

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE

MARIA REGIANE ARAUJO SOARES

DISTRIBUIÇÃO DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E
INFECÇÃO NATURAL POR *LEISHMANIA CHAGASI* NA ILHA DE
SÃO LUÍS-MA, BRASIL.

SÃO LUÍS-MA

2006

MARIA REGIANE ARAUJO SOARES

DISTRIBUIÇÃO DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E
INFECÇÃO NATURAL POR *LEISHMANIA CHAGASI* NA ILHA DE
SÃO LUÍS-MA, BRASIL.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e
Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como
parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadores: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo
Prof^a Dr^a. Silma Regina Ferreira Pereira

SÃO LUÍS-MA

2006

Soares, Maria Regiane Araujo

Distribuição de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e infecção natural por *Leishmania chagasi* na ilha de São Luís-MA, Brasil./Maria Regiane Araujo Soares. – São Luís, 2006.

53.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal do Maranhão, 2006.

Orientadores: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo e Prof^a Dr^a. Silma Regina Pereira Ferreira

1. Leishmaniose Visceral-Maranhão. 2. *Lutzomyia longipalpis* I. Título.

CDU 616.993.161 (812.11)

MARIA REGIANE ARAUJO SOARES

DISTRIBUIÇÃO DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E
INFECÇÃO NATURAL POR *LEISHMANIA CHAGASI* NA ILHA DE
SÃO LUÍS-MA, BRASIL.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e
Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como
parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão
pública realizada em 29 de Setembro de 2006, considera a candidata_____.

Profª Drª. Silma Regina Pereira Ferreira
Presidente

Profª Drª. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
1º Examinador

Profª Drª. Ana Lúcia Abreu Silva
2º Examinador

Profª Dr. Carlos Henrique Nery Costa
3º Examinador

A Francisca de Fátima Araujo (minha mãe)
“sertaneja bonita e forte que nem pé de imburana”

A João Fernando (meu afilhado) novo raio de luz a
iluminar minha vida

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza, meu refúgio e proteção;

A minha mãe, exemplo de bondade, força e perseverança;

Aos meus irmãos Márcia e Marcos Araujo e a José Gonçalves e pelo apoio constante;

Ao Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo e Prof^a. Dr^a Silma Regina Ferreira Pereira pela competente orientação, confiança, paciência e, sobretudo pelo “*aconchego*” que me ofereceram em seus laboratórios;

A Prof^a Dr^a Flávia Fernandes pelas valiosas contribuições e conforto nos momentos de angústia;

A Cristiane Carvalho, João Freitas, Luciene Amorim, Santana Viegas, Suelen Rocha, Fernanda Machado, amigas construída neste percurso que tanto contribuíram para a realização deste trabalho;

A Prof^a Dr^a Aldina Barral do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela parceria neste estudo e apoio na realização das análises moleculares;

A D. Branca, D. Ester, Sr. Domingos, D. Marinalva, D. Dilma e D. Antônia e demais moradores das comunidades Preçueira (São José de Ribamar-MA), Thalita e Maresia (Raposa-MA) pela calorosa receptividade, colaboração e apoio durante a pesquisa;

A D. Paulina e Sr. Onedi da Maternidade Municipal de Raposa-MA pela acolhida e, sobretudo pelas conversas agradáveis durante as noites de coleta;

Ao Dr. Carlos Henrique Nery Costa e Prof^a Msc. Ivete Lopes de Mendonça, da Universidade Federal do Piauí, eternos orientadores que fizeram despertar a inquietude da pesquisa;

A Vera Lúcia Barros, Raquel Fonteles, Gabriel Vasconcelos, Patrícia Castelo Branco, Laura Andrade e Ludmila Saldanha pelo apoio na execução dos trabalhos de campo;

Aos amigos do Laboratório de Flebotomíneos da UFPI, Jadson Antunes, Telma Mendonça, Jurandi e Thiago Saraiva pelos momentos de alegria (e muito trabalho!);

A Raimundo José Costa (Centro de Controle de Zoonoses/Teresina-PI) que conduziu meus primeiros passos no estudo dos flebotomíneos;

As amigas Grasielle Cavalcanti, Danieles Guimarães e Teresinha Farias pela grande amizade e estímulo no início desta jornada;

A Rose Andrade, Roberta Amaral, Marcelo Santos, Adailton Diniz, Jardeny Santos, Suellen Uria, Celso Brandão e Claudivã Maia, amigos que me apresentaram “*aos encantos da ilha de São Luís*” proporcionando momentos de imensa alegria, amenizando a saudade de casa;

A Laerte Bessa e Denise Sá, amigos que auxiliaram nos momentos de “*stress*” do meu computador;

Aos amigos da Fundação Nacional de Saúde e incansáveis colaboradores, Jorge Moraes, Gildário Amorim; Raimundo Costa, José Cabral, Rogério Carneiro, Diana Alencar, Roseno Viana;

Aos professores, funcionários e colegas do Mestrado em Saúde Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, pela agradável convivência;

A FAPEMA (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Maranhão) e ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) pela concessão de bolsa e financiamento da pesquisa.

*“Minha vida é andar por este país
pra ver se um dia descanso feliz
guardando as recordações
das terras onde passei
andando pelos sertões
e dos amigos que lá deixei
chuva e sol,
poeira e carvão
longe de casa,
sigo o roteiro, mais uma estação
E a saudade no coração”*

Luiz Gonzaga (Mestre e Rei do Baião)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| APRESENTAÇÃO | 01 |
| Distribuição geográfica e sazonal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Raposa-Maranhão, Brasil | 04 |
| RESUMO..... | 05 |
| ABSTRACT..... | 06 |
| INTRODUÇÃO..... | 07 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 09 |
| RESULTADOS..... | 13 |
| DISCUSSÃO..... | 19 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 24 |
| | |
| Diagnóstico molecular de infecção natural de <i>Lutzomyia longipalpis</i> por <i>Leishmania chagas</i> na ilha de São Luís-MA, Brasil..... | 29 |
| RESUMO..... | 30 |
| ABSTRACT..... | 31 |
| INTRODUÇÃO..... | 32 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 47 |
| | |
| ANEXO | 53 |

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão. Tratam-se de dois artigos, cujo tema central enfoca aspectos de dinâmica populacional e taxa de infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* na ilha de São Luís-MA.

Lutzomyia longipalpis é o principal vetor de *Leishmania chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA) que se configura como um dos principais problemas de saúde pública mundial. Esta espécie, de ampla distribuição geográfica e primariamente silvestre, tem demonstrado uma grande capacidade em se adaptar a vários ambientes, sobretudo nas proximidades ou interior de domicílios em áreas urbanas e periurbanas. Desta forma, a transmissão da LVA passou a atingir centros urbanos de médio e grande porte, modificando o perfil epidemiológico da doença, anteriormente considerada silvestre ou concentrada em pequenas localidades rurais.

No Brasil a LVA tem sido notificada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste, sendo que a última concentra a maioria dos casos. No estado do Maranhão, a partir de 1982, a doença assumiu o caráter urbano e têm sido registrados surtos epidêmicos ao longo dos últimos vinte e cinco anos, somando até 2005, um total de 7.668 casos notificados.

Diversos fatores estão envolvidos no processo de expansão da LVA em áreas endêmicas na ilha de São Luís-MA, dentre eles, os fatores ambientais inerentes à própria localização geográfica e à dinâmica da ocupação humana, uma vez que nas últimas décadas, a ilha foi palco de intenso fluxo migratório em virtude da implantação de grandes projetos industriais. Assim, a modificação dos ecótopos naturais do vetor, aliada às precárias condições de vida da população, resultou na notificação dos surtos epidêmicos registrados.

Com o objetivo de analisar a distribuição geográfica e sazonal de *L. longipalpis*, bem como investigar a infecção natural deste díptero por *Le. chagasi* no município de Raposa-MA, realizou-se o presente trabalho, cujos resultados são apresentados na forma dos seguintes artigos:

1º Artigo: Distribuição geográfica e sazonal de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Raposa-Maranhão, Brasil.

2º Artigo: Diagnóstico molecular de infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania chagasi*, na ilha de São Luís-MA, Brasil.

Os resultados apresentados amparados por pesquisas anteriores realizadas na ilha de São Luís, apresentam dados consistentes que podem contribuir para as estratégias de controle desta endemia.



1º ARTIGO

Distribuição geográfica e sazonal de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Raposa-Maranhão, Brasil.

*Geographic and seasonal distribution of **Lutzomyia longipalpis** (Diptera: Psychodidae) in endemic area of visceral leishmaniasis in Raposa-Maranhão, Brazil.*

Maria Regiane Araujo Soares¹, Roseno Viana da Rocha², Jorge Luiz Pinto Moraes², Gildário Amorim Alves², Silma Regina Ferreira Pereira³, Flávia Raquel Fernandes do Nascimento⁴, José Manuel Macário Rebêlo³

1. Egressa do Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão.
2. Fundação Nacional de Saúde – Maranhão.
3. Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão.
5. Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão.

Endereço para correspondência – José Manuel Macário Rebêlo, Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão. Praça Madre Deus, nº 02, 65.025-560 São Luís-MA. E-mail: macariorebello@uol.com.br.

RESUMO

Lutzomyia longipalpis é o principal vetor de *Leishmania chagasi* Cunha e Chagas (1937), agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA). O estudo foi realizado em dois momentos distintos: no primeiro momento analisou-se a distribuição geográfica do vetor em 14 pontos de coleta no município de Raposa-Maranhão, com notificação da doença no período de 1997 a 2005; no segundo momento realizou-se um estudo retrospectivo com dados coletados no período de julho de 1996 a junho de 1998, com o intuito de analisar a distribuição sazonal do vetor. Constatou-se que *L. longipalpis* apresenta ampla distribuição geográfica sendo registrado em 10 dentre as 14 localidades estudadas (71,4%). O vetor esteve presente ao longo de todos os meses do ano, predominando em março (20,6%) e abril (38,7%), no período chuvoso (85,9%), apresentando menores frequências no período da estiagem (14,1%), entre os meses de agosto (0,8%) e outubro (1,0%). Desta forma, observou-se que a umidade relativa do ar e a precipitação pluviométrica exercem influência significativa sobre a abundância de flebotomíneos. Padrão inverso foi observado em relação à notificação de LVA, que concentrou 66,7% dos casos na estiagem e 11,1% no período chuvoso, indicando que o período de maior densidade do vetor é crítico para o risco em adquirir a infecção. Os resultados obtidos ratificam a necessidade de efetivação das propostas de controle vetorial, podendo subsidiar os órgãos de saúde para a definição das áreas de risco de transmissão de LVA.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*, dinâmica populacional, leishmaniose visceral americana.

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis (Lutz and Neiva) is the main vector of *Leishmania chagasi* Cunha and Chagas (1937), the etiologic agent of American Visceral Leishmaniasis (AVL). Intending to analyze the geographic and seasonal distribution of *L. longipalpis* in areas of AVL focus, 14 points of collections in Raposa, Maranhão state, with notification of illness on the period between 1997 and 2005, was selected. One evidenced that although the expansion of the urban areas, the relative improvements in the sanitation conditions and of the organization of the municipal health services, *L. longipalpis* presents large geographic distribution being registered in 10 localities (71.43%) among the 14 studied. The vector was present throughout every month of the year, predominating in March (20.6%) and April (38.7%), in the rainy period (85.9%), presenting with less frequency in dry period (14.1%), between August (0.8%) and October (1.0%) months. Inverse standard was observed in relation to the notification of AVL, which had concentrated 66.7% of the cases in rainy period and 11.1% in dry period. The density of females (88.9%) observed at the moment where it precedes the register of AVL cases indicates that this period is criticizes for the risk in acquiring the infection. In such a way, it was observed that the relative humidity of air and the rainfall had significant influence on the abundance of sand fly. These data suggest the necessity to effectuation the proposals of vectorial control and can subside the agencies of health for the definition of the risk areas for AVL transmission .

Key-word: *Lutzomyia longipalpis*, dynamical population, American Visceral Leishmiasis.

INTRODUÇÃO

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae), principal espécie envolvida na transmissão da leishmaniose visceral americana (LVA), foi originalmente descrita por Lutz e Neiva em 1912 a partir de espécimes coletados no estado de São Paulo e Minas Gerais¹. Apresenta ampla distribuição geográfica e tem sido registrada nas Américas do Norte, Central e do Sul², o que explica a ocorrência de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e da LVA em, pelo menos, 12 países da América Latina, estendendo-se do norte do México ao sul da Argentina. Nas Américas, o Brasil concentra 90% dos casos da doença notificados em 19 das 27 Unidades da Federação, distribuídas em quatro das cinco regiões, não tendo registro apenas na Região Sul^{3,4}.

Lutzomyia longipalpis tem sido demonstrada em diversos ecossistemas brasileiros, tais como áreas de florestas primárias na Amazônia⁵, pantanal mato-grossense^{6,7}, matas secundárias⁸ e cerrados^{7,9}. De um modo geral, quando parte da cobertura vegetal é substituída por assentamentos humanos, observa-se que a distribuição de *L. longipalpis* coincide com a ocorrência de LVA conforme observado desde os estudos pioneiros de Deane e Deane¹⁰ sobre a epidemiologia da LVA.

Este vetor pode ser encontrado em ecótopos silvestres e antropizados, nas zonas rurais e periurbanas em qualquer período do ano, demonstrando grande flexibilidade ecológica. Neste aspecto, as investigações realizadas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil demonstraram que *L. longipalpis* encontra-se presente em todos os meses do ano, ocorrendo em maior densidade no período chuvoso ou na transição deste com a estiagem, exibindo valores decrescentes ao longo dos demais meses do ano^{5,11,12}. Há indícios de que a estação chuvosa exerça momentos mais propícios à atividade deste flebotomíneo, provavelmente por

tornar o solo e o ar úmidos e a temperatura favorável à proliferação das formas imaturas e a dispersão dos adultos¹³.

Elevada densidade de flebotomíneos tem sido registrada no domicílio e peridomicílio, sugerindo que a presença humana e de animais domésticos criam condições para aumentar significativamente a densidade destes insetos no ambiente antrópico¹⁴. Neste sentido, tem sido registrado que *L. longipalpis* é atraído por abrigos de animais domésticos existentes nas periferias urbanas, exibindo grande associação com galinheiros¹⁵⁻¹⁸. Assim, a presença de *L. longipalpis* associada a este micro-habitat, tem sido amplamente estudada.

A intervenção humana no ambiente natural em virtude da expansão agrícola e da ampliação das áreas urbanas e industriais é fundamental para que agentes etiopatológicos tenham sua distribuição ampliada¹⁹. Desta forma, é factível considerar a domiciliação de *L. longipalpis* e conseqüentemente de *Le. chagasi* como um mecanismo de dispersão das populações naturais para áreas urbanizadas, resultando na modificação do perfil epidemiológico de LVA, anteriormente descrita como uma zoonose silvestre e, nos últimos anos, uma endemia urbana^{3,20-23}.

Nesta perspectiva, a dinâmica da ocupação dos espaços e as constantes alterações ambientais são variáveis importantes na manutenção da doença. Conforme Silva²² o surgimento de LVA na ilha de São Luís, deve-se a fatores ambientais favoráveis à manutenção de criadouros do vetor, aliado às profundas transformações sociais após a instalação de grandes projetos industriais. Este fato ocasionou a migração de grupos populacionais para assentamentos desprovidos das mínimas condições de saúde e saneamento.

Diante do exposto, este artigo visa demonstrar a distribuição geográfica e sazonal de *L. longipalpis*, bem como associar o número de espécimes com o registro de casos de LVA em aglomerados urbanos do município de Raposa-MA.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Raposa-MA, o qual se situa na ilha de São Luís, norte do Estado do Maranhão e abrange uma área de 64 km². Limita-se ao norte e a oeste com o Oceano Atlântico e ao sul e a leste com o município de Paço do Lumiar.

Segundo a classificação de Köppen o clima é tropical e chuvoso (tipo Aw'), onde o mês mais seco registra índice pluviométrico inferior a 50mm²⁴. A temperatura média anual é de 28°C e o regime das chuvas é caracterizado pela divisão do ano em dois grandes períodos bem distintos: o período chuvoso (janeiro a junho) e o período seco (julho a dezembro) apresentando precipitação pluviométrica média anual de 1.600mm e umidade relativa do ar entre 60 a 80%²⁵.

A altitude média é de 5m nas partes mais baixas e 15m nas dunas e nas proximidades dos córregos e vales, embora grande parte encontre-se submersa em água salgada¹⁷.

A hidrografia do município é constituída por praias, lagos e pequenos rios, como o rio Pimenta. Dentre as praias destacam-se Araçagi, Raposa, Carimã, Curupu e Belizário, onde se localiza o terminal pesqueiro constituído por bocas de rios¹⁷.

A cobertura vegetal encontra-se bastante modificada, predominantemente constituída por capoeiras (floresta secundária) e fisionomicamente ainda marcada pela presença de babaçuais (*Attalea speciosa* Mart. Ex. Spreng.) e mangue destacando as espécies *Avicennia* sp e *Rhizophora* sp²⁵.

Quanto a geomorfologia, o município situa-se na zona do Golfão Maranhense, área resultante de intenso trabalho de erosão fluvial do quaternário antigo, posteriormente

colmatada, originando uma paisagem de planícies aluviais, ilhas, lagoas e rios divagantes. Os solos são do tipo Latossolo Vermelho Amarelo, Solos Concessionários Lateríticos e Solos Indiscriminados de Manguê²⁵.

Os primeiros habitantes do município de Raposa-MA foram imigrantes cearenses que se instalaram na ilha de São Luís por volta da década de 50 a busca de novas oportunidades de emprego e, sobretudo, por conta da seca. Em 1994 o município foi emancipado através da Lei Nº 6.132 de 10 de novembro de 1994 a partir do desmembramento do município de Paço do Lumiar²⁶ e atualmente é constituída por 16 povoados e vilas.

Segundo o censo demográfico estimado pelo IBGE²⁷ em 2005, o município de Raposa conta com uma população de 20.698 habitantes, concentrando 11.370 na área urbana e 9.328 na área rural, onde a atividade econômica predominante é a pesca e o artesanato.

Os pontos de coleta de flebotômicos para a realização deste estudo foram as 14 vilas do município de Raposa-MA que apresentaram notificação de casos de LVA entre 1997 a 2005, conforme o registro da Secretaria Municipal de Saúde. Neste período, foram notificados 159 casos de LVA, distribuídos nas vilas Maresia, Boa Esperança, Vila Nova, Bom Viver, Pirâmide, Residencial Thalita, Caura, Alto da Base, Inhaúma, Tapeua, Alto do Farol, Cumbique, São João e Araçagi (Figuras 1 e 2).

As vilas foram georreferenciadas com GPS (*Global Positioning System*) de 12 canais e situam-se ao longo da rodovia MA-203 que interliga os municípios de Raposa e São Luís. À margem direita da rodovia situam-se as localidades Vila Nova, Bom Viver, Maresia, Vila Pirâmide, São João, Thalita, Tapeua, Alto da Base, Cumbique, Boa Esperança, Alto do Farol; e à esquerda Araçagi, Inhaúma e Caura (Figura 1).

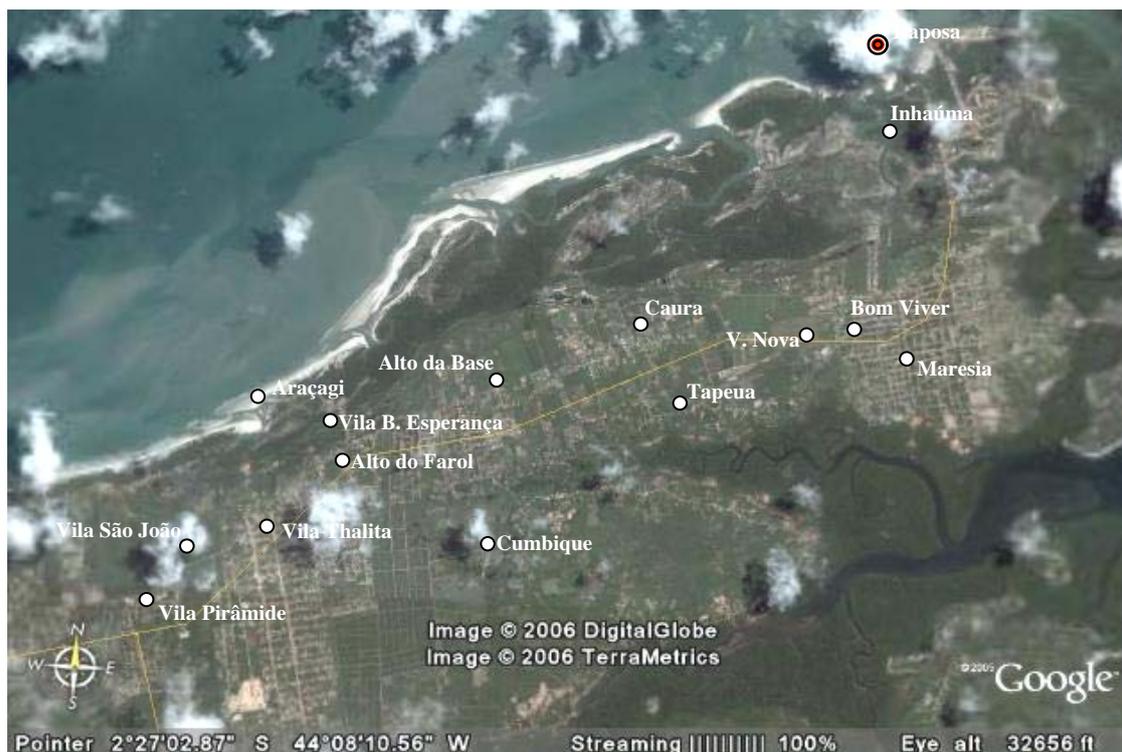


Figura 1: Imagem do município de Raposa-MA. Em destaque pontos de coletas de flebotomíneos (círculo branco) e rodovia MA-203 (linha amarela). Fonte: Software Google Earth/2006.

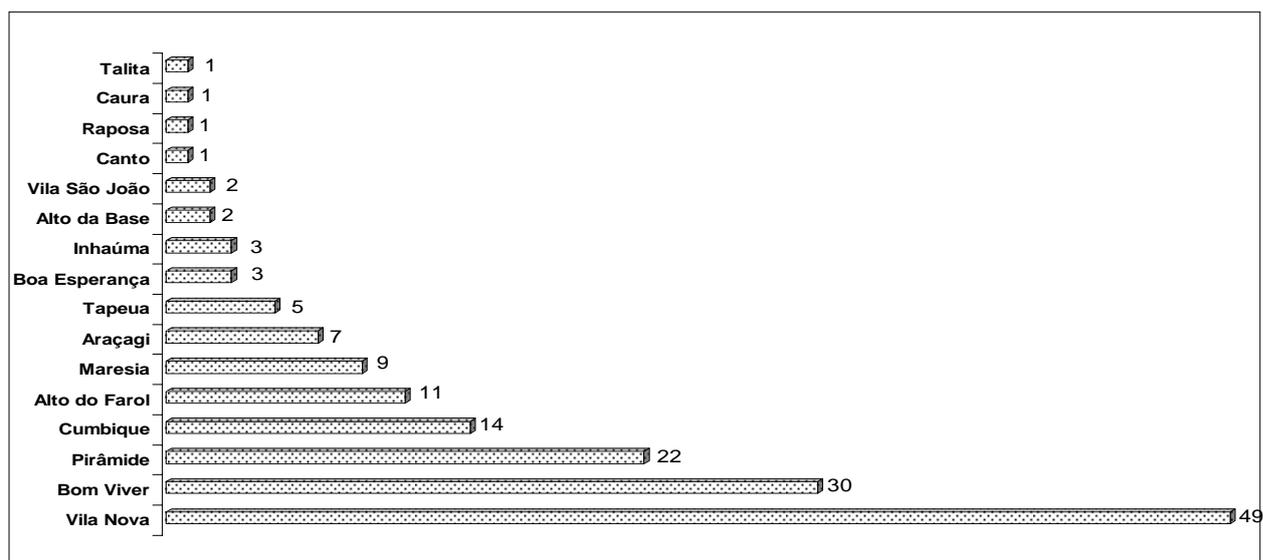


Figura 2: Número de casos de LVA por localidade no município de Raposa-MA (1997-2005). Fonte: Secretaria Municipal de Saúde, 2006.

Coletas de flebotomíneos

O estudo foi dividido em dois momentos. No primeiro, analisou-se a distribuição do vetor no município, enfocando as localidades com a doença desde os primeiros registros. Em cada vila foram selecionadas quatro casas que continham abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar, onde se procedeu a captura de flebotomíneos. Armadilhas luminosas tipo CDC (*Center of Disease Control*) foram instaladas das 18:00h as 6:00h no período entre junho a outubro de 2005. As coletas resultaram em um esforço de 672 horas trabalhadas.

Os espécimes coletados foram mantidos em freezer a - 7°C, transferidos para placas de Petri e posteriormente montados em lâmina com Berleze. Para a identificação taxonômica utilizou-se a chave proposta por Young e Duncan².

No segundo momento, realizou-se um estudo retrospectivo com dados coletados no período de julho de 1996 a junho de 1998, quando foram registrados no município, 46 casos de LVA. Dessa forma, pôde-se avaliar o padrão de ocorrência sazonal do vetor em um período de dois anos. Os espécimes foram capturados em abrigos de animais domésticos, mensalmente, utilizando-se armadilhas CDC.

Em todas as localidades estudadas, em cada residência (n=56) aplicou-se um questionário sobre a presença de animais sinantrópicos nos arredores do domicílio.

Os dados meteorológicos do período de estudo foram obtidos no Departamento de Controle do Espaço Aéreo do Comando da Aeronáutica.

Análise dos dados

Utilizou-se o teste não paramétrico do χ^2 (qui-quadrado) para analisar a diferença entre as proporções de machos e fêmeas e a correlação de Spearman para análise da frequência mensal de espécimes, valores médios da temperatura, umidade relativa do ar e valores absolutos da precipitação pluviométrica.

RESULTADOS

Distribuição geográfica

Na primeira fase do estudo, foram capturados 773 espécimes de *L. longipalpis*, sendo 30,5% fêmeas e 69,5% machos e estas diferenças foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 60,912$; $p < 0,05$; $GL=1$). As capturas foram positivas em 10 dentre 14 localidades estudadas, sendo negativas nas vilas Boa Esperança, Inhaúma, Pirâmide e São João (Tabela 1). A frequência de espécimes foi maior nas vilas Araçagi (27,8%), Thalita (21,9%) e Alto do Farol (18,8%), representando 68,4% do total de indivíduos coletados.

L. longipalpis esteve presente em localidades que apresentam diferentes fisionomias, particularmente vilas cercadas com vegetação típica de mangue (vila Maresia, Inhaúma, Itapeuá, Caura, Alto da Base), áreas de mata secundária ou capoeira (Vila Nova, Bom Viver, Thalita, Alto do Farol, Cumbique, Boa Esperança, São João, Pirâmide) além de outras localidades de colonização bastante antiga, onde se encontram resquícios de babaçuais e juçarais e frequência de plantas arbóreas cultivadas (Araçagi) (Figura 3).

Tabela 1: Número de espécimes de *L. longipalpis* coletados no ambiente peridomiciliar em 14 pontos de coleta no município de Raposa-MA

| LOCALIDADES | <i>L. longipalpis</i> | | Total | |
|---------------|-----------------------|------------|--------------|-------------|
| | Macho | Fêmea | Nº absolutos | % |
| Maresia | 20 | 11 | 31 | 4,01 |
| Thalita | 140 | 29 | 169 | 21,87 |
| Araçagi | 114 | 101 | 215 | 27,81 |
| Alto da Base | 54 | 20 | 74 | 9,57 |
| Inhaúma | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pirâmide | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Boa Esperança | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S. João | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Alto do Farol | 115 | 30 | 145 | 18,76 |
| Cumbique | 7 | 5 | 12 | 1,55 |
| Bom Viver | 27 | 8 | 35 | 4,53 |
| Vila Nova | 8 | 4 | 12 | 1,55 |
| Itapeuá | 35 | 19 | 54 | 6,99 |
| Caura | 17 | 9 | 26 | 3,36 |
| Total | 537 | 236 | 773 | 100% |

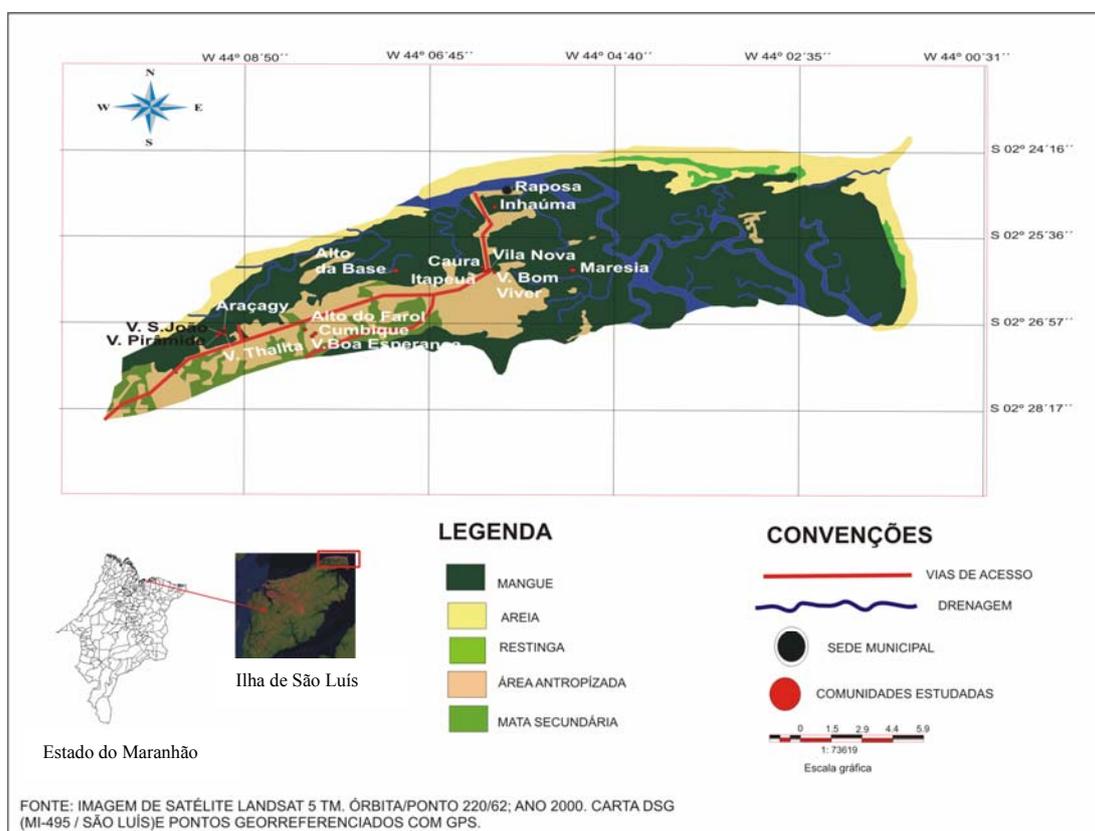


Figura 3: Caracterização das localidades selecionadas para a coleta de flebotomíneos no município de Raposa-Maranhão, Brasil.

Distribuição sazonal

Na segunda fase, foram coletados 26.893 espécimes, sendo 11.498 fêmeas (42,8%) e 15.395 machos (57,2%). A análise estatística demonstrou diferenças significativas entre estas proporções demonstrando o predomínio de machos sobre o número de fêmeas ($\chi^2 = 283,842$; $p < 0,05$; G.L=1).

L. longipalpis esteve presente durante todos os meses do ano, com maior frequência entre os meses de março (20,6%) e abril (38,7%) (Tabela 2). Considerando a distribuição de indivíduos por estação, verificou-se maior frequência no período chuvoso (85,9%) em relação à estiagem (14,1%). Essas diferenças foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 7959,301$; $p < 0,05$; GL=1).

Tabela 2: Frequência mensal de *Lutzomyia longipalpis* capturados entre julho de 1996 a junho de 1998 na localidade Bom Viver município de Raposa-MA

| PERÍODO | AMBIENTE | ESTAÇÃO | | | | | | | | | | | | TOTAL |
|--------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| | | ESTIAGEM | | | | | | CHUVOSA | | | | | | |
| | | J | A | S | O | N | D | J | F | M | A | M | J | |
| 1996/1997 | Intra ¹ | 15 | 8 | 2 | 52 | 47 | 6 | 257 | 49 | 194 | 237 | 372 | 32 | 1271 |
| | Peri ² | 277 | 86 | 233 | 106 | 95 | 265 | 682 | 342 | 1503 | 3343 | 1018 | 223 | 8173 |
| 1997/1998 | Intra | 51 | 49 | 80 | 32 | 143 | 74 | 91 | 129 | 411 | 243 | 331 | 102 | 1736 |
| | Peri | 386 | 65 | 93 | 74 | 390 | 1162 | 1234 | 798 | 3446 | 6586 | 750 | 729 | 15713 |
| Total | n* | 729 | 208 | 408 | 264 | 675 | 1507 | 2264 | 1318 | 5554 | 10409 | 2471 | 1086 | 26893 |
| | %** | 2,7 | 0,8 | 1,5 | 1,0 | 2,5 | 25,6 | 8,4 | 5,0 | 20,65 | 38,7 | 9,2 | 4,0 | 100,0 |

1-intradomicílio; 2 – peridomicílio. * números absolutos; ** percentuais. Fonte: LEV/UFMA e FNS, 1998.

Quanto à distribuição dos espécimes por ambiente de captura (Tabela 3), observou-se diferenças significativas ($\chi^2 = 232,764$; $p < 0,05$; GL = 1), indicando maior frequência no ambiente peridomiciliar (88,8%) em relação ao intradomiciliar (11,2%). Esta tendência refletiu em todos os meses estudados exibindo diferenças significativas entre os dois períodos de estudo ($\chi^2 = 232,764$; $p < 0,05$; GL=1 e $\chi^2 = 6667,442$; $p < 0,05$; GL=1).

Tabela 3: Distribuição de *Lutzomyia longipalpis* conforme ambiente de captura, na localidade Bom Viver, município de Raposa-MA

| MESES | 1996-1997 | | | | 1997-1998 | | | | TOTAL | | |
|--------------|-----------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| | PERI | | INTRA | | PERI | | INTRA | | n* | %* | |
| | F | M | F | M | F | M | F | M | | | |
| JUL | 100 | 177 | 7 | 8 | 120 | 266 | 28 | 23 | 729 | 2,7 | |
| AGO | 37 | 49 | 4 | 4 | 30 | 35 | 18 | 31 | 208 | 0,8 | |
| SET | 97 | 136 | 2 | 0 | 27 | 66 | 25 | 55 | 408 | 1,5 | |
| OUT | 39 | 67 | 21 | 31 | 22 | 52 | 13 | 19 | 264 | 1,0 | |
| NOV | 26 | 69 | 18 | 29 | 132 | 258 | 53 | 90 | 675 | 2,5 | |
| DEZ | 114 | 151 | 0 | 6 | 334 | 828 | 22 | 52 | 1507 | 5,6 | |
| JAN | 316 | 366 | 42 | 215 | 334 | 900 | 70 | 21 | 2264 | 8,4 | |
| FEV | 120 | 222 | 20 | 29 | 253 | 545 | 38 | 91 | 1318 | 5,0 | |
| MAR | 747 | 756 | 50 | 144 | 1526 | 1920 | 189 | 222 | 5554 | 20,6 | |
| ABR | 1760 | 1583 | 73 | 164 | 3313 | 3273 | 101 | 142 | 10409 | 38,7 | |
| MAI | 360 | 658 | 134 | 238 | 229 | 521 | 115 | 216 | 2471 | 9,2 | |
| JUN | 106 | 117 | 7 | 25 | 259 | 470 | 47 | 55 | 1086 | 4,0 | |
| Total | N* | 3822 | 4351 | 378 | 893 | 6579 | 9134 | 719 | 1017 | 26893 | 100,0 |
| | %* | 14,2 | 16,2 | 1,4 | 3,3 | 24,5 | 33,9 | 2,7 | 3,8 | 100,0 | |

Fonte: Laboratório de Entomologia e Vetores/UFMA e FNS, 1998.

A análise da correlação de Spearman não demonstrou relação direta entre a frequência mensal de espécimes e valores médios de temperatura ($r_s = - 0.7951$; $p = 0.0020$) para o primeiro período de coletas, ao contrário do resultado obtido para o segundo período ($r_s = 0.1051$; $p = 0.7452$) (Figura 4).

A correlação foi positiva entre a frequência mensal de espécimes e valores médios de umidade relativa do ar para os dois períodos de coleta ($r_s = 0,7972$; $p = 0,0019$; $r_s = 0,7509$; $p = 0,0049$) bem como, entre a frequência mensal de espécimes e a precipitação pluviométrica ($r_s = 0,8056$; $p = 0,0016$; $r_s = 0,8803$; $p = 0,0002$) (Figura 4).

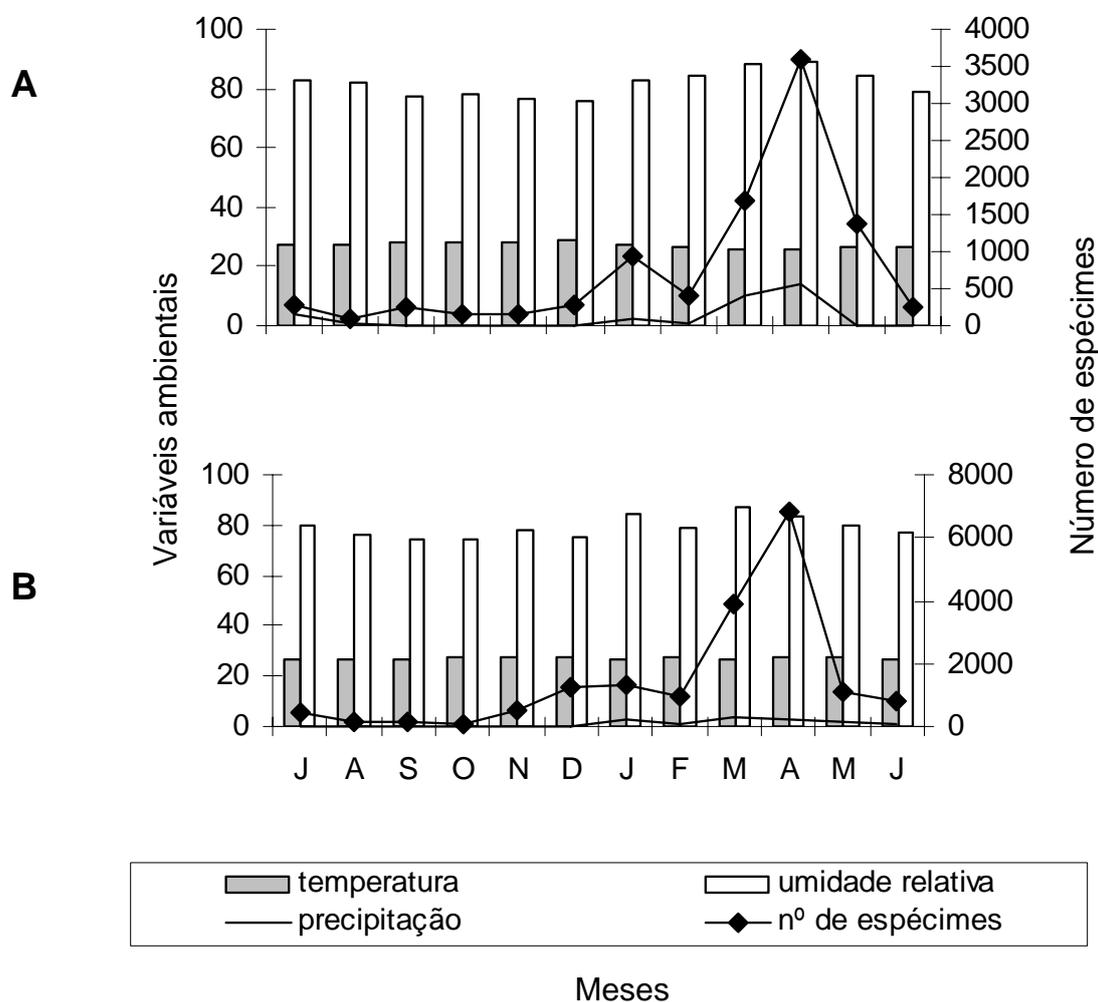


Figura 4: Efeito das variáveis ambientais (temperatura mensal (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica) sobre a frequência mensal de *Lutzomyia longipalpis* capturados na localidade Bom Viver, município de Raposa-MA. A) Coletas realizadas de julho de 1996 a junho de 1997. B) Coletas realizadas de julho de 1997 a junho de 1998. Fonte: Laboratório de Entomologia e Vetores/UFMA, Secretaria Municipal de Saúde e Departamento de Controle do Espaço Aéreo do Comando da Aeronáutica, 2006.

Ao analisar a distribuição de fêmeas de *L. longipalpis* e o número de casos de LVA no ano de 1997, observa-se maior densidade do vetor (88,9%) no período que antecede o registro de maior número de casos de LVA.

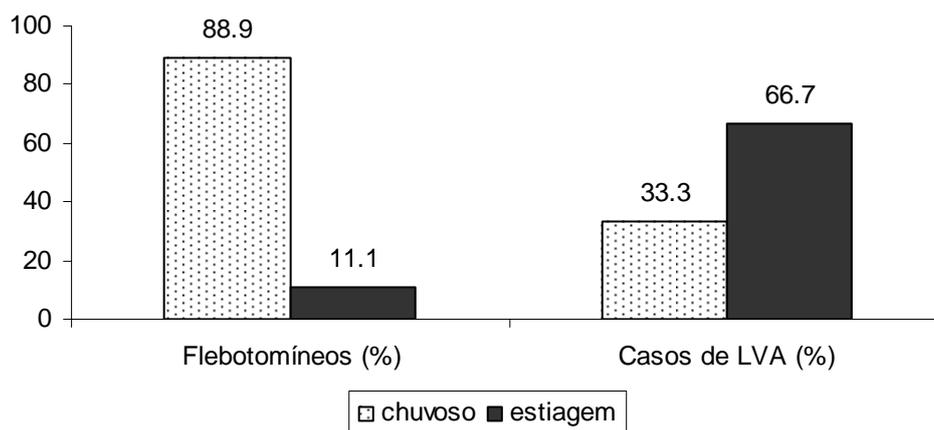


Figura 5: Distribuição sazonal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e nº de casos de LVA notificados. Fonte: Laboratório de Entomologia e Vetores/UFMA e Secretaria Municipal de Saúde, 1997.

Abrigos de animais domésticos e ocorrência de animais sinantrópicos

Os 56 domicílios visitados apresentavam abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar, destacando uma frequência superior para galinheiros/poleiros (85,71%) em relação aos demais abrigos, tais como, currais (5,36%), chiqueiros (5,36%) e canil (3,57%).

Ao questionar os moradores sobre a ocorrência de animais silvestres nas proximidades do ambiente peridomiciliar foram mencionados: roedores (35,4%), marsupiais (33,8%), raposas (15,4%), não souberam dizer (13,8%) e outros (1,5%).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que *L. longipalpis* encontra-se amplamente distribuído no município de Raposa, onde foi registrado na maioria das vilas estudadas, sendo representativa a sua presença nos ambientes peridomésticos, bem como no ambiente domiciliar, assim como observado por Araújo²⁸ e Dias¹⁷.

A ausência de *L. longipalpis* nas vilas São João, Pirâmide, Boa Esperança e Inhaúma é curiosa, posto que se trata de locais com notificação recente de casos de LVA. Vale ressaltar, que na ocasião do registro de casos não foi realizado o estudo entomológico que justificasse a transmissão da doença, portanto não se dispõe de dados para afirmar se os casos eram ou não autóctones. Do mesmo modo, não se sabe se o inseto estava ou não presente no momento em que os casos foram notificados. Na literatura existe relato de casos da doença sem a presença de *L. longipalpis*²⁹, mas independente disso sabe-se que a abundância do vetor pode variar de acordo com a fase lunar³⁰, período do ano, condições ambientais, a escolha dos locais para instalação das armadilhas, desinfecção das áreas³¹, dentre outros. A ausência do vetor nos locais de coleta pode ter sido uma condição fortuita daquele momento, não significando, portanto, a sua ausência nas localidades. Novos inquéritos devem ser levados a efeito para confirmação.

No município de Raposa, *L. longipalpis* encontra-se presente em todos os meses do ano predominando na estação chuvosa, corroborando os resultados de Araújo²⁸ em Vila Nova (Raposa-MA) e em outras localidades vizinhas^{8,32}. No entanto, este padrão de distribuição sazonal pode variar para outros municípios e a abundância relativa de flebotomíneos pode ser maior no período da estiagem^{9,12,33,34}.

A precipitação pluviométrica e a umidade relativa do ar exerceram influência sobre a frequência mensal de espécimes de flebotômíneos, conforme demonstrada em várias áreas do Estado do Maranhão^{9,12}, assim como em outros estados^{11,35}.

Os estudos clássicos descrevem a ocorrência *L. longipalpis* em áreas urbanas ou rurais comumente situadas em zonas áridas e semi-áridas^{10,11}. No entanto, percebe-se que *L. longipalpis* tem ocupado diversos ecossistemas brasileiros, assim como a caatinga³⁶, floresta amazônica⁵, pantanal – matogrossense⁷ e os cerrados^{7,9,37}. Ximenes³⁸ em um trabalho sobre a distribuição de flebotômíneos no Rio Grande do Norte, demonstraram a ocorrência de *L. longipalpis* do litoral a zonas do semi-árido do estado.

Embora os estudos sobre a distribuição de *L. longipalpis* sejam numerosos, a maioria relata a ocorrência destes insetos em apenas uma área fitogeográfica. Os estudos conduzidos por Rebelo¹² demonstram a ocorrência de *L. longipalpis* em áreas de transição entre o semi-árido e a floresta Amazônica no estado do Maranhão. Adicionalmente, Dias-Lima³⁶ notificaram a ocorrência deste vetor em áreas de transição entre a caatinga e a floresta tropical.

No município, ainda são preservados alguns costumes peculiares de áreas rurais, como a existência de abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar. A adaptação de *L. longipalpis* ao intra e peridomicílio tem sido relatada em diversos trabalhos¹⁵⁻¹⁷ baseado apenas na presença frequência de adultos do vetor nesses ambientes, pois o encontro das formas imaturas não tem sido bem sucedido³⁹. Em adição, o encontro do vetor em ambientes florestais⁶ ou nas capoeiras⁸ adjacentes suscitou a hipótese de que o peridomicílio não constitui criadouro natural. Desta forma, Lainson e Rangel⁴⁰ questionam se a densidade do vetor ocorre em virtude da migração de áreas silvestres ou do estabelecimento de área secundárias para a realização do repasto sanguíneo. Por outro lado, estudos sucessivos realizados em áreas peri-urbanas, semi-urbanas ou mesmo urbanos, distantes de vegetação

natural, têm revelado a presença do vetor em maior ou menor grau de densidade^{28,32}. Assim, estudos mais aprofundados devem ser feitos, no sentido de elucidar essas questões.

Forattini¹³ demonstrou que a densidade populacional de *L. longipalpis* é afetada pelas condições do peri-domicílio e, associada com a presença de animais domésticos, eleva-se consideravelmente o risco de transmissão de *Le. chagasi*⁴⁰.

Neste estudo, constatou-se o predomínio de galinheiros/poleiros em relação aos demais abrigos de animais domésticos, tais como canil, estribaria e chiqueiro. Enfatizando estes achados Dias¹⁷, Ximenes⁴¹ e Barata⁴² demonstraram a preferência alimentar de *L. longipalpis* por aves e, seus abrigos no peridomicílio são importantes para a manutenção da população de vetor no ambiente domiciliar¹⁸.

Vários estudos têm contribuído para o conhecimento da ecologia de *L. longipalpis* na ilha de São Luís. A maioria deles envolve investigações sobre a sua ocorrência, determinação da fonte alimentar e associação com ambiente domiciliar^{12,18,28,32}. Neste estudo, analisando a distribuição mensal de LVA em Bom Viver e a frequência de fêmeas de *L. longipalpis* em 1997, observou-se que no período que antecede o registro de casos, há uma maior densidade do vetor. Considerando que a doença apresenta um período de incubação de 2 a 6 meses, dependendo de fatores imunológicos do paciente³, podemos afirmar que este período de maior densidade vetorial corresponde ao período onde possivelmente ocorre a transmissão de *Le. chagasi*. Estes aspectos foram relatados nos estudos de Thompson⁴³ que relacionaram a média de precipitação anual com a notificação de casos no município de Canindé-CE.

Conforme a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) dentre os nove anos de notificação de LVA, as localidades Vila Nova e Bom Viver contribuíram com 49% (79/161) do total de casos notificados entre 1997 e 2005. Em 1997 as únicas localidades com LVA foram Vila Nova e Bom Viver, e a partir de 1998 os casos expandiram-se para outras cinco vilas (Alto do Farol, Cumbique, Inhaúma, Tapeua e Boa Esperança) somando-se posteriormente a estas,

Araçagi, Pirâmide, Caura, onde até o término do ano de 2005 a patologia atingiu Maresia, São João, Alto da Base e Thalita, totalizando 159 casos notificados.

De acordo com Patz¹⁹ a distribuição e o comportamento de parasitas, hospedeiros e vetores são modificados pela agressão aos ecossistemas naturais, especialmente o desmatamento e o uso exaustivo dos recursos naturais, fato observado com o processo de urbanização da LVA, onde a adaptação de *L. longipalpis* ao ambiente urbano contribui para a manutenção da infecção. Nesta perspectiva, o efeito da degradação ambiental sobre a abundância e diversidade de flebotomíneos foi demonstrado por Travi³³ em um estudo realizado na Colômbia. Os pesquisadores notificaram maior abundância de espécimes e biodiversidade em áreas preservadas quando comparadas a ambientes degradados. Fato contrário foi demonstrado em relação a *L. longipalpis* que predominou em ambientes degradados, o que indica a sua adaptação a áreas sujeitas à intervenção humana. Ximenes³⁸ citam que *L. longipalpis* é o flebotomíneo mais adaptado a mudanças ambientais.

A participação de reservatórios silvestres na manutenção da LVA na área peri-urbana do município de Raposa não pode ser descartada uma vez que moradores alegam ser freqüente a observação de raposas e marsupiais didelfídeos no entorno da cidade. Lima⁴⁴ notificaram a presença de *Cerdocyon thous* vivendo em grande proximidade a ambientes humanos, onde *L. longipalpis* corresponde a 90% dentre as espécies de flebotomíneos⁴⁵. Estes elementos associados à detecção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* em espécimes de *C. thous*⁴⁶ indica que estes animais ocupam o mesmo ambiente, reforçando a hipótese de transmissão silvestre em ambiente periurbano.

Em síntese, este estudo demonstrou que *L. longipalpis* encontra-se amplamente distribuído no município de Raposa, considerando a sua distribuição em pontos centrais e periféricos do município que desde o ano de 1997 vêm registrando casos autóctones.

A abundância de *L. longipalpis* no ambiente peridomiciliar de aglomerados urbanos e, sobretudo na estação chuvosa, indica que estes fatores são críticos para o risco em adquirir a infecção, onde um grande número de pessoas encontra-se expostas a LVA, tornando imprescindível à efetivação das propostas de controle vetorial.

As informações sobre a distribuição de *L. longipalpis* podem auxiliar na definição das áreas de risco contribuindo para os procedimentos de controle. Contudo, para um melhor entendimento da dinâmica da doença, há necessidade de estudos posteriores que busquem elucidar os focos naturais da doença, bem como compreender o papel dos demais reservatórios possivelmente envolvidos na transmissão.

Agradecimentos:

À comunidade do município de Raposa-MA pela acolhida e apoio durante a pesquisa; a Raimundo Costa e José Cabral da Secretaria de Saúde (Raposa-MA) pela presteza; à Raquel Fonteles, Patrícia Castelo Branco, Gabriel Vasconcelos pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos de campo; à FAPEMA pela concessão de bolsa de mestrado; ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Proc. nº 620081/2004-0 ACT).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Uribe S. The status de *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for Leishmania transmission. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1999; 94 (6) 729-734.
2. Young DC, Duncan MA Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memories of the American Entomological Institute; 1994; 54: 1-881.
3. Ministerio da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
4. Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz; 2003
5. Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza SFT. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1990; 85 (1): 135-137.
6. Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo C, Rocha H C, et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia 2003; 47 (2): 283-296.
7. Ribeiro ALM, Missawa NA. Spatial distribution of phlebotominae species in the state of Mato Grosso, Brazil, in the period of 1996 to 2001. Entomologia y Vectores 2002; 9: 33-34.
8. Barros VLL, Rebêlo JMM, Silva FS. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira no município do Paço do Lumiar, estado do Maranhão, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Caderno de Saúde Pública 2000; 16: 265-270.
9. Martins AMCB, Rebêlo JMM. Dinâmica espaço-temporal de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de Santa Quitéria, área de cerrado do Estado do Maranhão, Brasil. Iheringia Série Zoologia 2006, no prelo.
10. Deane LM, Deane MP. 1955. Leishmaniose Visceral Urbana (no cão e homem) em Sobral, Ceará. O Hospital 1955; 47: (1) 113-128.
11. Sherlock IA, Guitton N. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 1969; 21: 541-548.
12. Rebêlo JMM, Oliveira ST, Silva FS, Barros VLL, Costa JML. Sandflies (DIPTERA: PSYCHODIDAE) of the Amazônia of Maranhão. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. Revista Brasileira de Biologia 2001; 61 (1): 107-115.

13. Forattini OP. Entomologia Médica. Vol 4. São Paulo: Editora Edgard Blucher; 1973.
14. Teodoro U, Salvia Filho V.L, Lima E.M, Spinosa R.P, Barbosa O. C, Ferreira, M.E.M.C, et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, ao norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. Revista Saúde Pública 1993; 27(4): 242-9.
15. Quinnel RJ, Dye C. An experimental study of the peridomestic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Bulletin of Entomological Research 1994; 84: 379-382.
16. Rebelo JMM, Oliveira ST, Silva FS, Barros VLL, Costa JML. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) da ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1999; 33 (3): 247-253.
17. Dias FOP, Lorosa ES, Rebelo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Psychodidae: Phlebotominae). Cadernos de Saúde Pública 2003; 19 (5): 1373-1380.
18. Barros VLL. Estudo da importância do *Gallus gallus* como chamariz da *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) no ambiente doméstico: caracterização da fonte alimentar do flebotomíneo na localidade Preiçueira, município de São José de Ribamar, Maranhão em 2005.[Dissertação de Mestrado]. São Luís: Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão; 2006.
19. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. International Journal for Parasitology 2000; 30: 1395-1405.
20. Gomes AC. Mecanismos e significado da domiciliação. Revista de Saúde Pública 1986; 20 (5) 385- 390.
21. Costa CHN, Pereira HF, Araujo MV. Epidemia de calazar no Estado do Piauí, Brasil. Revista de Saúde Pública. 1990; 24:361-372.
22. Silva AR, Vianna GMC, Varonil C, Pires B, Nascimento MDSD, Costa JML. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1997; 30:359-368.
23. Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena C.M, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral americana em Belo Horizonte. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2001. v. 53. n.1.
24. Ab' Saber AN. Geomorfologia da região. In: ALMEIDA JÚNIOR, M. G. Carajás: desafio político e desenvolvimento. Editora Braziliense; 1986. p.88-124.
25. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA. Diagnóstico dos principais problemas ambientais do estado do Maranhão. São Luís-MA. Editora Litograf; 1991.

26. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa por Municípios <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php> (acesso em 04/Jan/2006).
27. Decreto Lei Nº 6.132. A prova a emancipação política do município de Raposa-MA e dá outras providências. Diário Oficial da União 1995; 10 de nov. 1994.
28. Araujo JC, Rebêlo JMM, Carvalho ML, Barros VLL. Composição de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município da Raposa – MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y vectores 2000; 7: 33-47.
29. Souza MB, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, et al. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral americana no município do Rio de Janeiro. Cadernos de Saúde Pública 2003; 19 (6): 1881-1885.
30. Souza NA, Andrade-Coelho CAA, Silva VC, Peixoto AA, Rangel EF. Moonlight and blood-feeding behaviour of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2005; 100 (1): 39-42.
31. Teodoro U, Silveira, TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira, O; Kuhl, JB, Alberton, D. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e a da desinfecção de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 2003; 19 (6): 1801-1813.
32. Carvalho ML, Rebêlo JMM, Araújo JC, Barros VLL. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y vectores; 2000 7: 19-32.
33. Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) of Tropical Dry Forest in Northern Colombia. Journal Medical Entomology 2002; 39: (3) 451-456.
34. Morison AC, Ferro C, Pardo R, Torres MLW, Devlin B, Tesh RB. Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis*(Diptera, Psychodidae) at na endemic focus of visceral leishmaniasis in Colômbia. Journal Medical Entomological 1995; 32: 538-548.
35. Galati EAB, Nunes VLB, Rêgo Junior FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista de Saúde Pública 1997; 31 (4): 378-390.
36. Dias-Lima AG, Guedes MLS, Sherlock IA. Horizontal stratification of the sand fly fauna (Díptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga ad tropical rain Forest state of Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2003; 98 (6): 733-737.

37. Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 1997; 31 (6): 632-633.
38. Ximenes MFF.M, Castellón EG, Souza MF, Freitas RA, Pearson RA, Wilson ME, et al. Distribution of Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae) in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Journal Medical Entomology* 2000, 37: (1) 162-169.
39. Feliciangeli, MD. Natural breeding places of phlebotomine sandfleis. *Medical and Veterinary Entomology* 2004, 18: 71-80
40. Lainson R, Rangel E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 100 (8): 811-827.
41. Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94 (4): 427-432.
42. Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata AP, Loroza ES, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005; 38(5):421-425.
43. Thompson RA, Lima JWO, Maguire JH, Braud DH, Scholl DT. Climatic and demographic determinants of american visceral leishmaniasis in northeastern Brazil, using remot sensing technology for environmental categorization of rain and region influences on leishmaniasis. *American Journal Tropical and Medicine and Hygiene* 2002; 67 (6) 645-655.
44. Lima EFO, Gomes FVJ, Antunes JEL, Farias TJC, Costa CHN. 2003. Características do habitat de raposas nos arredores de Teresina-PI. In: XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Belém-PA: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2003 p. 230.
45. Soares MRA, Teixeira TLA, Morais SRC, Antunes JEL, Mendonça IL, Costa CHN. Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* em ecótopos silvestres ocupados por raposas, na área periurbana de Teresina-PI. In: XL Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Aracaju-SE 2004; 37 (Supl.1) 185-186.
46. Gomes RB, Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MSP et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006, *no prelo*.



2° ARTIGO

**Diagnóstico molecular de infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por
Leishmania chagasi na ilha de São Luís-Maranhão, Brasil.**

*Molecular diagnostic of **Lutzomyia longipalpis** natural infection by **Leishmania chagasi**,
in São Luis island, Maranhão state, Brazil.*

Maria Regiane Araújo Soares¹; Cristiane Costa Carvalho¹, João Freitas de Almeida¹; Vera Lúcia Lopes de Barros¹; Lucilene Amorim Silva²; Flávia Raquel Fernandes do Nascimento³; José Manuel Macário Rebêlo⁴; Silma Regina Ferreira Pereira⁵.

1. Egressos do Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão.
2. Egressa do Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão.
3. Laboratório de Imunofisiologia. Universidade Federal do Maranhão.
4. Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.
5. Laboratório de Entomologia e Vetores. Universidade Federal do Maranhão.

Laboratório de Biologia Molecular e Genética. Universidade Federal do Maranhão. Avenida dos Portugueses s/n, Campus do Bacanga, CEP: 65.080-040; São Luís-Maranhão, Brasil. E-mail: silmaregina@yahoo.com.br

Endereço para correspondência: Silma Regina Ferreira Pereira, Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/n, 65.080-040, Campus do Bacanga, São Luís-MA. E-mail: silmaregina@yahoo.com.br

RESUMO

A leishmaniose visceral americana é causada pela *Leishmania chagasi* e seu agente transmissor, são fêmeas infectadas de *Lutzomyia longipalpis* que realizam repasto sanguíneo em mamíferos. Análise molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi aplicada para determinar a taxa de infecção natural de *L. longipalpis* por *Le. chagasi* em localidades de ocupação humana antiga e recente, na ilha de São Luís. A partir de uma amostra de 800 fêmeas coletadas no período de março a agosto de 2005 foi possível determinar taxas de infecção natural equivalente a 1,25% em uma localidade de colonização antiga, e 0,25% em duas localidades de colonização recente. A infecção foi detectada nas duas localidades independente do número de casos humanos de LVA notificados, o que demonstra que outros elementos que modulam a infecção no meio natural precisam ser investigados. Os resultados obtidos confirmam a PCR como uma técnica específica e uma importante ferramenta para as ações em vigilância epidemiológica.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*; *Leishmania chagasi*; Infecção natural, análise molecular.

ABSTRACT

American visceral leishmaniasis (AVL) is caused by *Leishmania chagasi*. The female of *Lutzomyia longipalpis* is infected by vector when they feed in mammals. Molecular analysis by polymerase chain reaction (PCR) was applied to determine the natural rate infection of *L. longipalpis* by *Le. chagasi* in places of old occupation and recent human being, in São Luís island. From a sample of 800 females collected in the period from March to August in 2005 was possible to determine rates of natural infection equivalent 1.25% for Preçueira, locality of old settling, and 0.25% for the Maresia/Thalita villages, localities of recent settling. The infection was detected in the two localities independent of the number of human AVL cases notified, what it demonstrates that other elements that modulate the infection in the natural way, need to be investigated. The obtained results confirm the PCR as one specific technique and an important tool for actions in epidemiologist monitoring.

Key-word: *Lutzomyia longipalpis*; *Leishmania chagasi*; Natural infection, molecular analyzes.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma infecção sistêmica causada por várias espécies do protozoário *Leishmania*, configurando-se como uma das principais endemias mundiais¹. Nas Américas, também denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical, é causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* e transmitida no momento do repasto sanguíneo do díptero *Lutzomyia longipalpis*².

Alguns mamíferos domésticos e silvestres constituem fontes de infecção e disseminação da doença, tais o como canídeos domésticos (*Canis familiaris*) e silvestres (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*), e marsupiais (*Didelphis marsupialis* e *D. albiventris*)^{3,4,5}. No Brasil, é uma doença endêmica e encontra-se amplamente distribuída com maior incidência na Região Nordeste que concentra 92% dos casos registrados, seguida pelas regiões Sudeste (4%), Norte (3%), e Centro-Oeste (1%)².

Depois da descrição de *Le. chagasi* como agente etiológico da LVA, a posição taxonômica desta espécie tem sido motivo de controvérsia devido a similaridade com *Le. infantum* Nicole 1908, uma espécie do Mediterrâneo. Lainson e Shaw^{6,7} afirmam que a separação das espécies não exclui a presença de *Le. infantum* no Brasil. Com o advento das técnicas moleculares, muitos pesquisadores passaram a usá-las para estudar a taxonomia destas duas espécies, dentre eles, Rodriguez⁸ demonstraram a ocorrência de *Le. infantum* em uma área endêmica de LVA na Venezuela, destacando uma homologia maior entre esta espécie e *Le. infantum* do Velho Mundo quando comparada à *Le. chagasi*.

Na ilha de São Luís o vetor é bastante comum e pode ser encontrado em áreas rurais, bem como nos bairros periféricos, geralmente associados a inúmeros abrigos de animais, particularmente galinheiros, sendo menos freqüentes dentro de habitações humanas^{9,10-13}.

Contudo, exemplares desta espécie também tem sido encontrado alimentados com sangue humano em habitações de localidades semi-urbanas ¹⁴.

A determinação das taxas de infecção natural de flebotomíneos em áreas endêmicas e a identificação das espécies de *Leishmania* constituem uma importante ferramenta para os estudos epidemiológicos das leishmanioses e de competência vetorial.

Os métodos mais comumente utilizados para a investigação em laboratório são pesquisas de parasitas *in loco*, após a dissecação do trato digestivo destes insetos para visualização de promastigotas, seguido de semeio em meio de cultura ou inoculação em animais de laboratório¹⁵. No entanto, esse procedimento é extremamente dependente da habilidade e técnica do pesquisador, além de consumir maior tempo para a sua realização e não permite a identificação específica do parasita.

Nos últimos anos o emprego de técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase – PCR, tem sido proposta em virtude da alta especificidade e sensibilidade estimada em 94%². Desta forma, quando aplicada ao diagnóstico de infecção natural, a técnica independe do número de parasitas presentes na amostra, estágio de desenvolvimento e localização. Apesar destas vantagens os trabalhos ainda são escassos, certamente, por conta dos custos em adotar estas ferramentas.

A PCR tem sido aplicada para o diagnóstico das espécies de *Leishmania*, detecção do parasito em *pools* (grupos) de espécimes de flebotomíneos e para a análise de polimorfismos entre populações de *L. longipalpis*¹⁶⁻²⁰.

Para a análise de infecção por cinetoplastídeos a PCR tem como alvo seqüências do cinetoplasto (*kDNA*), organela exclusiva destes protozoários dispostas em dois tipos de DNA circular, os maxicírculos e aos minicírculos²¹.

Embora os minicírculos sejam substancialmente diferentes na seqüência de nucleotídeos em relação aos maxicírculos, estas estruturas contêm curtas seqüências

conservadas com função aparente na edição do RNAm funcional da célula²¹⁻²³. Iniciadores (*primers*) construídos a partir destas seqüências têm sido utilizados para detectar espécies do gênero *Leishmania*^{24,25}, assim como membros dos complexos *braziliensis* e *donovani*^{23,26}. Desta forma, *primers* desenhados a partir de uma região conservada do minicírculo, tem grande vantagem no processo de detecção da taxa de infecção por constituírem cerca de 90% *kDNA*^{27,28}.

Apesar da importância desta ferramenta, não há trabalhos no estado do Maranhão com o propósito de estudar infecção de *L. longipalpis*, tendo-se conhecimento apenas do estudo de Pereira²⁰ que determinou a taxa de infecção mínima para *L. whitmani* em uma área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e Balbino²⁹ que empregaram a RAPD – PCR para a análise de polimorfismo entre populações de *L. longipalpis*.

Diante do exposto, este trabalho visa determinar a taxa de infecção natural de *L. longipalpis* em áreas de colonização antiga e recente, situadas na ilha de São Luís-MA, bem como associar a taxa de infecção detectada com o número de casos notificados.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Foram selecionadas duas áreas para a realização do estudo, Prequeira uma localidade rural do município de São José de Ribamar, constituindo-se como área controle e as Vilas Maresia e Thalita aglomerados semi-urbanos do município de Raposa, que no período do estudo (março a agosto de 2005) apresentaram três casos de LVA. Todas as localidades situam-se na Ilha de São Luís-MA, no litoral setentrional brasileiro a 2°32'S e 44°43'W, conforme figura 1.

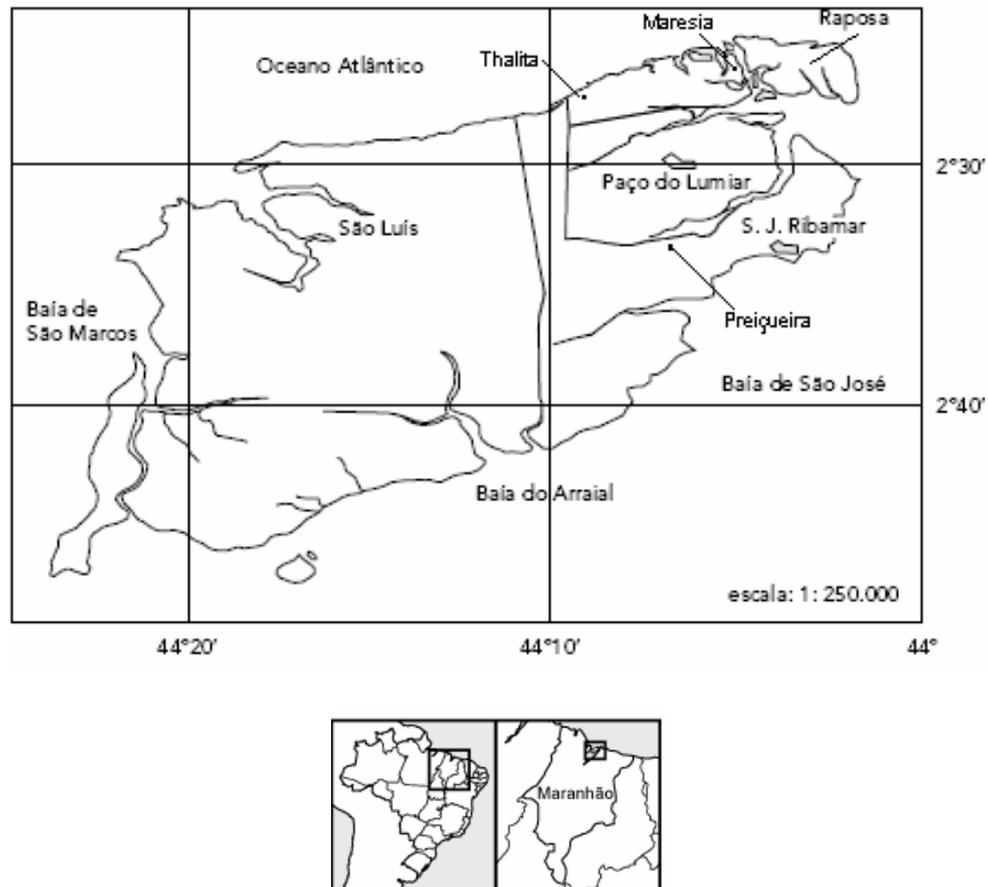


Figura 1. Municípios que integram a ilha de São Luís e áreas de estudo. Fonte: Dias et al. (2003).

O clima da ilha é tropical mesotérmico e úmido, com duas estações bem definidas, a chuvosa de janeiro a junho, que concentra em média 94% do total anual das chuvas; e a estação de estiagem, de julho a dezembro, concentra apenas 6%. O total pluviométrico é elevado (1.900mm) e as temperaturas são elevadas durante o ano todo (26°C em média) com variação anual pequena³⁰. A cobertura vegetal encontra-se bastante modificada, predominantemente constituída por mata secundária e fisionomicamente ainda marcada pela presença de babaçuais³¹.

A localidade Prequeira constitui uma área de colonização antiga, situada na zona rural do município de São José de Ribamar-Maranhão, cujos limites são o Oceano Atlântico (ao

norte), os municípios de Paço do Lumiar e Raposa (a oeste), a baía de São José (ao leste) e o município de São Luís (ao sul)³⁰. O município abrange uma área de 386 km², conta com uma população de 107.384 habitantes sendo 80.139 na zona rural³¹. Conforme o Serviço de Vigilância Epidemiológica (SIVEP)³² a localidade de Preiçueira possui 888 habitantes.

As localidades de Vila Maresia e Residencial Thalita constituem áreas de colonização recente (cerca de 5 anos). Estão situadas no município de Raposa-MA, limitando-se ao norte e a oeste com o Oceano Atlântico, ao sul e leste, com o município de Paço do Lumiar³⁰. O município abrange uma área de 64 km² e conta com uma população de 20.044 habitantes, sendo que 11.370 situam-se na área urbana e destes 19,3% (2.190 hab) dispõem-se nas vilas Maresia e Thalita^{31,32}.

As figuras 2 e 3 mostram as áreas selecionadas para o estudo e os diferentes padrões de organização populacional nestas áreas de colonização antiga (Preiçueira) e recente (Vilas Maresia e Thalita).

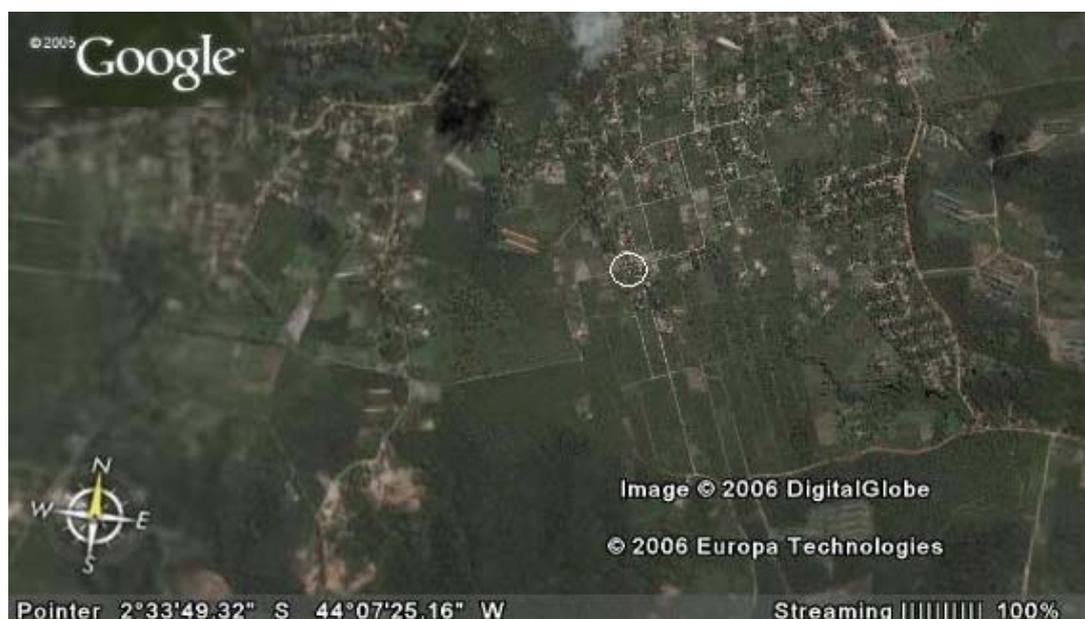


Figura 2: Em círculo, comunidade de Preiçueira, zona rural do município de São José de Ribamar-MA. Fonte: Software Google Earth, 2006.



Figura 3: Em círculo vista das localidades de colonização recente situadas no município de Raposa: (A) Thalita e Maresia (B). Fonte: Software Google Earth, 2006.

Coletas

Para a realização das coletas, foram selecionados domicílios positivos para a presença de flebotomíneos e, mediante autorização do proprietário, foram instaladas armadilhas luminosas tipo CDC (Center of Disease Control) posicionadas em abrigos de animais domésticos no peridomicílio a 1,5 metro de altura em relação ao solo, das 18:00 às 6:00 horas.

Os exemplares coletados foram mantidos no freezer sob temperatura de -7°C e posteriormente triados sob estereomicroscópio conforme sexo e caracteres morfológicos externos.

Para o estudo de infecção natural foram selecionadas as fêmeas de *L. longipalpis*, mediante utilização de caracteres morfológicos específicos, confirmados por dissecação das espermatecas. As fêmeas foram agrupadas em lotes de 10 espécimes (*pool*) e mantidas em freezer a -20°C até o processo de extração de DNA. Os machos foram clarificados e identificados taxonomicamente conforme Young e Duncan³³ e estocados em etanol a 70%.

Extração de DNA e PCR

O processo de extração de DNA, realizado conforme Mukhopadhyay³⁴ modificado por Pereira²⁰, consiste no aquecimento dos *pools* por 10min a 95°C com 20µl de tampão STE (NaCl 0,1 M; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA) seguidos de maceração e acréscimo de tampão STE até completar o volume de 50µl. As amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM (rotações por minuto) por 2 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo.

Para amplificação da região conservada do minicírculo foram utilizados primers específicos para *L. chagasi (infantum)*: RV1 (sense): 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3' e RV2 (antisense): 5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3' segundo Le Fichoux³⁵. A reação ocorreu conforme Lachaud²⁴, com denaturação a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos.

O volume final da reação foi de 50µl composto por 5µl de DNA genômico, Tampão para PCR 1x (Invitrogen), 0,6mg/ml de albumina soro bovino (ABS), 200µM de cada dNTP, 3,0mM de MgCl₂, 50pmol de cada primer, 1,5 U de Taq DNA polimerase. A PCR foi realizada em MJ Research PTC-100 (Peltier Thermal Cycler) tendo como controle positivo 186ng de DNA de *Le. chagasi* (MHOM/BR2000/MERZSTRAIN) obtidos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/ FIOCRUZ-BA) e para controle negativo água ultrapura. Os controles foram utilizados a cada 10 amostras analisadas.

Eletroforese

Os produtos obtidos com a PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x, sob uma voltagem de 5v/cm seguidos por visualização à luz

ultravioleta pela adição de brometo de etídio. Posteriormente, os géis visualizados sob transiluminador (Stratagene Eagle Eye II) foram fotodocumentados.

Cálculo da taxa de infecção natural mínima

A taxa de infecção mínima foi calculada de acordo com a fórmula: MR (minimal rate)= número de grupos (pools) positivos x 100/número total de insetos, proposta por Paiva³⁶. Para análise estatística entre as taxas de infecção natural obtidas, aplicou-se o teste não paramétrico do χ^2 (qui-quadrado).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 3.236 espécimes de *L. longipalpis*, sendo 800 fêmeas e 2.426 machos. As fêmeas utilizadas para o estudo de infecção natural totalizaram 40 *pools* para cada área estuda (Tabela 1).

Conforme a figura 3, os produtos de amplificação apresentaram um padrão de bandas de 145pb compatíveis com o fragmento produzido pelo controle positivo. Desta forma a taxa de infecção mínima por *Le. chagasi* foi de 1,25% para a localidade de Preçueira (que exibiu positividade em 5 *pools*) e 0,25% para o município de Raposa, com positividade em 1 *pool*.

Tabela 1: Número de espécimes de *L. longipalpi* e taxa de infecção natural determinada para áreas de colonização antiga e recente na ilha de São Luís-MA.

| Localidades | Esforço de coletas (hs)* | Nº de espécimes | | Nº de <i>Pools</i> + | Taxa de infecção (%) |
|-----------------|--------------------------|-----------------|-----|----------------------|----------------------|
| | | M | F | | |
| Preçueira | 1.118 | 1.509 | 400 | 5 | 1,25 |
| Maresia/Thalita | 1.584 | 927 | 400 | 1 | 0,25 |

* Número total de horas trabalhadas

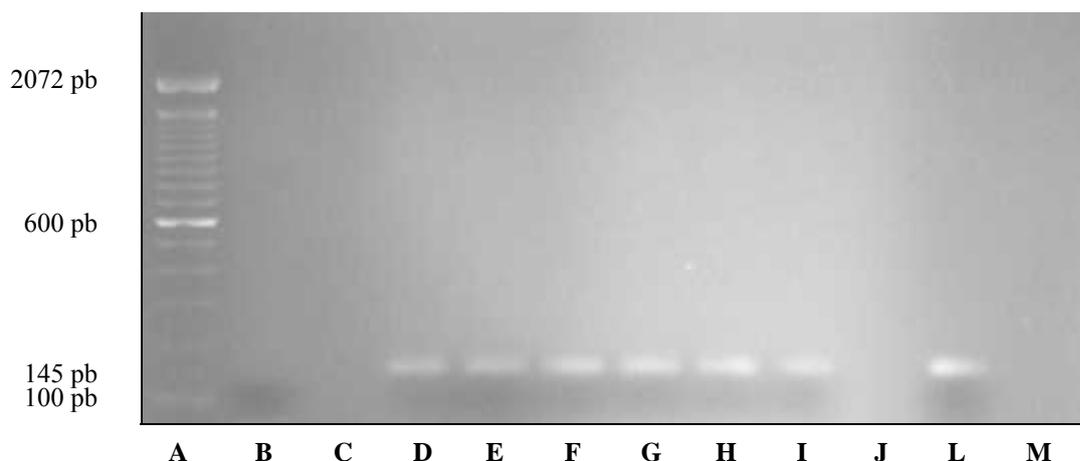


Figura 3. Produtos de amplificação para *Le. chagasi (infantum)*, detectadas em fêmeas de *L. longipalpis*. A: marcador de peso molecular 100pb; B: controle negativo; C; J e M: poço vazio; D a I: amostras positivas; L: controle positivo.

A análise estatística não demonstrou diferenças significativas entre as taxas de infecção natural detectadas ($\chi^2 = 0,1050$; $p > 0,05$; $GL=1$).

A PCR tendo como base a utilização de marcadores construídos a partir dos minicírculos do *kDNA* constitui um método ideal para a análise de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos, e tem sido utilizada devido ao elevado número de cópias destas moléculas por parasita, conferindo maior sensibilidade quando comparada aos métodos tradicionais como a dissecação para visualização de formas promastigotas.

Lachaud²⁵ ao avaliarem seis métodos de PCR a partir de amostras de sangue periférico de cães acometidos por LV, demonstraram que os *primers* derivados do *kDNA* (dentre eles o RV1 e RV2 utilizados neste estudo) mostraram-se mais sensíveis e específicos, quando comparados àqueles derivados de DNA genômico. As reações que utilizaram os

primers RV1/ RV2 e K13A/K13B, foram capazes de detectar infecção em 100% das amostras positivas por sorologia, com uma sensibilidade de 10^{-4} parasitas por tubo de reação.

Vale ressaltar que na localidade Preiçueira o único caso de LVA registrado data de 1982 e os dados disponíveis não são suficientes para confirmá-lo como autóctone. Entretanto, para as vilas Maresia e Thalita, compreendidas em áreas de transmissão ativa de LVA, no período do estudo foram notificados três casos da doença³⁷.

As taxas de infecção obtidas neste trabalho mostraram-se próximas às detectadas por outros estudos de infecção natural em flebotomíneos através da PCR, dentre eles, Miranda³⁸ e Pereira²⁰, que detectaram uma taxa de infecção natural para *L. whitmani* equivalente a 0,74% e 0,8%, respectivamente, ambos em comunidades rurais endêmicas de LTA. Um fato a se considerar é que embora estas localidades sejam predominantemente rurais, todas se situam em áreas endêmicas de LTA, diferente do fato observado em Preiçueira, que embora desprovida de casos recentes de LVA, exibiu taxa de infecção natural similar às áreas endêmicas.

O estudo pioneiro de Ryan e Brazil³⁹ na ilha de São Luís demonstrou uma taxa de infecção natural por *Leishmania* equivalente a 1,8% em 327 fêmeas de *L. longipalpis* analisadas, ao empregarem o método clássico de dissecação do trato digestivo do vetor. Embora as taxas de infecção sejam próximas às detectadas neste estudo, vale ressaltar que os métodos empregados diferem, uma vez que a PCR constitui um método de extrema sensibilidade e especificidade quando comparados à dissecação.

Miranda³⁸ e Pereira²⁰, que detectaram uma taxa de infecção natural para *L. whitmani* equivalente a 0,74% e 0,8%, respectivamente, ambos em comunidades rurais endêmicas de LTA. Um fato a se considerar é que embora estas localidades sejam predominantemente rurais, todas se situam em áreas endêmicas de LTA, diferente do fato observado em Preiçueira, que embora desprovida de casos recentes de LVA exibiu expressiva taxa de infecção natural.

Dentre os trabalhos cuja análise de infecção natural de flebotomíneos foi baseada na técnica de PCR em áreas rurais e urbanas, Gómez-Saladin e colaboradores⁴⁰ detectaram uma taxa de infecção natural por *Leishmania* sp de 1,11% (1/90) e 4,92% (6/122), respectivamente. Estes autores demonstraram que áreas rurais apresentaram a menor taxa de infecção, ao contrário de áreas urbanas. Estas observações diferem deste estudo e embora as taxas detectadas por estes autores tenham sido elevadas, vale ressaltar que o tamanho da amostra empregada foi inferior quando comparado às apresentadas neste estudo, além de permanecerem obscuros os dados referentes à dinâmica de ocupação espacial.

Aransay⁴¹ detectaram através da técnica de seminested PCR, uma taxa de infecção natural de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, equivalente a 5,4% em sete localidades endêmicas de LV em Atenas, Grécia. Esta taxa de infecção pode ser atribuída a fatores como, análise de espécimes individualmente para o estudo de infecção e maior especificidade e sensibilidade da reação, uma vez que a técnica de seminested PCR utiliza como DNA-molde um produto de uma amplificação anterior. Analogamente, Jorquera⁴² ao empregarem o PCR multiplex, obtiveram taxas de infecção para *L. oivalesi* e *L. gomezi* equivalentes a 1,5% e 0,64% utilizando *primers* simultaneamente para os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

Michalsky¹⁵, em um estudo de infecção experimental com flebotomíneos, utilizando *primers* gênero-específicos e complexo-específico detectaram taxas de infecção por PCR equivalentes a 87% para *L. longipalpis* infectados por *Le. chagasi*. Em adição, Cabrera⁴³ obtiveram uma taxa de infecção de 100% em hamsters experimentalmente infectados. Estes trabalhos experimentais demonstram a elevada suscetibilidade do vetor e a sensibilidade e especificidade do método.

Miranda³⁸ demonstraram que o índice de infecção natural de flebotomíneos por promastigotas de *Leishmania* em focos endêmicos de LTA, é baixo variando entre 0 a 1,19%. Desta forma, o índice de infecção natural não justifica a alta taxa de transmissão da doença

em áreas endêmicas. Estes dados corroboram com a taxa de infecção natural obtida para as vilas Maresia e Thalita e indicam que outros fatores precisam ser investigados quanto a endemicidade encontrada nas áreas de ocupação recente. Diversos elementos podem estar associados às diferentes taxas de infecção natural detectadas e a notificação de casos humanos da doença, destacando-se os fatores ambientais, imunológicos e genéticos.

Quanto aos fatores ambientais, em localidades rurais a dinâmica da ocupação dos espaços e o modo de vida da população contribui para a formação de comunidades ecológicas estáveis. Estes fatores contribuem para a manutenção dos ecótopos naturais do vetor, dos reservatórios e conseqüentemente do parasita. Vale ressaltar, que em tais ambientes as agressões antrópicas são mínimas, de forma a manter o ciclo natural do parasita, não culminando na ocorrência de casos de LVA em Preçueira. Por outro lado, modificações drásticas nas condições ambientais causadas pela destruição de habitats, com a associação entre desmatamento/processo de urbanização e a migração dos grupos populacionais, conforme observada nas Vilas Maresia e Thalita, devem influenciar nos elementos da cadeia epidemiológica da doença⁴⁴. A desestabilização dos ecótopos naturais resultaria em um desequilíbrio entre populações de vetor, reservatórios e parasitas, favorecendo a aproximação destes elementos com as populações humanas. Estes processos podem estar associados à emergência de doenças, particularmente as que possuem transmissão por vetores^{45, 46}.

Quanto aos fatores imunológicos, Barral⁴⁷ e Kamhawi⁴⁸ sugerem que em áreas endêmicas para leishmaniose, a exposição a picadas de flebotomíneos não infectados pode influenciar na epidemiologia da doença.

A saliva de insetos hematófagos contém um repertório de substâncias anti-hemostáticas responsáveis pelo sucesso do repasto sanguíneo^{49,50}. Conforme Teixeira⁵⁰ os componentes presentes na saliva de flebotomíneos apresentam atividade imunogênica, induzindo à produção de anticorpos contra diferentes proteínas. Desta forma, animais

expostos a picadas de flebotómíneos ou inoculados com SGS (sonicado da glândula salivar) desenvolvem elevados níveis de anticorpos IgG anti-saliva^{48,51,52}, e há indícios de que estes anticorpos interferem no repasto sanguíneo e conseqüentemente no risco em adquirir a infecção⁵¹. Assim, populações humanas de áreas de colonização antiga que co-habitam com populações de *L. longipalpis*, podem adquirir uma proteção quanto à infecção por *Le. chagasi*, indicando que estas comunidades encontram-se mais expostas à picada do vetor. Nesta perspectiva, Kamhawi⁴⁸ indica que sucessivas picadas de flebotómíneos podem conferir um grau de proteção contra a infecção.

É factível considerar que áreas de colonização recente, sobretudo ocupações irregulares, como Maresia/Thalita, são instáveis, onde a proteção conferida por estes anticorpos podem ser menos expressiva por conta do intenso fluxo migratório, particularmente de pessoas susceptíveis vindo de áreas indenes. Desta forma, mesmo que a taxa de infecção e, até mesmo a densidade do vetor, permaneçam baixas são suficientes para manter a infecção circulando no meio urbano.

Em relação aos fatores genéticos, de acordo com Nunes⁵³ a variabilidade das respostas à infecção por *Leishmania* podem estar relacionadas às características genéticas individuais. Desta forma, polimorfismos no gene *mb12* têm sido pesquisados em diversas populações devido à sua importância na defesa do hospedeiro contra doenças infecciosas e autoimunes^{54,55}. Nunes⁵³ ao avaliar as freqüências alélicas e fenóticas do gene *mb12* observou que a freqüência do alelo *P* em um grupo de indivíduos com história pregressa de LVA é significativamente mais alta, quando comparada aos indivíduos que não desenvolveram a doença. Estes dados indicam que a presença do alelo *P* em homozigose pode estar associado à suscetibilidade à LVA. Adicionalmente, três mutações no éxon 1 do gene *mb12* têm sido relacionadas a baixos níveis séricos de MBL (lectina ligadora de manose), proteína associada à suscetibilidade a diversas doenças infecciosas^{56, 57}.

Além destes aspectos, aliados a ineficiência das estratégias de controle frente a LVA conforme demonstrado por Ashford⁵⁸ e Dietze⁵⁹, ressalta-se a importância da investigação dos elementos envolvidos no ciclo natural da doença, que podem contribuir para a manutenção da infecção em áreas periurbanas.

Relatos da ocorrência de animais sinantrópicos no peridomicílio, tais como raposas e didelfídeos são frequentes conforme a informação dos moradores locais. Recentemente Mendonça⁶⁰ diagnosticaram infecção por *Leishmania* sp. em uma raposa (*Cerdocyon thous*) capturada na área periurbana de Teresina. Lima⁶¹ e Soares⁶² notificaram a presença destes canídeos e de *L. longipalpis* vivendo em grande proximidade a ambientes humanos. Fato posteriormente confirmado, com a detecção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* por Gomes⁶³ em raposas capturadas na mesma área dos estudos anteriores.

Assim, a participação de *C. thous* como reservatório potencial de *Le. chagasi* e a presença de *L. longipalpis* em abrigos de animais domésticos nas proximidades das habitações são fortes elementos para explicar a manutenção da infecção em áreas periurbanas e endêmicas⁶⁴.

Em relação às medidas de controle preconizadas pelo Ministério de Saúde frente a LVA, o controle químico do vetor (uso de inseticida) é baseado na notificação de casos e na classificação epidemiológica de áreas urbanas. Assim, em virtude da taxa de infecção demonstrada na localidade rural, ressaltamos a importância da definição de áreas de risco, com intuito de investigar os elementos que modulam a ocorrência da infecção no meio natural.

Em síntese, a PCR foi capaz de detectar a infecção natural nas populações de flebotomíneos das duas áreas estudadas, independente da existência de casos ativos de LVA, revelando-se como um instrumento de grande importância para a saúde pública, sobretudo, no

monitoramento de infecção natural dos insetos vetores, de modo a prevenir o aparecimento da doença em locais de risco.

Agradecimentos:

Às comunidades de Vila Maresia, Thalita e Prequeira pela receptividade e acolhida; Jorge Moraes pelo auxílio na identificação dos espécimes; Maria Santana Viegas pelo apoio em laboratório; Ao CNPq (Proc. N° 620081/2004-0ACT) e FAPEMA pela concessão de financiamento e bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Institute for One World Health. Visceral Leishmaniasis Fact Sheet. <http://www.oneworldhealth.org>. (Acesso em 06/Ago/2006)
2. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
3. Alencar JE. Leishmaniose visceral no Brasil. Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará 1978; 17/18: 129-148.
4. Travi BL, Jaramillo C, Montoya-Lerma J. *Didelphis marsupialis*, na important reservoir of *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (leishmania) chagasi* in Colombia American Journal Tropical and Medicine and Hygiene 1994; 50 (5): 557-565.
5. Courtenay O, Quinnel RJ, Dye GC. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the creab-eating fox is not important for transmission. Parasitology 2002; 125: 407-414.
6. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: Taxonômic problems. British Medical Bulletin 1972; 28: 44-48.
7. Lainson R, Shaw JJ. A brief history of the genu *Leishmania* (Protozoa: Kientoplastidae) in the Americas, with particular reference to Amazonian Brazil. Ciencia & Cultura, 1992, 44: 94-106.
8. Rodriguez NM, Guglielmo Z, Barrios MA, Barrios RM, Zerpa O, Feliciangeli MD. Genetic homogeneity within *Leishmania (L.) infantum* isolated from human and dogs: the relashioship with the sandfly fauna distribution in endemic áreas of Nueva Esparta State, Venezuela. Parasitology 2005; 130: 611-619.
9. Rebelo JMM, Oliveira ST, Silva FS, Barros VLL, Costa JML. Flebótomos (Diptera: Psycodidae) da ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1999; 33 (3): 247-253.
10. Araujo JC, Rebêlo JMM, Carvalho ML, Barros VLL. Composição de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município da Raposa – MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y vetores 2000; 7: 33-47.
11. Barros VLL, Rebêlo JMM, Silva FS. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira no município do Paço do Lumiar, estado do Maranhão, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Caderno de Saúde Pública 2000; 16: 265-270.

12. Barros VLL. Estudo da importância do *Gallus gallus* como chamariz da *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) no ambiente doméstico: caracterização da fonte alimentar do flebotomíneo na localidade Preiçueira, município de São José de Ribamar, Maranhão em 2005. [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão; 2006
13. Carvalho ML, Rebêlo JMM, Araújo JC, Barros VLL. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y vectores; 2000 7: 19-32.
14. Dias FOP, Lorosa ES, Rebelo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Psychodidae: Phlebotominae). Cadernos de Saúde Pública 2003; 19 (5): 1373-1380.
15. Michalsky E.M, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotominae sandflies (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2002; 44 (5): 255-259.
16. Rodríguez NM, Guzman B, Rojas A. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of patients by PCR and hybridization. Journal Clinical Microbiology 1994, 9: 2246-2252.
17. Silva OS, Grunewald J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) of Rio Grande do Sul, Brasil and *Leishmania* (Viannia) infections. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1999, 94: 579-582.
18. Peixoto AA, Gomes CA, Amoretty PR, Lins RMMA, Meireles-Filho, ACA, Souza, NA, et al. New molecular markers for phebotominae sand flies. International Journal of Parasitology 2001; 37: 635-639.
19. Maingon RDC, Ward RS, Hamilton JGC, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, et al. Genetic identification of two sibling species od *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. Molecular Ecology 2003; 12: 1879-1894.
20. Pereira YNO. Estrutura de comunidade, preferência alimentar e capacidade vetorial de flebotomíneos em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar na amazônia maranhense, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão; 2004.
21. Shapiro T A. Englund P. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annual Review Microbiology 1995; 49: 117-143.
22. Brewster S, Aslett M, Barker DC. Kinetoplast DNA Minicircle Database. Parasitology Today 1998, 14: (11) 437-438.
23. Lambson B, Smyth A, Barker D. Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. Molecular and Biochemical Parasitology 1999; 101: 229-232.

24. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 2002; 125: 197-207.
25. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40: 210-215.
26. Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, Romanha AJ. Simple form preservation and *Leishmania* extraction from human lesions for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *American Journal Tropical and Medicine and Hygiene*, 2001 65 (6) 902-906.
27. Perez JE, Ogusuku E, Ingá R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1994, 88: 161-164.
28. Cabrera OL, Mustermann LE, Cárdenas R, Gutierrez R, Ferro C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomedica* 2002; 22 (3): 296-302.
29. Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, Andrade PP, Castro JAF, et al. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Tropica* 2006, *no prelo*.
30. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Atlas do Estado do Maranhão. IBGE; 1984.
31. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Censo Demográfico: Resultado do universo relativo às características da população, Maranhão. IBGE. v9. 1991.
32. Serviço de Vigilância Epidemiológica. <http://www.sivep.br> (acesso em 18/Set/2006).
33. Young DC, Duncan MA Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memories of the American Entomological Institute*; 1994; 54: 1-881.
34. Mukhopadhyay J, Ghosh K, Braig HR. Identification of cutaneous Leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. *Acta Tropica* 2000; 76: 277-283.
35. Le Fichoux Y, Quaranta J.F, Aueuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rouseau D, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37 (6): 1953-1957.
36. Paiva, B.R; Secundino, N.F.C; Nascimento, J.C; Pimenta, P.F.P; Galati, E.A.B; Andrade Júnior, H.F; Malafronte, R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies base don mini-exon gene PCR. *Acta Tropica* 2006; 99: 252-259.

37. Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2006.
38. Miranda, J. C; Reis, E; Schriefer, A; Gonçalves, M; Reis, M. G.; Carvalho, L; Fernandes, O; Barral-Netto, M; Barral, A. 2002. Frequency of Infection of *Lutzomyia Phlenbotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Área as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reation. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97 (2) 185-188.
39. Ryan L, Brazil RP. *Leishmania* infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the island of São Luís, Maranhão, State, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1984; 79 (3): 383-384.
40. Gómez-Saladim E, Doud CW, Maroli M. Surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a flourogenic real-time plymerase chain reaction. American Journal Tropical and Medicine and Hygiene 2005, 72 (2): 138-141.
41. Aransay A M, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicicle kinetoplatic DNA. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66: 1933-1938.
42. Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detections of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. Captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2005; 100 (1): 43-46.
43. Cabrera OL, Mustermann LE, Cárdenas R, Ferro C. PCR para la confirmación de transmisión eperimental de *Leishmania chagasi* a hámster sano por picadura de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Biomedica 2003; 23: 239-44.
44. Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phebotominae sand flies (Díptera: Psychodidae) associated with the appearence of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002; 97 (5): 645-647.
45. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. International Journal for Parasitology 2000; 30: 1395-1405.
46. Gomes AC. Mecanismos e significado da domiciliação. Revista de Saúde Pública 1986; 20 (5) 385- 390.
47. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? American Journal Tropical and Medicine and Hygiene 2000; 62 (6) 740-745.
48. Kamhawi S, Yasmine B, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. Sciense 2000; 290: 1351-1354.

49. Ciprandi A, Horn F, Termingnoni C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos coagulantes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2003; 25 (4) 250-262.
50. Teixeira C, Gomes R, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C. Influência da saliva de flebotomíneos na leishmaniose experimental e humana. *Gazeta Médica* 2005; 75 (1) 18-23.
51. Ghosh K, Mukhopadhyay J. The effect of anti-saliva fly antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *International Journal Parasitology* 1998; 28: 275-281.
52. Volf P, Rohousova I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 2001; 122: 37-41.
53. Nunes SPH. Polimorfismos no gene *mbl2* (lectina ligadora de manose) e suscetibilidade à leishmaniose visceral americana em região pré-amazônica, Brasil. 2006. [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão; 2004.
54. Tsutsumi A, Takahashi R, Sumida T: Mannose binding lectin: Genetics and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4:364.
55. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the manose binding protein gene. *Molecular Genetics* 1992; 1: 709
56. Turner MW, Hamvas RMJ: Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Immunogenetics* 2000; 302-305.
57. Santos IKF, Costa CHN, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B, et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2001; 5212-5215.
58. Ashford, DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, et al. Studies on Control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal Tropical and Medicine and Hygiene* 1998; 59(1) 53–57
59. Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michaelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brasil. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 25:1240-1242.
60. Mendonça IL, Lima Neto AS, Teixeira TLA, Silva FO, Trigueiro AS, Costa CHN. *Cerdocyon thous* infectada com *Leishmania* nos arredores de Teresina, PI. In: XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Belém-PA: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2003 p. 201.
61. Lima EFO, Gomes FVJ, Antunes JEL, Farias TJC, Costa CHN. 2003. Características do habitat de raposas nos arredores de Teresina-PI. In: XXXI Congresso da Sociedade

Brasileira de Medicina Tropical. Belém-PA: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2003 p. 230.

62. Soares MRA, Teixeira TLA, Morais SRC, Antunes JEL, Mendonça IL, Costa CHN. Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* em ecótopos silvestres ocupados por raposas, na área periurbana de Teresina-PI. In: XL Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Aracaju-SE 2004; 37 (Suppl.1) 185-186.
63. Gomes RB, Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MSP et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2006, *no prelo*.
64. Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1999; 94 (4): 427-432.



ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo e política editorial

Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health (CSP) publica artigos originais que contribuam ao estudo da saúde pública em geral e disciplinas afins, como epidemiologia, nutrição, parasitologia, ecologia e controle de vetores, saúde ambiental, políticas públicas e planejamento em saúde, ciências sociais aplicadas à saúde, dentre outras.

Serão aceitos trabalhos para as seguintes seções: (1) **Revisão** - revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes à saúde pública (máximo de 8.000 palavras); (2) **Artigos** - resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual (máximo de 6.000 palavras); (3) **Notas** - nota prévia, relatando resultados parciais ou preliminares de pesquisa (máximo de 1.700 palavras); (4) **Resenhas** - resenha crítica de livro relacionado ao campo temático de CSP, publicado nos últimos dois anos (máximo de 1.200 palavras); (5) **Cartas** - crítica a artigo publicado em fascículo anterior de CSP ou nota curta, relatando observações de campo ou laboratório (máximo de 1.200 palavras); (6) **Artigos especiais** - os interessados em contribuir com artigos para estas seções deverão consultar previamente o Editor; (7) **Debate** - artigo teórico que se faz acompanhar de cartas críticas assinadas por autores de diferentes instituições, convidados pelo Editor, seguidas de resposta do autor do artigo principal (máximo de 6.000 palavras); (8) **Fórum** - seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual (máximo de 12.000 palavras no total). O limite de palavras inclui texto e referências bibliográficas (folha de rosto, resumos e ilustrações serão considerados à parte).

Apresentação do texto

Serão aceitas contribuições em português, espanhol ou inglês. O original deve ser apresentado em espaço duplo e submetido em 1 via, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, com margens de 2,5cm. Deve ser enviado com uma página de rosto, onde constará título completo (no idioma original e em inglês) e título corrido, nome(s) do(s) autor(es) e da(s) respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo apenas do autor responsável pela correspondência. Todos os artigos deverão ser encaminhados acompanhados de disquete ou CD contendo o arquivo do trabalho e indicação quanto ao programa e à versão utilizada (somente programas compatíveis com Windows). Notas de rodapé não serão aceitas. É imprescindível o envio de carta informando se o artigo está sendo encaminhado pela primeira vez ou sendo reapresentado à nossa secretaria. No envio da segunda versão do artigo deverá ser encaminhada uma cópia impressa do mesmo, acompanhada de disquete.

Colaboradores

Deverão ser especificadas, ao final do texto, quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo.

Ilustrações

As figuras deverão ser enviadas em impressão de alta qualidade, em preto-e-branco e/ou diferentes tons de cinza e/ou hachuras. Os custos adicionais para publicação de figuras em cores serão de total responsabilidade dos autores. É necessário o envio dos gráficos, separadamente, em arquivos no formato WMF (Windows Metafile) e no formato do programa em que foram gerados (SPSS, Excel, Harvard Graphics etc.), acompanhados de seus parâmetros quantitativos, em forma de tabela e com nome de todas as variáveis. Também é necessário o envio de mapas no formato WMF, observando que os custos daqueles em cores serão de responsabilidade dos autores. Os mapas que não forem gerados em meio eletrônico devem ser encaminhados em papel branco (não utilizar papel vegetal). As fotografias serão impressas em preto-e-branco e os originais poderão ser igualmente em preto-e-branco ou coloridos, devendo ser enviados em papel fotográfico no formato 12x18cm. O número de tabelas e/ou figuras deverá ser mantido ao mínimo (máximo de cinco tabelas e/ou figuras). Os autores deverão arcar com os custos referentes ao material ilustrativo que ultrapasse este limite.

Resumos

Com exceção das contribuições enviadas às seções *Resenha* ou *Cartas*, todos os artigos submetidos em português ou espanhol deverão ter resumo na língua principal e em inglês. Os artigos submetidos em inglês deverão vir acompanhados de resumo em português ou em espanhol, além do *abstract* em inglês. Os resumos não deverão exceder o limite de 180 palavras e deverão ser acompanhados de 3 a 5 palavras-chave.

Nomenclatura

Devem ser observadas rigidamente as regras de nomenclatura zoológica e botânica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

Pesquisas envolvendo seres humanos

A publicação de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos está condicionada ao cumprimento dos princípios éticos contidos na Declaração de Helsinki (1964, reformulada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000), da World Medical Association (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>), além do atendimento a legislações específicas (quando houver) do país no qual a pesquisa foi realizada. Artigos que apresentem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos deverão conter uma clara afirmação deste cumprimento (tal afirmação deverá constituir o último parágrafo da seção Metodologia do artigo). Após a aceitação do trabalho para publicação, todos os autores deverão assinar um formulário, a ser fornecido pela Secretaria Editorial de CSP, indicando o cumprimento integral de princípios éticos e legislações específicas.

Referências

As referências devem ser numeradas de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Devem ser identificadas por números arábicos sobrescritos (Ex.: Silva ¹). As referências citadas somente em tabelas e figuras devem ser numeradas a partir do número da última referência citada no texto. As referências citadas deverão ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos *Requisitos Uniformes*

para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos (<http://www.icmje.org>). Todas as referências devem ser apresentadas de modo correto e completo. A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).

Exemplos:

Artigos de periódicos

Artigo padrão

Até 6 autores:

Barbosa FS, Pinto R, Souza OA. Control of schistosomiasis mansoni in a small north east Brazilian community. Trans R Soc Trop Med Hyg 1971; 65:206-13.

Mais de 6 autores:

DeJong RJ, Morgan JA, Paraense WL, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PF, et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. Mol Biol Evol 2001; 18:2225-39.

Instituição como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996; 116:41-2.

Sem indicação de autoria

Cancer in South Africa [Editorial]. S Afr Med J 1994; 84:15.

Volume com suplemento

Deane LM. Simian malaria in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87 Suppl 3:1-20.

Fascículo com suplemento

Lebrão ML, Jorge MHPM, Laurenti R. Hospital morbidity by lesions and poisonings. Rev Saúde Pública 1997; 31 (4 Suppl):26-37.

Parte de um volume

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann Clin Biochem 1995; 32 (Pt 3):303-6.

Parte de um fascículo

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in aging patients. N Z Med J 1994; 107 (986 Pt 1):377-8.

Livros e outras monografias

Indivíduo como autor

Barata RB. Malária e seu controle. São Paulo: Editora Hucitec; 1998.

Editor ou organizador como autor

Duarte LFD, Leal OF, organizadores. Doença, sofrimento, perturbação: perspectivas etnográficas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1998.

Denzin NK, Lincoln YS, editors. Handbook of qualitative research. Thousand Oaks: Sage Publications; 1994.

Instituição como autor e publicador

Institute of Medicine. Looking at the future of the Medicaid programme. Washington DC: Institute of Medicine; 1992.

Capítulo de livro

Coelho PMZ. Resistência e suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: Barbosa FS, organizador. Tópicos em malacologia médica. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1995. p. 208-18.

Eventos (anais de conferências)

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. In: Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Trabalho apresentado em evento

Bengtson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Coangress on Medical Informatics. Amsterdam: North Holland; 1992. p. 1561-5.

Dissertação e tese

Escobar AL. Malária no sudoeste da Amazônia: uma meta-análise [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 1994.

Outros trabalhos publicados

Artigo de jornal

Novas técnicas de reprodução assistida possibilitam a maternidade após os 40 anos. Jornal do Brasil 2004 Jan 31; p. 12.

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3.

Documentos legais

Decreto n. 1.205. Aprova a estrutura regimental do Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal, e dá outras providências. Diário Oficial da União 1995; 2 ago.

Material eletrônico

CD-ROM

La salud como derecho ciudadano [CD-ROM]. Memoria del VI Congreso Latinoamericano de Ciencias Sociales y Salud. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2001.

Internet

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas da saúde: assistência médico-sanitária. <http://www.ibge.gov.br> (acessado em 05/Fev/2004).

© 2006 Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz

Rua Leopoldo Bulhões, 1480
21041-210 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
Tel.: +55 21 2598-2511 / 2598-2508
Fax: +55 21 2298-2737 / 2598-2514



cadernos@ensp.fiocruz.br