão evidenciaram a transmissão da LTA, colocando os flebotomíneos como vetores da doença (Costa, 1992).

A incidência desta patologia vem aumentando nos últimos 20 anos em todos os Estados brasileiros. No período compreendido entre 1991 e 2010 foram registradas médias anuais de 30 mil casos, com coeficiente de detecção médio de 18,5 casos por 100.000 habitantes (MS, 2013).

Até o momento, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. Além destas, *L. neivai* e *L. fischeri* vêm, frequentemente, sendo encontradas em áreas de transmissão da doença (MS, 2013).

### 1.1.2 Leishmaniose Visceral (LV)

Entre as formas clínicas das leishmanioses, a LV é vista como uma das manifestações de maior gravidade, pois quando não tratada adequadamente determina altos níveis de letalidade (Alencar, 1977) (Figura 2).

**Figura 2: Paciente com Leishmaniose Visceral**



Fonte: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

Cunningham (1885), na Índia, foi o primeiro a observar os parasitos que causavam o “calazar”. Posteriormente, em 1903, William Leishman e Charles Donovan, quase que simultaneamente, descreveram o agente etiológico da doença, e somente em 1931 os flebotomíneos foram identificados como vetores. No Brasil, entre 1936 e 1939, muitos estudos foram realizados por Evandro Chagas e colaboradores, demonstrando a doença em humanos e em cães, com a incriminação do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como provável vetor, e o parasito classificado como *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937 (Neves, 1997).

No Brasil, inicialmente a LV assumiu um caráter predominantemente rural, e nos últimos anos, tem-se observado expansão às áreas urbanas de médio e grande porte. Segundo o Ministério da Saúde, no período entre 1984 e 2002, os números de notificações somaram 48.455 casos. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos, com incidência de dois casos/100.000 habitantes (MS, 2011).

## **1.2 Agente etiológico *Leishmania* spp.**

As leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, Filo Protozoa. Tais parasitos apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: forma promastigota (flagelada, extracelular) (Figura 3), e forma amastigota (ausência de flagelo, intracelular obrigatório) (Figura 4) (Neves *et al.* 1997).

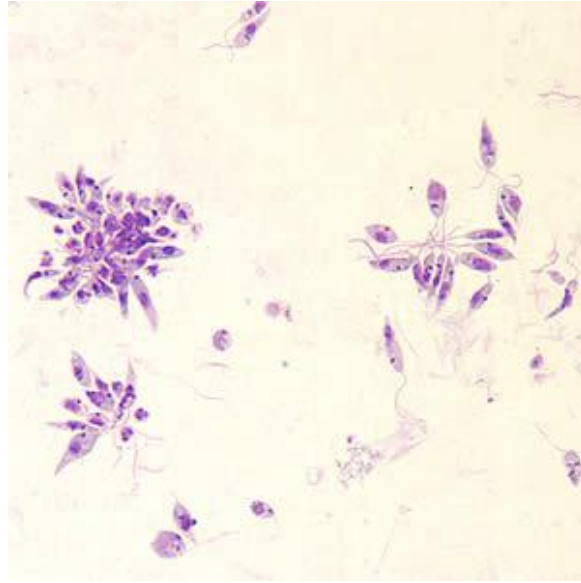
A principal característica que agrupa os tripanosomatídeos é uma estrutura de DNA mitocondrial única e bastante conservada, o cinetoplasto, que contém o kDNA, organizado em uma espécie de rede, com um formato de minicírculos entrelaçados. Comparações entre sequências dos minicírculos de diferentes espécies de *Leishmania* mostraram a existência de uma região conservada de aproximadamente 100-200 pb, enquanto que as regiões restantes são variáveis entre as espécies. Esta região conservada é denominada sequência universal do minicírculo (Rodrigues, 2000). Essas propriedades fazem do kDNA um alvo excelente para o diagnóstico de gêneros e subgêneros *Leishmania*, aliado ao uso de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), aumentando a sensibilidade e especificidade na identificação destes parasitos.

Até o momento, 12 espécies neotropicais de *Leishmania* são universalmente aceitas como agentes de leishmanioses, destas, sete ocorrem no Brasil (Pimenta *et al.* 2003).

As principais espécies encontradas nos casos de LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MS, 2013). Os parasitos causadores da LV estão atualmente agrupados no complexo *donovani*, com três espécies reconhecidas: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo a última a de maior importância epidemiológica em nosso país (MS, 2011).

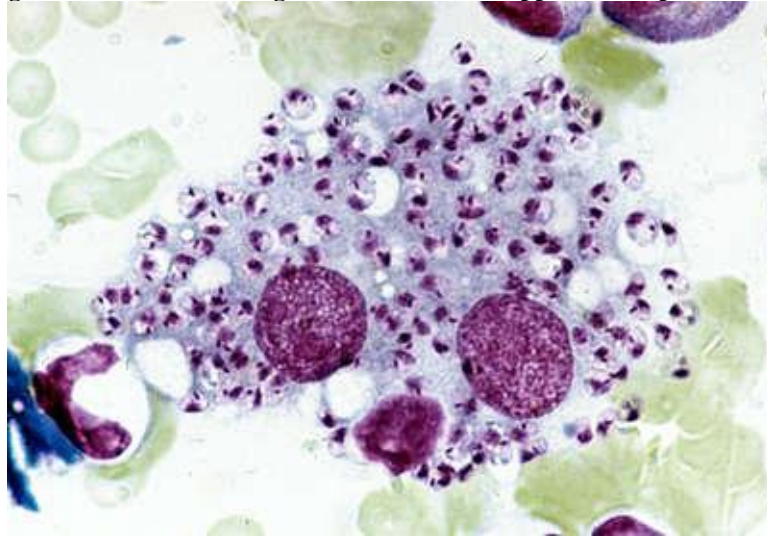


**Figura 3 - Formas promastigotas de *Leishmania* spp. coradas pelo Giemsa**



Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/gallery.html#promastigotes>

**Figura 4 - Formas amastigotas de *Leishmania* spp. coradas pelo Giemsa**



Fonte: <http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniasis/pathogens/>

### 1.3 Reservatórios

O conceito básico de um hospedeiro reservatório para determinada doença consiste em uma espécie que represente uma fonte de infecção a determinado patógeno, e aliado a isso, que permita sua manutenção a longo período, e também garanta a transmissão a outros hospedeiros nos diversos ciclos de transmissão envolvidos (Quinnell & Courtenay, 2009).

Sendo assim, os reservatórios atuam como sistemas ecológicos que possibilitam a sobrevivência dos parasitos, e desta forma devem ser organismos resistentes, equilibrados e que apresentem significativo tempo de vida em determinada escala espaço-temporal (Ashford, 1997).

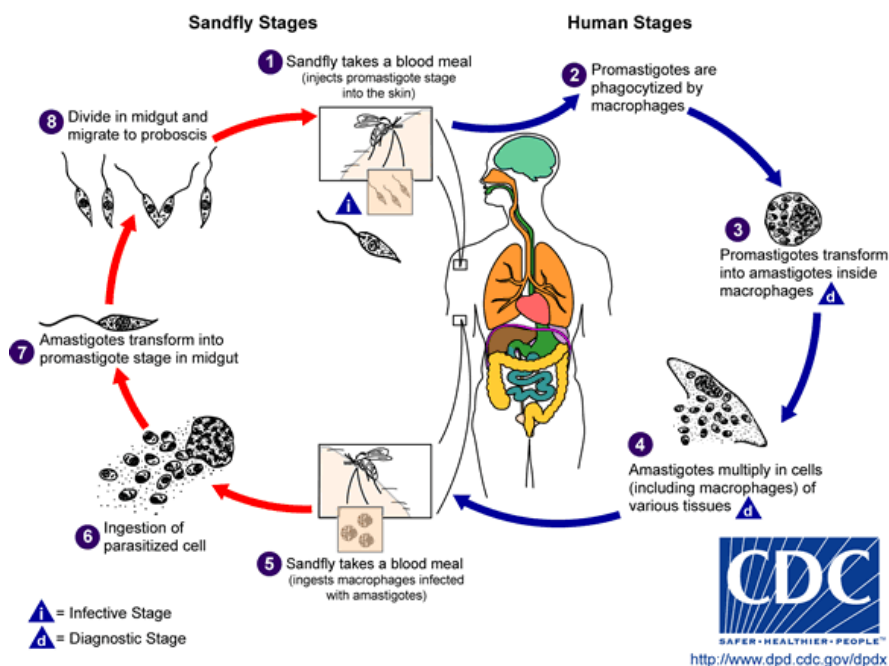
Em áreas endêmicas para leishmanioses nas Américas, muitas espécies de mamíferos silvestres são encontradas naturalmente infectadas por alguma espécie de *Leishmania*, entretanto as taxas de infecção predominantes são documentadas em roedores, marsupiais, edentados, carnívoros e alguns primatas (Barral & Costa, 2011). Altas taxas de infecção também são encontradas em animais domésticos, em especial canídeos, felinos e equinos, representando potenciais fontes de infecção. A importância destes últimos na manutenção dos ciclos está relacionada, principalmente, às altas frequências de infecção relatadas, pela proximidade do homem, e também pela atratividade que exercem sobre os flebotomíneos (Barral & Costa, 2011).

#### **1.4 Ciclo de transmissão**

De maneira geral, o ciclo de transmissão da LV ocorre de forma semelhante ao ciclo de transmissão descrito para a LTA e ambos apresentam variações de acordo com a região geográfica, envolvendo grande diversidade de agentes etiológicos, de flebotomíneos, de reservatórios e hospedeiros (MS 2011, 2013).

A infecção ocorre quando, no momento do repasto sanguíneo, ao picar um hospedeiro susceptível, os parasitos são regurgitados pelas fêmeas de flebotomíneos na forma promastigota. Estas são fagocitadas por macrófagos, onde sofrem transformação para formas amastigotas se multiplicam por divisão binária. Ao serem rompidos, os macrófagos liberam os parasitos na corrente sanguínea e/ou linfática, desencadeando reação inflamatória, e, conseqüentemente, infectando outras células do sistema imune e dando continuidade ao ciclo no hospedeiro vertebrado. Quando sugadas pelo vetor durante outro repasto sanguíneo, as amastigotas sofrem transformação para formas promastigotas, que continuam sua multiplicação, até serem novamente inoculadas em outros hospedeiros susceptíveis (CDC, 2015) (Figura 5).

Figura 5 – Ciclo de transmissão de *Leishmania* spp.



Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

## 1.5 Flebotomíneos

### 1.5.1 Breve histórico taxonômico - compilado de Galati (2003)

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. A primeira espécie descrita foi *Bibio papatasi* Scopoli, 1786 e *Phlebotomus* Rondani, 1840 foi o primeiro gênero descrito (espécie tipo: *papatasi*). Nas Américas, as primeiras espécies descritas foram *Phlebotomus vexatur* Coquillett, 1907 e *Phlebotomus cruciatus* Coquillett, 1907.

A primeira proposta de separação das espécies de *Phlebotomus* em dois grupos, utilizando as cerdas abdominais como caracteres diferenciais foi proposta por Newstead (1911). A genitália masculina e índice alar, entre outros caracteres morfométricos foram utilizados na proposta dos subgêneros por diferentes autores (França, 1919; França & Parrot, 1920, 1921; Larrousse, 1920). Adler e Theodor (1926) utilizaram características das fêmeas, como armadura do cibário, faringe e espermatecas para a diferenciação dos táxons.

Em 1948, Theodor propôs a elevação de *Phlebotomus* e *Sergentomyia* França & Parrot, 1920, no hemisfério leste; e *Lutzomyia* França, 1924 e *Brumptomyia* França & Parrot, 1920 (das Américas) para o nível de gênero.

Outros estudos foram desenvolvidos a cerca da fauna flebotomínica Americana, os quais discutem a sistemática desta família. Alguns exemplos são: Fairchild (1955), com a divisão de Psychodidae nas subfamílias Psychodinae, Trichomyiinae e Phlebotominae. Barretto (1955) sugeriu dois gêneros (*Brumptomyia* e *Sergentomyia*). Em 1962, Barreto manteve *Brumptomyia*, e incluiu grande parte das espécies no gênero *Lutzomyia*. Aceitou o gênero *Warileya*, e incluiu *Hertigia* na subfamília Bruchomyiinae.

Fotattini (1971, 1973) sugeriu sete gêneros: *Brumptomyia*, *Lutzomyia*, *Pintomyia* Costa Lima, 1932; *Pressatia* Mangabeira, 1942; *Psychodopygus* Mangabeira, 1941; *Viannamyia* Mangabeira, 1941 e *Warileya*. Entretanto, Lewis *et al.* (1977) consideraram para o Novo Mundo somente *Brumptomyia*, *Lutzomyia* e *Warileya*.

Em 1994, Young & Duncan revisaram o gênero *Lutzomyia* (com exceção das espécies da América do Norte) e seguiram a classificação proposta por Lewis *et al.* Além disso, adotaram os subgêneros *Coromyia*, *Psathyromyia* e *Sciopemyia*. A classificação sugerida por estes autores é até hoje uma das mais utilizadas na identificação taxonômica dos grupos atuais.

Em 1995, Galati propôs uma nova classificação ao grupo, e através de abordagens filogenéticas, revisou a taxonomia dos flebotomíneos, e dividiu as espécies americanas em 16 gêneros e 35 subgêneros. Em 2003 esta classificação foi revisada, e até o momento, segundo sua classificação, a subfamília Phlebotominae está composta por duas tribos, 6 subtribos e 30 gêneros (Galati, 2003). Aos poucos esta nova classificação vem sendo usada por alguns estudiosos do grupo (Carvalho *et al.* 2010, Zapata *et al.* 2012).

### **1.5.2 Flebotomíneos: Morfologia**

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. A duração de cada estágio varia de acordo com a espécie, com as variáveis ambientais e condições alimentares disponíveis no meio (Brazil & Brazil, 2003).

Os ovos apresentam formato elíptico e cor branca, tornando-se escuros após algumas horas. Ficam aderidos ao solo por uma substância viscosa secretada pelas glândulas acessórias das fêmeas (Forattini, 1972). Geralmente são depositados entre as raízes de plantas, sob folhas no solo, tocas de animais, margem de cursos d'água, sendo que as posturas podem ser feitas isoladas ou em pequenos grupos. A média de postura é de 40 a 60 ovos por fêmea a cada ciclo, e pode ocorrer de três a cinco dias após o repasto sanguíneo (Galati, 2000). Quando no peridomicílio, geralmente as posturas são feitas em solos de chiqueiros e galinheiros, entre raízes de árvores, e nas paredes internas e externas das residências (Teodoro *et al.* 2001).

As formas larvares são pequenas, brancas, com aspecto vermiforme. São constituídas por 12 segmentos além da cabeça (três no tórax e nove no abdômen). No primeiro estágio apresentam um par de cerdas caudais, cujo tamanho está relacionado ao hábitat, e ao passar aos estádios seguintes, estas cerdas se duplicam (Galati, 2000). Apresentam movimentos lentos ao eclodir, alimentando-se das cascas dos ovos e adultos mortos, e à medida que evoluem de estádios passam a apresentar maior mobilidade. De maneira geral, optam por ambientes escuros ou pouco iluminados, e podem apresentar diapausa ou entrar em estado de quiescência (Forattini, 1972).

As pupas são esbranquiçadas, e escurecem à medida que se aproxima a eclosão dos adultos. Caracterizam-se pela retenção da última exúvia larval, que permanece fixa à extremidade posterior (Brazil & Brazil, 2003). Neste período não se alimentam, e permanecem imóveis, fixados ao substrato. A duração deste período é variável de acordo com a espécie e condições ambientais como temperatura, umidade e fonte de repasto das fêmeas (Galati, 2000).

As formas adultas emergem através da fenda longitudinal mediana, formada na face dorsal das pupas. Após a eclosão, os insetos alados permanecem em abrigos naturais, onde as condições microclimáticas lhes protegem da dessecação, até que a quitina corporal ganhe resistência (Forattini, 1972). Apresentam cerca de 2 a 4 mm de tamanho, e seu corpo é densamente piloso (Figura 6), e por vezes apresentam escamas entre as cerdas, asas e esternitos abdominais. Com pernas compridas e articuladas, apresentam a característica de não se afastarem muito dos abrigos naturais, e desenvolvem basicamente dois tipos de vôo: um com movimentos saltitantes sobre a superfície de pouso, e outro continuado, a fim de alcançarem distâncias mais longas

(não mais de 500 m). Esses dois movimentos são silenciosos, o que permite a aproximação aos hospedeiros, sem que estes os percebam (Falqueto, 1997).

Popularmente são conhecidos como “flebotomo”, “asa branca”, “asa dura”, “berebere”, “birigui”, “cangalhinha”, “mosquito palha”, “maruino” e “tatuquira”, e estão distribuídos por praticamente todas as regiões do mundo. São mais abundantes nas regiões tropicais, onde maior diversidade de espécies é encontrada (Martins *et al*, 1978; Galati, 2000).

**Figura 6 – Fêmea de Flebotomíneo**



Fonte: O autor, 2014.

Adultos machos e fêmeas apresentam distinções morfológicas marcantes em suas probóscidas (mais curta nos machos e longa e adaptada para picar e sugar sangue nas fêmeas). Nas fêmeas também é possível diferenciar um conjunto de estruturas presentes no interior da cabeça, chamado cibário, também associado à hematofagia (Forattini, 1972). Os sexos também são distintos pelos últimos segmentos abdominais, onde nos machos encontra-se um conjunto de apêndices bem desenvolvidos (aspecto bifurcado), enquanto que nas fêmeas estes são menores e discretos (forma arredondada) (Figura 7).

**Figura 7 - Ilustração de macho e fêmea de flebotomíneos**



Fonte: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2284&sid=9>

### **1.5.3 Flebotomíneos: Alimentação**

Os adultos (machos e fêmeas) necessitam de carboidratos como fonte de energia para garantir sua sobrevivência. Na natureza, as principais fontes de carboidratos são provenientes de sucos vegetais, e secreções açucaradas de afídeos ou outros homópteros (Forattini, 1972). Ao ingerir substâncias açucaradas, estas são estocadas no divertículo, de onde são levadas ao trato digestivo e absorvidas. Estes açúcares, além de servirem como fonte energética essencial aos flebotomíneos, também representam importante papel no desenvolvimento e infectividade de *Leishmania*, pois agem como controladores da flora intestinal dos vetores, e possuem efeitos bacteriostáticos, além de servir como fonte energética para os próprios parasitos (Pimenta *et al.* 2003).

A atividade hematofágica é exclusiva nas fêmeas, uma vez que o sangue é a fonte para desenvolvimento e maturação dos ovos (Muniz *et al.* 2006). Nestas, as peças bucais são longas, do tipo sugador pungitivo, formadas por um labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e lábio (probóscida), bastante desenvolvida e adaptada para a punção e sucção de sangue dos hospedeiros (Galati, 2000).

Dependente de estímulos ambientais como temperatura, umidade e luminosidade do meio, e proximidade dos hospedeiros, a hematofagia geralmente inicia pouco tempo antes do crepúsculo vespertino, podendo se estender durante toda a noite, com término antes do crepúsculo matutino (Galati, 2000).

A preferência alimentar varia conforme as espécies, e o hábito alimentar destes insetos vem sendo estudado por diversos pesquisadores (Rangel *et al.* 1986; Muniz *et*

al. 2006; Santos *et al.* 2009), entretanto observa-se que mesmo havendo afinidade dos flebotomíneos por determinadas fontes alimentícias, estes se mostram insetos oportunistas, pois sugam o sangue de uma grande diversidade de mamíferos (Santos *et al.* 2009).

Nos flebotomíneos, o repasto sanguíneo já pode ocorrer 24 horas após saída das pupas. Esse período de tempo é necessário para o endurecimento das peças bucais das fêmeas, e desenvolvimento das glândulas salivares, que agem na inibição da homeostasia do hospedeiro e inibição da coagulação sanguínea, facilitando assim o repasto (Pimenta *et al.* 2003). A quantidade de sangue que uma fêmea é capaz de ingerir geralmente é proporcional ao seu próprio peso, que pode variar de 0,1 a 0,6 mg (Galati, 2000).

## 2. Justificativa

As leishmanioses têm mostrado significativo aumento de importância no contexto da saúde pública devido aos processos de urbanização, superpopulação e, principalmente, em decorrência das alterações no ambiente natural (Barata *et al.* 2005). Estes processos de modificação ambiental alteraram os habitats dos flebotomíneos. Algumas espécies que até então apresentavam comportamento estritamente silvestre têm sido encontradas próximas a habitações humanas e em seus entornos, demonstrando a adaptação a ambientes antropizados (Barbosa *et al.* 2008; Eckert & Souza, 2010).

Levando em consideração os primeiros casos autóctones de LTA no município de Porto Alegre, Pita-Pereira *et al.* (2009) realizaram estudos sobre a fauna flebotomínica local, e revelaram a predominância de *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai*, sugerindo a espécie como principal vetora de LTA na localidade investigada. Este dado corrobora com os estudos já descritos pela Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, onde esta espécie foi considerada como principal vetora da LTA, devido a sua característica antropofílica e abundância sazonal (SMS, 2008). Além disso, ressalta-se que *Lutzomyia neivai* era considerada essencialmente silvestre, porém, tem sido relatada em ambientes periurbanos, mantendo a transmissão de *L. braziliensis* entre ciclos zoonóticos e áreas florestais secundárias (Rocha *et al.* 2010, Margonari *et al.* 2010).

Entretanto, nota-se uma grande lacuna no que diz respeito às espécies envolvidas na transmissão em diferentes localidades, bem como limitada compreensão dos aspectos



biológicos do vetor (Souza, 2010), em especial em regiões onde a veiculação dos protozoários é recente. Desta forma, o conhecimento científico e o melhor entendimento sobre o papel específico de cada componente da cadeia representa um dos maiores desafios para a melhoria das estratégias de controle das leishmanioses.

A região metropolitana de Porto Alegre é composta por 34 municípios. Entre estes está Viamão, que faz divisa com Porto Alegre nas regiões leste e sul da capital gaúcha. Recentemente foi confirmado um caso de leishmaniose canina em uma região rural (comunicação pessoal, Centro Estadual de Vigilância em Saúde – CEVS, 2012) no distrito de Itapuã, Viamão, distante cerca de 50 Km de Porto Alegre. Entratanto, nenhuma ação investigativa foi realizada no local.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo maior a identificação taxonômica das espécies de flebotomíneos ocorrentes nesta região, e investigação de infecção natural destes possíveis vetores por *Leishmania* spp.

### **3. Objetivos:**

#### **3.1. Objetivo geral:**

Contribuir para o conhecimento da fauna de flebotomíneos de uma localidade na Praia das Pombas, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

**3.2.1** Identificar as espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), capturadas da localidade Praia das Pombas, Viamão.

**3.2.2** Comparar a proporção das espécies capturadas em três locais: intradomicílio, peridomicílio e mata.

**3.2.3** Verificar a flutuação populacional de flebotomíneos ao longo de doze meses de captura.

**3.2.4** Investigar a presença de DNA de *Leishmania* spp. nos flebotomíneos capturados, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

**3.2.5** Determinar as espécies naturalmente infectadas por *Leishmania* spp.

#### 4. Artigo científico submetido à revista *Acta Tropica*:

##### **First Record of *Leishmania infantum* in Phlebotomines in the Metropolitan Region of Porto Alegre, Brazil – A Risk of Visceral Leishmaniasis**

Catieli Gobetti Lindholz<sup>1</sup>, Alessandra Loureiro Morassutti<sup>1</sup>, Getúlio Dornelles Souza<sup>2</sup>, Leandro de Mattos Pereira<sup>1</sup>, Edmilson dos Santos<sup>3</sup>, José Ricardo de Souza Barradas<sup>1</sup>, Eliane Romanato Santarém<sup>4</sup>, Ana Cristina Aramburu da Silva<sup>5</sup>, Carlos Alexandre S. Ferreira<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>5</sup>Centro de Modelos Biológicos Experimentais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>6</sup>Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

#### **Abstract**

Leishmaniasis includes a group of diseases caused by the protozoa *Leishmania*. The transmission cycles exhibit large numbers of etiological agents, reservoirs and vectors, depending on the region of occurrence. Transmitted by female sandflies, *Leishmania* spp. are not registered in many localities and the arthropod species responsible for the transmission are still unknown. In this study, we investigated the occurrence and prevalence of naturally infected sandflies with *Leishmania* spp. in a rural location within the metropolitan area of the capital of Rio Grande do Sul State, Porto Alegre. A total of 516 phlebotomines were captured in the intradomicile, peridomicile and natural forest, and the species obtained were: *Lutzomyia neivai*, *L. fishcheri*, *L. migonei* and *L. lanei*. All species presented individuals positive for

*Leishmania* by PCR, except *L. lanei*. DNA sequences of *Leishmania* were sequenced and identified as belonging to *Leishmania infantum* complex that are the main causative agent of visceral leishmaniasis. In this context, the first case of human visceral leishmaniasis was recently confirmed in Porto Alegre. These data strongly suggest that the circulation of the *Leishmania* protozoa in the area analyzed may be frequent, and should serve as a major warning for public health epidemiological programs.

**Key words:** Visceral Leishmaniasis; Phlebotomines; *Leishmania infantum*

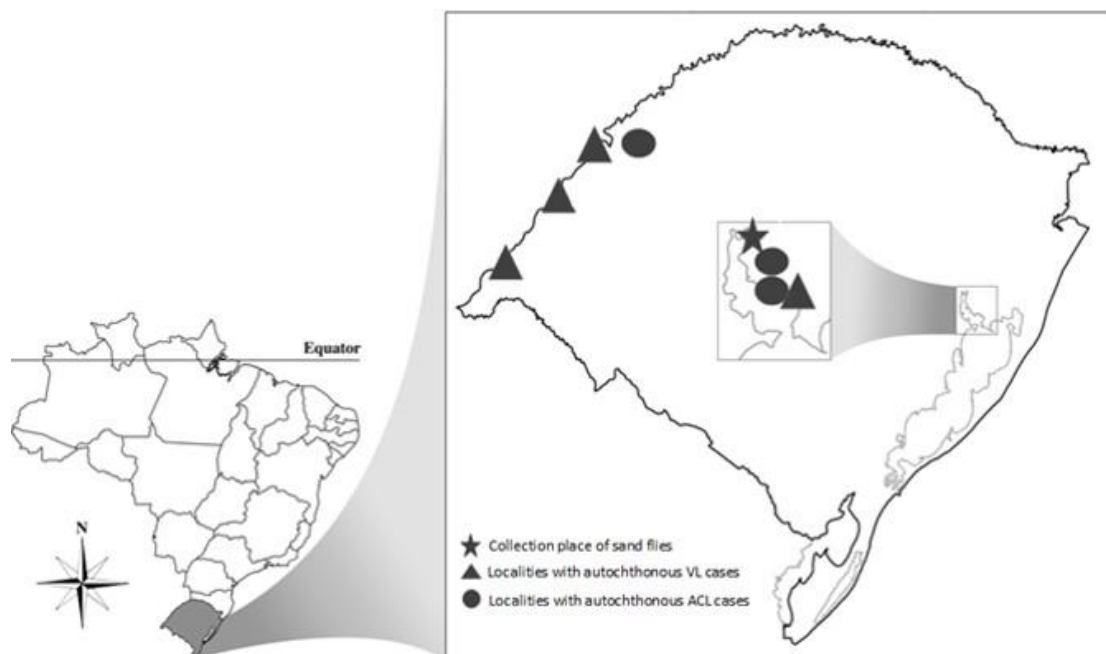
## 1. Introduction

Leishmaniasis is a complex of diseases and infections caused by protozoa of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) that is usually transmitted by sandfly phlebotomine females (Dias et al. 2011). Its occurrence is widely distributed around the world, especially in tropical and subtropical areas, affecting about 12 million people in 88 countries (Kato et al. 2010).

The presence of *Leishmania* species and, therefore, the diseases caused by them, are determined by the existence of competent vectors. In Brazil, according to the definition of the Center for Diseases Control and Prevention of United States of America, the causative agents of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) belongs to the *Leishmania (Viannia)* complex, and Visceral Leishmaniasis (VL) is caused by the *Leishmania (Infantum)* complex, both associated with various species of phlebotomines.

In Rio Grande do Sul (RS), the southernmost state of Brazil, the occurrence of leishmaniasis is relatively recent (Fig. 1). The first cases of ACL were reported in 2001 in the municipalities of Santo Antônio das Missões and Viamão (Santos et al, 2005) and VL is present since 2008 in the municipalities of São Borja, Itaqui and Uruguaiana, near to the Argentina border (Health Department of Rio Grande do Sul State, 2014).

Fig. 1: Rio Grande do Sul State map with regions of occurrence of the LV and ACL autochthonous cases, showing the sample zone of phlebotomines in the metropolitan region of the Porto Alegre.



In 2002, the first case of cutaneous leishmaniasis was reported in the capital of the state, Porto Alegre (Municipal Health Department, Porto Alegre, 2002), and since then a total of 26 new human cases of ACL were confirmed (Souza, G.D. personal communication, 2016). In addition, the environmental monitoring by the local Municipality Health Surveillance Center found two dogs seropositive for *Leishmania* in 2010 in the periurban area of Porto Alegre, which were further confirmed by ELISA, RIFI and cell culture tests, indicating that transmission was active (Municipal Health Department, 2010). Importantly, the first human case of VL was recently confirmed in the municipality of Porto Alegre (September, 2016), releasing an urgent warning statement for the health community regarding the risk of new cases (Municipal Health Department, 2016).

In this scenario, the objectives of this study included the identification of the sandfly species occurring in a region within the metropolitan area of Porto Alegre previously reported to present suspicious animal cases in domicile, peridomicile and forest remnants, as well as evaluate the presence of *Leishmania* infection.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Area of study**

The present study was carried out in Praia das Pombas, Parque Estadual de Itapuã, located in the municipality of Viamão (30°27'S; 50°50'W) (Figure 1), distant 50 Km from Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul state, Brazil. The local climatological conditions are humid subtropical without dry season, with an average annual temperature of 17.5°C. The average annual rainfall ranges from 1000 to 1300 mm (Handling Plan of Itapuã State Park, 1997). The estimated population in the city in 2014 was 251,033 residents (IBGE, 2014).

### **2.2 Sandflies capture**

Insects were captured monthly from May 2013 to April 2014, using CDC light traps, between 6 pm to 7 am, during three consecutive nights. Traps were placed in domicile, peridomicile and forest remnants. The captured specimens were slaughtered by a cooling system. After screening, the phlebotomines were preserved in tubes containing 70% ethanol (v/v). The identification of insect morphology was held in the Laboratório da Seção de Reservatórios e Vetores, Laboratório Central de Saúde Pública, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, Brazil, following Young & Duncan (1994). The species *Lutzomyia neivai* was identified according to Marcondes (1996) and Andrade-Filho et al. (2003) into account the morphologic characteristics of males and females.

### **2.3 Molecular analysis**

Collected females were separated in pools of five individuals from a same species. DNA extraction was done with QIAamp® genomic DNA kit (Qiagen®). After DNA quantification with fluorometer Qubit® 2.0 (Invitrogen), samples were stored at -20 °C.

Amplification was adapted from Pita-Pereira et al. (2005). Briefly, DNA was amplified in a MJ Research PTC-200 DNA Engine thermal cycler (GMI, Minnesota, USA) (MJ Research PTC-200 DNA Engine thermal cycler (Bio-RAD, California, USA) using primers (5'-GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3' and 5'-GGG GTA

GGG GCG TTC TGC GAA-3') to amplify the conserved region of the kinetoplastic minicircle DNA from *Leishmania* spp. The reagents for the PCR assay were prepared using a mixture containing: 2.50  $\mu$ L of 1x PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.0), 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM dNTPs, 24 pmol of each primer, 0.2  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L), and 18.89  $\mu$ L ultrapure water. Eighteen ng of DNA were added to each reaction mix, with final volume of 25 microliters.

The cycling conditions were 94 °C for 12 min, followed by 35 cycles of denaturation (30s at 94 °C), annealing (30 s at 55 °C), and extension (30 seconds at 72 °C), with a final extension step of 10 min at 72 °C. Positive control DNA was obtained from cellular culture extracts of *L. amazonensis* kindly provided by the Laboratório de Parasitologia of Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil). Ultrapure water was used instead of DNA as negative control. The amplified products were purified from gel with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®).

Amplicons were sequenced using the ABI 3130 platform (Laboratório de Genética, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul). For identification of sequences, BLASTN searches were done at National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). The homologous sequences were retrieved using an E-value  $\leq 1e-10$ . For alignment of the sequences was utilized the MUSCLE software (Edgar et al., 2004). The Phylogenetic analysis was performed by maximum likelihood (Wegman, 1972) and the optimal evolutionary model selection was chosen using SMS (Smart Model Selection) through the software Phylml 3.0 (Guindon et al., 2009). The parameters used for phylogenetic inference were model of substitution GTR + Invariant sites with Gamma-distributed estimated, 100 bootstraps and one substitution rate categories.

### **3. Results**

#### **3.1 Morphological identification**

From the total of 516 sandflies specimens collected in the interval of one year, 301 (58.3%) were females and 215 (41.7%) males. The individuals captured belonged to the species *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia fischeri* and *Lutzomyia lanei*. *Lutzomyia neivai* was the predominant species, totalizing 37.2% of all captured

sandflies, followed by *Lutzomyia migonei* (34.5%), *Lutzomyia fischeri* (21.7%), and *Lutzomyia lanei* (6.5%).

The site with the highest number of individuals captured was the peridomicile, totalizing 439 (85%) specimens: *L. neivai* (n=164), *L. migonei* (n=157), *L. fischeri* (n=97) and *L. lanei* (n=21). At the forest ambient, 63 (12.2%) phlebotomines were captured, being *L. neivai* and *L. migonei* again the predominant species. In the intradomicile ambient, only 14 (2.7%) individuals were captured, consisting of *L. neivai* (n=10), *L. migonei* (n=3) and *L. fischeri* (n=1). The majority of sandflies isolated were collected in the warm months (October to March) (98.6%), while in the cold seasons only seven specimens were captured (Fig. 2).

Figure 2: Sand flies species collected in Itapuã, Viamão region (Rio Grande do Sul, Brazil) and their relative abundance

Species of Phlebotomines											
Year	Month	<i>Lutzomyia neivai</i>		<i>Lutzomyia lanei</i>		<i>Lutzomyia migonei</i>		<i>Lutzomyia fischeri</i>		Total	%
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
2013	May	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0,97
	Jun	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0,39
	Jul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
	Aug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
	Sep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
	Oct	17	14	8	26	4	4	2	1	76	14,73
	Nov	42	34	0	0	27	31	0	46	180	34,88
	Dec	11	13	0	0	32	20	0	1	77	14,92
2014	Jan	5	36	0	0	19	6	13	15	94	18,22
	Feb	3	2	0	0	0	8	6	6	25	4,84
	Mar	0	6	0	0	16	6	1	19	48	9,30
	Apr	3	1	0	0	1	4	0	0	9	1,74
Total		86	106	8	26	99	79	22	90	516	100
%		16,67	20,54	1,55	5,04	19,19	15,31	4,26	17,44	100	



### 3.2. Molecular Analysis

After identification, 245 females were grouped according to their species in pools of five individuals each, as follows: 17 pools of *L. neivai*, 15 of *L. fischeri*, 14 of *L. migonei* and three of *L. lanei*. Every pool was submitted to DNA extraction and PCR for amplification of the kinetoplastic target fragment and 11 exhibited positive results. Positive pools were identified from three of the species tested: pools 1, 2, 9, 18 and 45 from *L. neivai* (45.4 % of positive samples), pools 3, 12 and 26 from *L. fischeri* (27.2 %), and pools 23, 25 and 34 from *L. migonei* (27.2 %). None of samples from *L. lanei* pools showed positive amplification. All PCR reactions were done in triplicate.

Amplification of the conserved region of *Leishmania* genus minicircle kDNA (120 pb) was obtained by PCR in samples of *Lu. migonei*, *Lu. fischeri* and *Lu. neivai* and sequenced. The best hits obtained for these sequences (120pb) in BLASTN searches at National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), considering a significant E-value of  $\leq 1e-10$ , indicated homology for sequences of kinetoplast minicircle DNA from the complex *L. infantum*, as shown in Table 1.

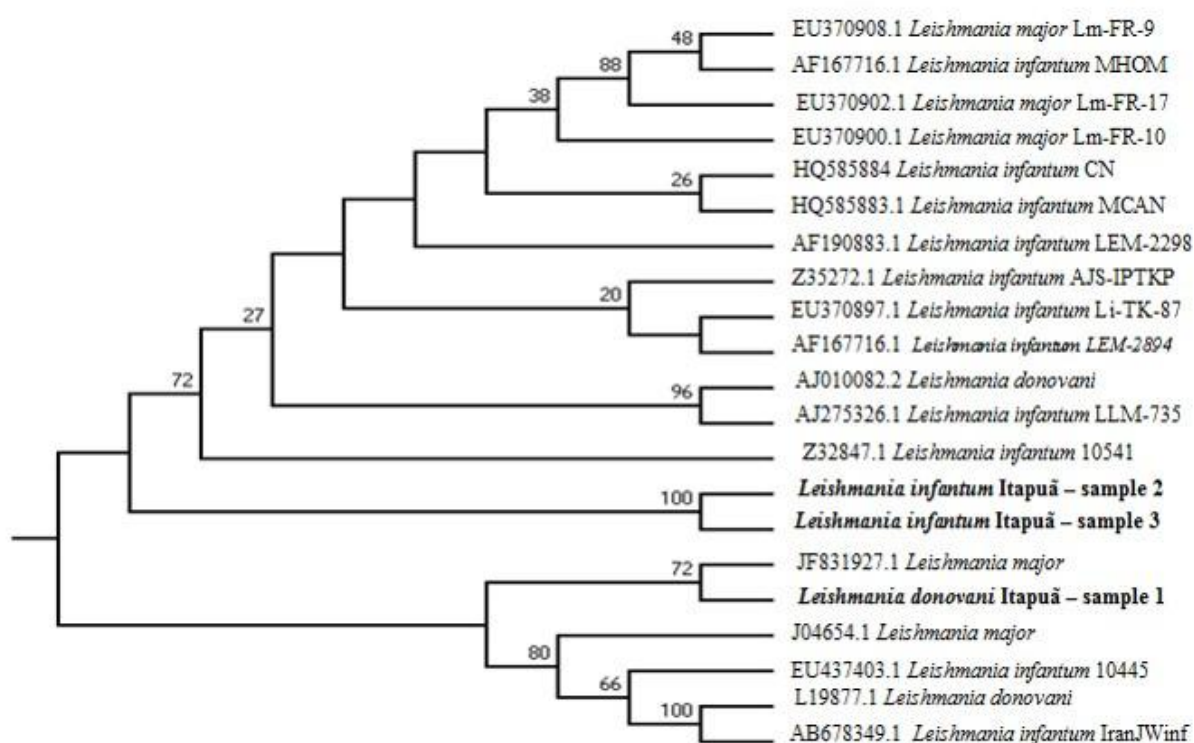
Table 1: Best hits obtained in BLASTN with sequences amplified from the conserved region of kinetoplastid minicircle kDNA.

Sample	NCBI Match	E-value	Identity
<i>Lu. migonei</i>	<i>Leishmania donovani</i>		
Sample 1	isolate MHOM/SD/85/FORSTER	6e-18	65/68(96%)
<i>Lu. fischeri</i>	<i>Leishmania infantum</i>	4e-13	73/85(86%)
Sample 2	isolate Li-TK-85		
<i>Lu. neivai</i>	<i>Leishmania infantum</i>	4e-13	73/85(86%)
Sample 3	isolate Li-TK-85		

The phylogenetic analyses using the maximum likelihood method (Figure 3) with homologous sequences (E-value  $\leq 1e-10$ ) recovered from the BLASTN analysis indicated these sequences are grouped within the *L. infantum* complex. The sample 1 was denominated *L. infantum* Itapuã 1, which was found allocated in the same ancestral

node of *L. major* (J04654.1) with a significant bootstrapped value (72% significance) forming the clade of *L. infantum* complex. The sequences *L. infantum* Itapuã 2 and *L. infantum* Itapuã 3 formed an early ancestral clade alongside of the *L. infantum*, with a bootstrapped value of 100% significance.

Figure 3: Phylogenetic analyses of *Leishmania* sequences found in phlebotomines in the metropolitan region of Porto Alegre, Brazil.



#### 4. Discussion

Leishmaniasis are considered a complex of diseases with heterogeneous eco-epidemiology characteristics, involving a high number of etiologic agents, vectors and reservoirs. These factors in association with the report of increased number of cases worldwide may indicate their emergence as a major human health concern (Ferro et al. 2015). Among the Latin American countries, Brazil presents the highest estimated incidences of Leishmaniasis (Alvar et al. 2012). Indeed, since the first records for ACL and LV in Brazil were described, the occurrence of these diseases have been spreading across the every states (Brazilian Ministry of Health, 2006; Brazilian Ministry of

Health, 2007). The environmental characteristics for *Leishmania* dispersion may be dependent of many factors, including presence of the vectors, etiologic agents and reservoirs.

In Rio Grande do Sul, VL has been reported to occur only in the municipalities with frontier to Argentina (Souza et al. 2009). However, in September 2016 the first autochthonous human case of VL was confirmed in the capital of RS, Porto Alegre (Municipal Health Department, 2016). The occurrence of human cases of VL in RS was preceded by canine cases, highlighting the importance of the canine reservoir in the transmission cycle (Souza et al 2009). Other factors such as economy based on rice cultivation and extensive agriculture, which requires high numbers of rural workers, may act as *Leishmania* reservoirs and propagators. In addition, ACL was initially registered only in the municipalities of Santo Antônio das Missões and Viamão (Santos et al, 2005), however at least 26 cases of ACL were now also confirmed in Porto Alegre (Souza, G.D. personal communication, 2016). These data increases the concern for the expansion and adaptation of the parasite to new areas.

Four species of sandflies were found in different proportions in the metropolitan area of Porto Alegre: *L. neivai* (37.2%), *L. migonei* (34.5%), *L. fischeri* (21.7%) and *L. lanei* (6.5%), what is in accordance with previous studies which described *L. neivai* as the predominant species and the principal vector of ACL in this same area (Pita-Pereira et al, 2009). In addition, studies conducted by the local health governmental service also indicated *L. neivai* as the main vector for ACL, probably due to its anthropophilic characteristic and seasonal abundance. *Lutzomyia* (*P.*) *fischeri* was considered the second most abundant species in RS and also suggested as a potential vector for *Leishmania* spp (Souza et al., 2008). On what concerns to the predominance of female phlebotomines found in this study (Table1), it is in accordance with previous evaluations (Condino et al., 1998; Taniguchi 2010; Silva et al., 2010).

*L. neivai* was also the most abundant species captured in peridomicile, totalizing 164 (31.8%) individuals collected. Similar results were reported by Carvalho et al. (2010) in an area of ACL occurrence in Paraná, another southern state of Brazil. The peridomestic distribution of *L. neivai* can be justified by the presence of domestic animals, since, environments presenting domestic animals as potential hosts, usually present higher numbers of sand flies (Rangel and Lainson, 2003).

On what concerns to the *Lutzomyia migonei* individuals captured, they also represented a high percentage (34.5%) of the phlebotomines captured. This species has been considered strictly as a sylvan species. However, alterations in its distribution and occurrence patterns have been observed. For instance, Rangel and Lainson (2009) reported this species inhabiting home and surrounding areas. Also, according to the Brazilian Ministry of Health (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006), *L. migonei* has been reported in peridomicile areas and is associated with the ACL disease in the peripheries of large urban centers. In fact, Pita-Pereira et al. (2005), using non-isotopic hybridization techniques and PCR multiplex, evidenced natural infection of *L. migonei* with *Leishmania braziliensis* parasites in the state of Rio de Janeiro. Recently, Salomón et al. (2010), Silva et al. (2014) and Rodrigues et al. (2016) demonstrated the occurrence of *L. migonei* in areas of visceral leishmaniasis. This data suggests that *L. migonei* may be a potential vector for different species of *Leishmania*.

Another species identified in this study was *L. fischeri*, which accounted for 21.7% of total captured sandflies. This species was found in peridomicile (18.9%) and forest remanescent area (2.7%). *L. fischeri* occurs in all Brazilian states and has been associated with anthropic environments, being considered a secondary vector in the transmission area of ACL in RS (Souza et al, 2008). In fact, Pita-Pereira et al. (2011), by using a multiplex PCR method, identified sandflies naturally infected with *Leishmania (Viannia)* in Porto Alegre, RS.

The rate of sandflies naturally infected with *Leishmania* reported in most studies is low comparing to the rates found in this study, ranging from 0.4% to 10.3%, even when molecular biology techniques are used (Silva and Grunewald, 1999; Miranda et al., 2002; Oliveira-Pereira et al., 2006, Nascimento et al., 2007). However, the DNA target of those studies was a 70 pb sequence of the conserved region of *Leishmania (Viannia)* minicircle kinetoplast. On the other hand, Pita-Pereira et al. (2005) developed a very sensitive molecular test based on the conserved region of *Leishmania* genus minicircle kDNA, targeting a sequence of 120 pb which was able to detect up to 90% of positive samples (Volpini et al. 2004). Margonari et al. (2010), in a study at Parque dos Gafanhotos, Minas Gerais state (high endemicity area for leishmaniasis) found 39.6% of positive samples for *Leishmania* using a similar methodology. Here, we used the primers proposed by Pita-Pereira et al. (2005) and found 25.5% of sandflies pools positive for *Leishmania* spp.

We demonstrated *Lu. neivai* and *Lu. fischeri* presenting *Leishmania infantum* and *Lu. migonei* indicated the occurrence of *L. donovani*. These data, were supported by phylogenetic analysis, this being a more robust method for species identification. However, it is possible the occurrence in between natural hybrids of *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*, which may hinder the identification of the species.

This possibility could be evaluated by the complete sequencing of the genomes of these parasites. The presence of natural hybrids in between *Leishmania infantum* and *Leishmania major* was described by Volf et al. (2007), which demonstrated the hybrids ability to develop in *Phlebotomus papatasi*, a vector widespread in Europe, Africa and Asia. Therefore, in our work we identified the presence of sequences of *L. infantum* and *L. major* in different *Lutzomyia* species. These data, in association with the positive human cases of leishmaniasis in this region, indicate possible vectors for ACL and VL in this area. These species occur abundantly with high prevalence in areas known for leishmaniasis transmission in different regions of Brazil (Rocha et al., 2010; Guimarães et al., 2014; Silva et al., 2014). The metropolitan area of Porto Alegre requires a particular attention, since it would be at risk of infection about 4,1 million people (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014).

Our data show the occurrence of *Leishmania* circulation and, therefore, the likely presence of competent vectors in the region analyzed, indicating population risk of infection with both ACL and VL. The predominance of insects in the peridomicile found in our study is aggravated by the absence of control and prevention measures in the Porto Alegre metropolitan area. Therefore, local sanitary authorities should intervene in critical steps to the progress of strategies for epidemiological control, since the transmission of leishmaniasis depends on the conditions of exposure of humans to sandflies, and seems to be critical when domestic animals are nearby human habitations.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to CAPES, CNPq, to Sr. João Carlos Krahe, by the local used for collections of phlebotomines used in the study and to Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão (Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) for the samples of *Leishmania amazonensis* used positive controls in this study.

**Financial support:** This research was funded by CAPES/ CNPq (National Council for Scientific and Technological Development of the Ministry of Science and Technology).

**References:**

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PlosOne* 7(5): 356:371.
- Andrade Filho JD, Galati EA, Falcão AL (2003) Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:1059–1065.
- Carvalho MS, Bredt A, Meneghin ER, Oliveira C (2010) Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) in Areas of Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, 19(3): 227-237.
- Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA (1998) Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31(4): 355-360.
- Dias ES, Regina-Siva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, Valadão JL, Lara-Silva FO, Oliveira FS, Pacheco RS, Fortes-Dias CL (2011) Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology* 176: 101-111.
- Edgar, RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 19:32(5): 1792-7.
- Ferro C, López M , Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C: Spatial Distribution of Sand Fly Vectors and Eco-Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Transmission in Colombia. *Plos One* 2: 1-16 (2015).
- Guimarães VCF, Costa PL, Silva FJ, Melo FL, Dantas-Torres F, Rodrigues EHG, Brandão-Filho SP (2014) Molecular detection of *Leishmania* in Phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 56(4): 357-360.

- Guindon S, Dufayard JF., Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2009). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3):307-21.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2014) Nota Técnica: Estimativas da população dos municípios brasileiros com data de referência em 1º de Julho de 2014.
- Kato H, Gomez EA, Cáceres AG, Uezato TM, Hashiguchi Y (2010) Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 814-826.
- Marcondes CB (1996) A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 457–462.
- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva RA, Oliveira ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN (2010) Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *Vector Borne Diseases, Surveillance, Prevention* 47(6): 1212-1219.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2006) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2ª Edição, Brasília DF.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2007) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª Edição, Brasília DF.
- Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Neto M, Barral A (2002) Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 97:185-188.
- Nascimento JC, Paiva BR, Malafronte RS, Fernandes WD, Galati EAB (2007) Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, 49: 119-122.

- Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF (2006) Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 39(6): 540-543.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC (2005) Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99: 905-913.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel F (2011) *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* 120: 273-275.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF (2009) Short report: First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) brasiliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80 (4): 593–595.
- Plano de Manejo Parque Estadual de Itapuã (1997) Porto Alegre, Departamento de Recursos Naturais Renováveis, 158 p.
- Prefeitura de Porto Alegre, Secretaria Municipal de Saúde, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Equipe de Vigilância de Zoonoses (2010). Investigação de Leishmaniose Visceral Canina em Porto Alegre. *Boletim epidemiológico*, n. 44, p. 1-2.
- Rangel E, Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil (2003) Editora Fiocruz, 368p.
- Rangel EF, Lainson R (2009) Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(7): 937-954.
- Rodrigues ACM, Melo LM, Magalhães RD, Moraes NB, Souza Júnior AD, Bevilacqua CML (2016) Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Veterinary Parasitology* 220 (2016): 28-32.



- Santos E, Almeida MAB, Souza GD, Rangel S, Lammerhirt CB, Cruz LL, Bercht DB, Fonseca DF, Neto RA (2005) Situação da Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul. Boletim Epidemiológico. Centro Estadual de Vigilância do Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul 7(2): 1-3.
- Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Laboratório Central de Saúde, Nota técnica conjunta nº 01/2014 Leishmaniose Visceral no Estado do Rio Grande do Sul.
- Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Equipe de controle epidemiológico, Boletim epidemiológico, Porto Alegre (2002) Ano V, 17(2): 1-5.
- Secretaria Municipal de Saúde, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Equipe de Vigilância de Doenças Transmissíveis, Alerta Epidemiológico, Setembro, 2016.
- Rocha LS, Falqueto A, Santos CB, Ferreira AL, Graça GC, Grimaldi Jr G, Cupolillo E (2010) Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 104: 461-466.
- Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz D (2010) *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. Acta tropica 113: 84-87.
- Silva OS, Grunewald J (1999) Contribution to the Sand Fly Fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* Infections. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94(5): 579-582.
- Silva PE, Freitas RA, Silva DF, Alencar RB (2010) Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) in a campina reserve in the State of Amazonas, and its epidemiological importance Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43(1): 78-81.
- Silva RA, Santos FKM, Sousa LC, Rangel EF, Bevilacqua CML (2014) Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal, 23(3): 320-327.
- Souza GD, Gonçalves BRD, Flores C, Rangel S, Santos E, Vilela ML, Azevedo A, Rangel, EF (2008) Monitoramento entomológico dos flebotomíneos (Diptera;

- Psychodidae) do município de Porto Alegre. RS. Boletim epidemiológico. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre 39: 5-6.
- Souza G.D., Santos E. & Andrade-Filho J.D. 2009. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz et Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104:1181-1182
- Taniguchi HH (2010) Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
- Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C (2007). Increased transmission potential of *Leishmania major*/*Leishmania infantum* hybrid s. Int J Parasitol. 37(6):589-93.
- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha A (2004) PCR RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. Acta Tropica, 90: 31-37.
- Wegman EJ (1972). Nonparametric probability density estimation: I a summary of available methods. Technometrics 14(3) 533-546
- Young DG M, Duncan A (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, EUA: Associated Publishers.

## 5. Considerações finais

As Leishmanioses são consideradas infecções extremamente complexas, e nos últimos anos, novos fatores foram adicionados a esta complexidade, tornando estas doenças um desafio à saúde pública mundial: a superpopulação e os processos de urbanização.

No Novo Mundo as Leishmanioses podem assumir diferentes formas clínicas, e estas variações ainda não são totalmente compreendidas. Estudos feitos por Warburg e colaboradores (1994) sugerem a participação de compostos salivares do vetor na variabilidade de apresentação clínica ocasionada pela *Leishmania*. Além disso, a epidemiologia das Leishmanioses só pode ser compreendida através da ecologia dos flebotomíneos, onde o ciclo de vida dos vetores desempenha papel fundamental na epidemiologia destas doenças.

Neste estudo, quatro espécies de flebotomíneos foram coletadas no distrito de Itapuã: *Lutzomyia neivai*, *L. migonei*, *L. fischeri* e *L. lanei*. Esse dado pode ser demonstrativo de riqueza de espécies, entretanto acreditamos que um maior número destas pode estar ocorrendo na região, levando em consideração o número e disposição das armadilhas nos locais amostrais e a quantidade total de noites amostradas.

Para investigarmos a presença de *Leishmania* fizemos uso de iniciadores cujos alvos são regiões conservadas dos minicírculos de kDNA destes parasitos, os quais se mostram extremamente sensíveis à técnicas de biologia molecular (Volpini *et al.*, 2004), e os resultados da PCR mostraram amplificação do fragmento alvo em onze dos quarenta e nove pools de fêmeas submetidos à extração de DNA, totalizando 25,5% das amostras positivas. Tal dado é significativo no sentido de determinar a presença de DNA de *Leishmania* nos flebotomíneos analisados, entretanto essa afirmação por si só, não suporta a incriminação de determinada espécie como vetora de leishmanioses.

Nota-se uma grande lacuna no que diz respeito às espécies envolvidas na transmissão destas doenças em diferentes localidades, bem como limitada compreensão dos aspectos biológicos do vetor (Souza, 2010). Desta maneira, faz-se necessário estudos mais aprofundados a cerca da capacidade vetorial das espécies ocorrentes na região metropolitana de Porto Alegre, sobretudo frente ao atual cenário, onde casos humanos vêm sendo notificados na área urbana do município. A identificação específica dos protozoários nestes insetos, através do sequenciamento genético das amostras positivas,

foi de extrema importância na confirmação de infecção natural dos espécimes coletados. Em adição a isto, a identificação das espécies de *Leishmania* ocorrentes no distrito de Itapuã, associadas aos flebotomíneos pode ser considerada um dado norteador para ações de vigilância em saúde, e estudo e investigação da expansão na distribuição dos vetores de Leishmanioses na região metropolitana de Porto Alegre.

Estes dados, associados à vigilância entomológica, taxas de infecção natural, e a diversidade enzoótica podem fornecer bases apropriadas ao tratamento, controle e profilaxia das Leishmanioses (Gomes, 2002). Desta forma, o conhecimento científico, e melhor entendimento sobre o papel específico de cada componente da cadeia representa um dos maiores desafios para a melhoria das estratégias de controle destas doenças.

**Referências:**

- Alencar JE Leishmaniose visceral no Brasil (1977). Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, v. 17, n. 18: 129-148.
- Andrade AJ (2010). Ecologia química de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.
- Andrade-Filho JD, Souza GD, Falcão AL (2007). Description of a new phlebotomine species, *Evandromyia gaucha* sp. nov. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), from Rio Grande do Sul, Brazil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 102(6): 737-740.
- Ashford RW (1997). What it takes to be a reservoir host. Belgian Journal of Zoology, 127: 85-90.
- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, de Paula KM, Dias ES (2005). Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic área for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38(5): 421-425.
- Barbosa MG, Fé NF, Marcião AHR, Silva APT, Monteiro WM, Guerra JAO (2008). Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41(5): 485-491.
- Barral A, Costa J (2011). Leishmanias e a Leishmaniose tegumentar nas Américas. Ed. A. Barral e J. Costa. CYTED, CNPq. Salvador. 1: 248.

Bates PA (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. 37(10-3): 1097-1106.

Brazil RP, Brazil BG (2003). *Biologia de flebotomíneos neotropicais: flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz p. 257-275.

Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF (2002). Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(4): 299-306

Campos JHF, Costa FAL (2014). Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 56(4): 297-300.

Carvalho GML, Falcão AL, Andrade-Filho JD (2006). Taxonomic revision of phlebotomine sand fly species in the series *davisi* and *panamensis* of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(2): 129-136.

Carvalho MS, Bredt A, Meneghin ER, Oliveira C (2010). Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) in Areas of Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008.. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, 19(3): 227-237.

Chen Z, Liu Q, Liu JQ, Xu BL, Lv S, Xia, S Zhou, XN (2014). Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. *Parasites e Vectors*, 7:237.

Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA (1998). Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São

Paulo, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31(4): 355-360

Costa JML (1992). Leishmaniose Tegumentar Americana: origens e histórico no Brasil. Acta Amazônica, 22(1): 71-77.

Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, Paiva-Cavalcanti M, Figueiredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandão-Filho SP, Alves LC, Otranto D (2010). Detection of *Leishmania* of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. Parasitology Research, (106) 857-860.

Dias ES, Falcão AL, Silva JE (1997). Notes on the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 92: 329-332.

Dias ES, Silva JCF, Silva JC, Monteiro EM, Paula KM, Gonçalves CM, *et al.* (2007). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais.. Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical, 40(1): 49-52.

Di Primio R (1937). Os flebótomos do litoral do Rio Grande do Sul. Arquivos Zoológico Estado de São Paulo, 5: 177-242.

Di Primio R (1932). Sobre a presença de *Phlebotomus fischeri* (Pinto, 1926) no Rio Grande do Sul. Revista Cursos Faculdade Medicina Porto Alegre, 18: 141-149.

Eckert J, Souza GD (2010). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Estrela e primeiro registro de *Lutzomyia pascalei* (Coutinho e Barreto) no Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Biociências, 8(4): 399-402.

Falqueto A (1997). Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo, Brasil. Resumo de tese. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 30: 531-532.

Forattini OP (1972). Entomologia Médica. Editora Edgard Blücher Ltda, 4ª Edição.

- Forattini OP (1960). Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana.. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 2: 195-200.
- Galati EAB (2000). Biologia, sistemática e noções práticas para o conhecimento de flebotomíneos. Curso de controle integrado de vetores, Universidade de São Paulo, SP.
- Galati EAB (2003). Classificação de Phlebotominae: flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, p.23-185.
- Gomes, AC (2002). Entomologic Surveillance. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, USP. Informe Epidemiológico do SUS, 11(2):79 - 90
- Gonçalves LR, Filgueira KD, Ahid SMM, Pereira JS, do Vale AM, Machado RZ, André MR (2014). Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. Brazilian Journal Veterinary Parasitology, 23(3) 407-412.
- Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH (1998). Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31(1): 51-58.
- Margonari C, Menezes JA, Rocha MN, Maia KN, Oliveira ME, Fonseca AL, et al. (2012). Public knowledge about and detection of canine visceral leishmaniasis in urban Divinópolis, Brazil. Journal of Trop Med, Vol 2012, 1:8.
- Martins AV, Williams P, Falcão AL (1978). American sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 195p.



- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2011). Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. 1ª Ed. Editora do Ministério da Saúde, 82p. Brasília, DF.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2013). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª Ed. atualizada. Editora do Ministério da Saúde, 180p. Brasília, DF.
- Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U (2006). Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 40(6): 1087-93.
- Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM (1997). *Parasitologia Humana*. 9ª edição Rio de Janeiro: Editora Atheneu.
- Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN (2003). Interação vetor-hospedeiro: flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, p.275-279.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC (2005). Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99: 905-913.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel F (2011). *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* 120: 273-275
- Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF (2009). Short Report: 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 80(4): 593-595.

Quinnell RJ, Courtenay O (2009). Transmission reservoir host of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136(4): 1915-1934.

Rangel EF, Lainson R (2003). *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 368p.

Rangel EF, Lainson R (2009). Proven and putative vectors of a American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence.. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104(7): 937-954.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA (1986). *Biologia de Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae), em condições experimentais: aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81(4): 431- 438.

Razera F, Blanco LFO, Bonamigo RR (2005). Leishmaniose tegumentar americana: primeiros casos autóctones notificados no Rio Grande do Sul desde 2001 e revisão da literatura. *Revista AMRIGS*, 49(3): 165-170.

Resende MC, Camargo MCV, Vieira JRM, Nobi RCA, Porto NMN, Oliveira CDL, Pessanha JE, Cunha MCM, Brandão ST (2006). Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(1): 51-55.

Rocha LS, Falqueto A, Santos CB, Ferreira AL, Graça GC, Grimaldi Jr G, Cupolillo E (2010). Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil, 104: 461-466.

Rodrigues EHG (2000). Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pernambuco. Dissertação de Mestrado.

Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz D (2010). *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina, 113: 84-87.

Santos DR, Santos AR, Santos ES, Oliveira O, Poiani LP, Silva AM (2009). Observações sobre a atividade diurna de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) na área urbana de Maringá, Paraná, Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 18(3): 227-236.

Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Filho JDA (2006). Estudo dos flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(1): 56-63.

Schriefer ALF, Souza RS, Guimarães LH, Góes-Neto A, Schriefer A (2005). Host and parasite roles in the clinical outcome of leishmaniasis. *Gazeta Médica da Bahia*, 75(1): 46-56.

Scodro RBL, Reinhold-Castro KR, Dias-Sversutti AC, Neitzke-Abreu HC, Membrive NA, Kühl JB, Silveira TGV, Teodoro U (2008). Investigation of natural infection by *Leishmania* in sandflies of Paraná State, southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3): 483-491.

Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Departamento de Recursos Naturais Renováveis, Governo do Estado do Rio Grande do Sul (1996). Plano de Manejo Parque Estadual de Itapuã, 162p. Porto Alegre, RS.

Secretaria Estadual da Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Divisão de Vigilância Epidemiológica (2011). Boletim Epidemiológico: Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. Vol 13, nº1.

- Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Equipe de Controle Epidemiológico (2002). Boletim Epidemiológico: Novembro, Ano V, nº17.
- Shimabukuro, PHF, Tolezano, JE, Galati, EAB. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. Papéis Avulsos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.2011;(27):399-441.
- Silva OS, Grunewald J (1999). Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94: 579-582.
- Silva OS (2000). Studies on sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Parque Estadual do Turvo, RGS, Brazil, and their role in *Leishmania* transmission. Dissertação de Doutorado em Biologia – Universidade de Tübingen, Alemanha.
- Silva PE, Freitas RA, Silva DF, Alencar RB (2010). Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) in a campina reserve in the State of Amazonas, and its epidemiological importance. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43(1): 78-81
- Silva RA, Santos FKM, Souza LC, Rangel EF, Bevilaqua CML (2014). Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. Brazilian Journal Veterinary Parasitology, 23(3): 320-327.
- Souza GD, Gonçalves BRD, Flores C, Rangel S, Santos E, Vilela M, Azevedo A, Rangel EF (2008). Monitoramento entomológico dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do município de Porto Alegre, RS. Equipe de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre. Boletim epidemiológico. Ano X, nº 39.

- Souza GD, Santos E, Andrade-Filho JD (2009). The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 104(8): 1181-1182.
- Souza W (2010). Doenças negligenciadas, ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos, Academia Brasileira de Ciências, 56 p. Rio de Janeiro, RJ.
- Taniguchi HH (2010). Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
- Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O, Ktíhl JB (2001). Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 30(2): 209-223.
- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha A (2004). PCR RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis.. *Acta Tropica*, 90: 31-37.
- Ximenes MFF, Silva VPM, Queiroz PVS, Rego MM, Cortez AM, Batista LMM, Medeiros AS, Jeronímio SMB (2007). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil – reflexos do ambiente antrópico. *Neotropical Entomology*, 36(1): 128-137.
- Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 345(1312): 223-230.

Young DG, Duncan MA (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, EUA: Associated Publishers.

Zapata S, León R, Sauvage S, Augot D, Trueba G Cruaud, C Coulox, A Terán R (2012). Depaquit J. Morphometric and molecular characterization of the series Guyanensis (Diptera: Psychodidae: *Psychodopygus*) from the Ecuadorian Amazon Basin with description of a new species. Infection, Genetics and Evolution 12: 966-977.

<http://www.who.int/topics/en/> Acessado em 21/01/2015.

<http://www.ibge.gov.br/home/> Acessado em 12.02.15.

<http://www.viamao.rs.gov.br/> Acessado em 12.02.15.

<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> Acessado em: 09/02/15.