

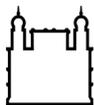
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ESTUDO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA
REGIÃO URBANA DO MUNICÍPIO DE TIMÓTEO E NO PARQUE
ESTADUAL DO RIO DOCE, MINAS GERAIS, BRASIL

CRISTIAN FERREIRA DE SOUZA

Rio de Janeiro
Novembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CRISTIAN FERREIRA DE SOUZA

Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, para obtenção do título de Doutor.

Orientadores: Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho

Rio de Janeiro
Novembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S729 Souza, Cristian Ferreira de

Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil / Cristian Ferreira de Souza. – Rio de Janeiro, 2015.
xviii, 107 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 73-90

1. *Leishmania*. 2. Flebotomíneos. 3. Reservatórios. 4. Vetores. 5. Fonte alimentar. 6. Infecção. I. Título.

CDD 616.9364



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: CRISTIAN FERREIRA DE SOUZA

**ESTUDO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA REGIÃO
URBANA DO MUNICÍPIO DE TIMÓTEO E NO PARQUE ESTADUAL DO RIO
DOCE, MINAS GERAIS, BRASIL**

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho

Aprovada em: 26/11/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Elizabeth Ferreira Rangel - IOC/FIOCRUZ (Presidente da banca)
Prof. Dr. Paulo Sergio D'Andrea - IOC/FIOCRUZ (Membro da banca)
Prof. Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto D'Andrea - UFF/RJ (Membro da banca)
Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez - UFF/RJ (Suplente)
Prof. Dra. Daniela de Pita Pereira - IOC/FIOCRUZ (Suplente)

Rio de Janeiro, 26 de novembro de 2015

À minha família, em especial minha mãe, Perpetua

v

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

A todos meus familiares e amigos de Timóteo, que sempre torceram por mim.

À Prefeitura Municipal de Timóteo, que foi uma grande parceira por meio da Secretaria Municipal de Saúde, ao meu grande amigo e Prefeito Keisson Drumond.

Aos funcionários e meus amigos da Prefeitura Municipal de Timóteo Carlos Alberto e Pipo que sempre estiveram presentes, colocando a mão na massa. Aos motoristas e técnicos que trabalharam aos sábados e domingos em prol da realização do trabalho.

A todas as pessoas do município de Timóteo que participaram do projeto, em especial aos proprietários das residências, que nos permitiram desenvolver todo esse projeto.

Aos funcionários do Parque Estadual do Rio Doce, que deram total apoios nas coletas.

Ao Ministério da Saúde e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), pela concessão de recursos financeiros. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e à Universidade Federal de Viçosa, na qual foram realizadas a maioria dos experimentos, pela parceria e acolhimento.

A todos os técnicos do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em especial José Luiz por todo apoio.

Aos amigos, professores e alunos do departamento do Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, que sempre buscaram me ajudar, em especial as estagiárias Mirelle, Rhiala, Isabella e Bárbara, e as alunas de doutorado Juliana e Keila.

Aos moradores da República Os Largado: Bruno, Anderson, Túlio, Luiz Fernando e Rafael, e aos agregados que foram mais que parceiros e companheiros nessa jornada, em especial Juliana, Virgínia, Cristiane e Júnior.

Aos integrantes da banca examinadora, Dra. Elizabeth Rangel, Dr. Paulo D'Andrea e Dr. Cicero Neto pelas sugestões, críticas e elogios.

A todos alunos e funcionários do Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/Fiocruz).

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, em especial aos amigos Bernardo, Jhonatan, Neto, Fabiano e Alex pela parceria durante as expedições de coleta.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC, em especial as minhas grandes amigas Andressa e Vanessa pela parceria, ajuda e companheirismo incondicional, tamo junto!

À Giuliana pela amizade e o grande empenho ao ajudar na análise dos dados.

Aos amigos do IOC, que acompanharam bem de perto toda essa jornada, em especial Geovane, André, Carol, Roberta, Cynthia e Bernardo.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade, aos Professores que sempre me apoiaram e um agradecimento especial a Rita da secretaria do curso pela disponibilidade em ajudar.

Ao meu orientador e amigo José Dilermando, pela calma e tranquilidade, pelas sugestões, pelos ensinamentos, pela oportunidade, pelo acolhimento no seu laboratório, pela amizade. Obrigado por tudo!

À minha orientadora e amiga Paula Bevilacqua, pela atenção e críticas, pelos ensinamentos e paciência, pela confiança e dedicação, pela convivência, pelo exemplo de profissionalismo e pela grande amizade, serei sempre grato!

A meu orientador e amigo Reginaldo Brazil pela críticas, sugestões, atenção, pelos ensinamentos, pela alegria de sempre, pelo acolhimento, oportunidade do aprendizado, meu muito obrigado!

À minha grande amiga Leticia pelo acolhimento e cumplicidade, companheira de todos momentos, pessoa abençoada que Deus colocou no meu caminho.

Às minhas irmãs e meus irmãos, sobrinhos, sobrinhas, cunhados e cunhadas, que estiveram ao meu lado e, juntos com meus pais, formam os pilares que sempre me apoiaram.

À minha mãe Perpetua, que sempre foi um exemplo a ser seguido, e mesmo com todas dificuldades sempre foi confiante e soube me incentivar, e ao meu pai Sebastião (in memoriam).

Por fim, agradeço a Deus, que da melhor forma possível permitiu a presença de todas essas pessoas na minha vida.

Obrigado a todos, essa conquista é nossa!

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

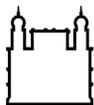
Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no parque estadual do rio doce, Minas Gerais, Brasil

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Cristian Ferreira de Souza

O presente trabalho se caracterizou como estudo descritivo comparando duas áreas: uma área silvestre onde se encontra o Parque Estadual do Rio Doce (PERD) e outra área urbana, situadas no município de Timóteo-MG. Objetivando estudar o ciclo de transmissão dos agentes das leishmanioses nas duas áreas, verificando possíveis alterações no seu padrão de transmissão. Foram realizadas coletas de flebotomíneos com armadilhas luminosas HP, coleta de amostras biológicas de animais silvestres, sinantrópicos e cães, o período de coletas foi entre setembro de 2012 a fevereiro de 2014. Foram realizados estudos de infecção natural por *Leishmania* spp., utilizando o gene ITS1, em todas as amostras coletas. E por fim um estudo de fonte alimentar em fêmeas alimentadas naturalmente. As análises foram realizadas com técnicas moleculares (PCR/Sequenciamento). Ficou claro que no município de Timóteo há pelo menos três espécies de *Leishmania*: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. Dando evidência a grande presença de *Leishmania braziliensis*, identificada em amostras biológica de flebotomíneos, roedores, marsupiais e cães. A participação de flebotomíneos e animais, possíveis reservatório, no ciclo da *Leishmania* spp. no município de Timóteo ficou mais evidente após as observações da presença infecção natural por *Leishmania braziliensis*. *Nyssomyia whitmani* foi a espécie mais capturada na área urbana, enquanto no PERD foi *Pressatia choti* ambas as espécies foram identificadas com infecção natural por *Leishmania braziliensis*. A presença de *Rattus rattus* e *Mus musculus*, com infecção natural, sugerem que sejam possíveis reservatórios de *Leishmania* spp. no município. Preocupante também é a possibilidade da participação de cães, uma vez que tiveram amostras de sangue com infecção natural. E por fim, e não menos importante foi o registro da participação de *Gallus gallus* (galinha) e *Sus scrofa* (porco) enquanto fonte alimentar de flebotomíneos, o que ajuda a manter o ciclo de vida dos vetores na área urbana do município.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

“STUDY OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN URBAN AREA OF TIMÓTEO AND
PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE, MINAS GERAIS, BRAZIL”

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Cristian Ferreira de Souza

This work was characterized as a descriptive study comparing two areas: a wild area where is located the Parque Estadual do Rio Doce (PERD) and other urban area, located in municipality of Timóteo-MG, in order to study the transmission' agents of cycle of leishmaniasis in both areas suggested checking possible changes in their transmission's pattern. Sandfly captures were conducted with HP light traps, collecting biologies samples of wild animals, synanthropic and dogs, the period of collections were between September 2012 to February 2014. A study of natural infection of *Leishmania spp* were performed using the ITS1 gene in all collected samples. And a food meals for the study in females fed naturally. Analyses were performed using molecular techniques (PCR/ Sequencing). It was clear that in Timóteo's municipality exist at least three species of *Leishmania*: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*. Giving evidence of the strong presence of *Leishmania braziliensis*, identified in biological samples of sandflies, rodents, marsupials and dogs. Participation of sand flies and animals, possible reservoirs of the *Leishmania spp* cycle. In Timóteo became more evident after the observations with the presence of *Leishmania braziliensis* natural infection. *Nyssomyia whitmani* was the most captured species in urban areas, while in the PERD was *Pressatia choti*, both species were identified with *Leishmania braziliensis* natural infection. The presence of *Rattus rattus* and *Mus musculus* with natural infection, suggests they are potential reservoirs of *Leishmania spp*. in the municipality. The possibility of the participation of dogs is also worrying because of found of blood samples with natural infection. Finally but not less important was the record of participation of *Gallus gallus* (chicken) and *Sus scrofa* (pigs) as a food source of sand flies, which helps keep the vector life cycle in the urban area of the municipality.

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 As leishmanioses	3
2.2 Agentes etiológicos das leishmanioses.....	4
2.3 Os vetores no ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i> spp.....	6
2.4 Os reservatórios na transmissão da <i>Leishmania</i> spp.....	7
2.5 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	9
2.6 Epidemiologia das Leishmanioses	10
2.7 Uso de ferramentas moleculares para detecção e identificação de <i>Leishmania</i> spp.....	13
2.8 O estudo da variabilidade genética	15
3 OBJETIVO	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Caracterização da área de estudo	18
4.2 Estudos dos mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos.....	19
4.2.1 Seleção de pontos de coleta	19
4.2.2 Coleta de sangue dos animais domésticos	20
4.2.3 Captura dos pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos	20
4.3 Estudo dos flebotomíneos.....	23
4.3.1 Captura dos flebotomíneos	23

4.3.1.1	Armadilhas instaladas na trilha do Juquita localizada no PERD.....	23
4.3.1.2	Armadilhas instaladas na área urbana do município	24
4.3.2	Identificação dos flebotomíneos.....	25
4.4	Ensaio molecular para detecção de <i>Leishmania</i> spp.....	26
4.4.1	Extração de DNA das amostras coletadas.....	26
4.4.2	PCR para verificar a infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. nas amostras coletadas.	27
4.4.3	Clonagem, sequenciamento e estudo de variabilidade genética das amostras positivas na PCR para identificação de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. 29	
4.5	Extração, PCR e sequenciamento das fêmeas alimentadas.....	32
4.6	Análises dos dados	33
4.7	Aspectos éticos	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Estudo dos flebotomíneos coletados.....	36
5.1.1	Flebotomíneos do Parque Estadual do Rio Doce	38
5.1.2	Flebotomíneos da área urbana de Timóteo	40
5.1.3	Análise de correlação entre a presença de flebotomíneos e sazonalidade..	43
5.2	Análise de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. nas amostras coletadas ..	45
5.2.1	Estudo da infecção natural nas fêmeas de flebotomíneos.....	45
5.2.2	Estudo da infecção natural nos roedores e marsupiais.....	49
	Os dados de infecção em <i>Mus musculus</i> e <i>Rattus rattus</i> são de grande importância epidemiológica, sua capacidade de dispersão somada a capacidade de adaptação aos mais variados ambientes, tornam essas espécies um grande problema de saúde pública com possibilidade de participação direta no ciclo de transmissão dos agentes das leishmanioses.....	55
5.2.3	Estudo da infecção natural em cães	55
5.3	Estudo da variabilidade genética das amostras biológicas	58

5.4	Identificação das sequências de <i>Leishmania</i> spp. quanto espécies.	62
5.5	Estudo de fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneo alimentadas	68
6	CONCLUSÕES	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO 1	91
ANEXO 2	92
ANEXO 3	93
ANEXO 4	95
ANEXO 5	99
ANEXO 6	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp. - Fonte: adaptado de CDC (2015).....	9
Figura 2: Status de endemidade de leishmaniose tegumentar no mundo, dados de 2013 - Fonte: adaptado de WHO (2015).....	11
Figura 3: Status de endemidade de leishmaniose visceral no mundo, dados de 2013 - Fonte: adaptado de WHO (2015).....	12
Figura 4: (1) Ilustração do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil; (2) (●) Pontos indicando a distribuição de armadilhas luminosa na Trilha do Juquita no PERD, Minas Gerais.	24
Figura 5: Mapa ilustrando a distribuição de armadilhas na área urbana do município de Timóteo-MG, Brasil (●) Pontos indicando a localização a distribuição de armadilhas luminosa na Trilha do Juquita no PERD, Minas Gerais.	25
Figura 6: Região intergênica do ITS1.....	28
Figura 7: Mapa de densidade de Kernel, demonstrando a densidade de flebotomíneos, considerados vetores, coletados no PERD, Timóteo-MG, 2012-2014..	40
Figura 8: Mapa de densidade de Kernel, demonstrando a densidade de flebotomíneos, capturado nos domicílios da área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014.	42
Figura 9: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp em fêmeas de flebotomíneo coletadas no PERD e área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (100pb); CN: Controle negativo (água pura livre de DNA); CP: controle positivo de <i>Leishmania braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903); 01, 02, 03, 04, 06, 08, 09, 13, 14, 15 e 17: amostras negativas; 05, 07, 10, 11, 12 e 16: amostras positivas.	46
Figura 10: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em roedores e marsupiais coletados no PERD e área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014. Gel de agarose 2% corado com gel Red, PM: marcador de pares de base (100pb); CN: Controle negativo (água pura livre de DNA); CP: controle positivo de	

<i>Leishmania braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903); 07: amostras negativas; 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 08: amostras positivas.....	50
Figura 11: Resultado de análise sorológica (DPP® e ELISA) em sangue canino, coletado na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014.	56
Figura 12: Resultado da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em amostras de sangue canino, coletadas na área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (100pb); CN: Controle negativo (água pura livre de DNA); CP: controle positivo de <i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903); 02, 04, 05 e 06: amostras negativas; 01, 03 e 07: amostras positivas.....	57
Figura 13: Resultado de análise molecular (PCR) em sangue canino, coletado na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014.....	58
Figura 14: Ilustração do alinhamento das sequências das amostras positivas no estudo da infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em amostras biológicas coletadas em Timóteo-MG, 2012-2014.	59
Figura 15: Árvore filogenética com sequências nucleotídicas de amostras positivas do estudo de infecção por <i>Leishmania</i> spp. em amostras biológicas coletadas no município de Timóteo-MG, 2012-2014.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Flebotomíneos capturados no PERD e área urbana de Timóteo-MG, segundo sexo e local de captura, 2012-2014.....	37
Tabela 2: Total de flebotomíneos coletados distribuídos pela distância entre a borda em direção ao interior da mata, Parque Estadual do Rio Doce, Timóteo-MG, 2012-2014.	39
Tabela 3: Estudo sazonal de flebotomíneos capturados, segundo precipitação, umidade e temperatura, coletados no Parque Estadual do Rio Doce e na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014.....	44
Tabela 4: Taxa de infecção por <i>Leishmania</i> spp. em fêmeas de flebotomíneo segundo espécie, coletadas no Parque Estadual do Rio Doce e na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014.	48
Tabela 5: Resultado da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em roedores e marsupiais, segundo local de coleta, Timóteo-MG, 2012-2014	52
Tabela 6: Frequência de amostras positivas na investigação de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em roedores e marsupiais, segundo local de coleta, Timóteo-MG, 2012-2014	54
Tabela 7: Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> spp. presente nos animais coletados, segundo área de coleta, Timóteo-MG, 2012-2014.....	66
Tabela 8: Resultado da identificação de fonte alimentar em fêmeas de flebotomíneo naturalmente alimentadas coletadas no <i>município de</i> Timóteo-MG, 2012-2014.....	70

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, sua distribuição geográfica, vetores e formas clínicas.	5
Quadro 2: Relação das sequências depositadas no Genbank utilizadas na análise filogenética	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLA	DESCRIÇÃO
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GPS	Global Positioning System
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IEF/MG	Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITS1	I nternal T ranscribed Spacer 1
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PERD	Parque Estadual do Rio Doce
WHO	World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças enzoóticas e zoonóticas causadas por protozoários parasitos, morfologicamente similares, do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e transmitida por insetos pertencentes à família Psychodidae (Chance, 1985).

Segundo a Organização Mundial de Saúde a leishmaniose ocorre em quatro continentes e é considerada endêmica em 90 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (WHO, 2010). Aproximadamente 90% dos casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. No Brasil, a LT encontra-se em franca expansão geográfica, sendo que no início da década de 80, haviam sido registrados casos autóctones em 19 estados e, em 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federativas do país (Brasil, 2015).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, no período de 1988 a 2009, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresentou média anual de 26.021 casos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,1 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando-se os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. Em Minas Gerais, no período de 1997 a 1999, houve aumento de 44,3% no número de casos, e o coeficiente de detecção passou de baixo (<3,00/100.000 hab.) em 1985 para alto (11,00<71,00/100.000 hab.) em 1999 (Brasil, 2007). Conforme informações da Secretaria Municipal de Saúde a cidade de Timóteo-MG possui registros sistematizados de casos humanos de LTA desde 2002, totalizando 164 casos até o ano de 2010. Entretanto, a investigação desses casos é um processo pouco eficiente e moroso. Para o efetivo estabelecimento de medidas de controle da LTA é importante o conhecimento da epidemiologia desse agravo, identificando com mais eficiência os possíveis reservatórios existentes e as espécies de flebotomíneos e *Leishmania* que participam do ciclo de transmissão da *Leishmania* spp. na região.

É notoriamente reconhecido que as leishmanioses são doenças negligenciadas. Se por um lado, são doenças que começaram a ser formalmente

descritas no Brasil entre o final do século XIX e início do século passado (Moreira, 1895; Lindemberg, 1909; Carini e Paranhos, 1909; Vianna, 1911; Splendore, 1912), por outro, não são privilegiadas enquanto objeto de investigação a exemplo de outras doenças que acometem as populações humanas mais recentemente. Como consequência, ainda existem várias lacunas no conhecimento referentes, por exemplo, à biologia dos vetores e do parasita ou à compreensão dos processos mais ou menos recentes de mudança do perfil epidemiológico das leishmanioses caracterizada pela franca expansão da doença no território brasileiro.

As leishmanioses sofreram forte modificação em seu perfil epidemiológico nos últimos anos, passando de uma doença tipicamente de áreas silvestres para áreas urbanas. Essas mudanças epidemiológicas trouxeram lacunas que não foram preenchidas envolvendo o seu ciclo de transmissão (vetores, reservatórios e *Leishmania*). Até o momento, não está claro se o ciclo de transmissão da *Leishmania* spp. nas áreas urbanas envolve os mesmos vetores, reservatórios e agentes em relação às áreas silvestres. Muitas são as dúvidas relacionadas à mudança do ciclo silvestre para o urbano.

Nesse sentido, o presente estudo pretende contribuir para o avanço do conhecimento existente sobre a epidemiologia das leishmanioses e caracterizar seu ciclo de transmissão em duas áreas distintas, uma envolvendo a área urbana do município de Timóteo e outra as áreas silvestres, localizadas no Parque Estadual do Rio Doce, na região leste do estado de Minas Gerais. Nessas áreas já são reconhecidas a presença de casos de LTA, porém seu ciclo de transmissão não é evidente.

Assim, estudos que caracterizem com mais eficiência o ciclo de transmissão dos agentes das leishmanioses são necessários para o adequado conhecimento das características epidemiológicas das leishmanioses, de forma a subsidiar ações de prevenção e controle mais efetivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As leishmanioses

As leishmanioses são consideradas um complexo de doenças devido às diferenças e peculiaridades de suas características clínicas e epidemiológicas. Foram separadas em dois grupos: a Leishmaniose Visceral (LV), conhecida como calazar, e a Leishmaniose Tegumentar (LT), tem esse nome por afetar principalmente as estruturas da pele e das mucosas.

A LV é uma doença crônica, debilitante caracterizada pela infecção do Sistema Fagocítico Mononuclear. Dada sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (Brasil, 2006; Brasil, 2014).

A LV chegou nas Américas através de cães infectados trazidos por colonos de Portugal e da região do Mediterrâneo (Kuhls *et al.*, 2011). Atualmente a doença já foi descrita em pelo menos 12 países da América Latina, sendo que, 90% dos casos ocorreram no Brasil. Há registro em 19 das 27 Unidades da Federação no país, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (Brasil, 2006; Brasil, 2014).

A LT apresenta-se das seguintes formas: cutânea, com lesões discretas de pele que se curam dentro de alguns meses deixando cicatrizes; cutânea difusa disseminada, que produz lesões crônicas de pele de difícil tratamento e mucocutânea, que apresenta lesões que podem destruir total ou parcialmente as mucosas do nariz, boca e garganta, além das cavidades e tecidos circundantes (Brasil, 2007).

A LT é uma doença antiga com relatos e descrição na literatura desde o século I d.C. na Ásia Central ao norte do Afeganistão, onde era conhecida como "Úlcera de Balkh" (Laveran, 1917). Os primeiros registros nas Américas foram em cerâmicas pré-colombianas, entre 400 e 900 anos do século I d.C., feitas por índios

do Peru, no qual apresentava imagens humanas com mutilações de lábios e nariz, caracterizando os sintomas da leishmaniose cutâneo-mucosa (Lainson e Shaw, 1988). Através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas característica primordial da leishmaniose (Santos e Coimbra, 1994).

No Brasil, a primeira confirmação de um caso de leishmaniose com lesões cutâneas e nasofaríngeas se deu na cidade de Bauru, interior do estado de São Paulo em 1909 por Lindenbergh, que encontrou formas de *Leishmania*, idênticas à *Leishmania (Leishmania) tropica* (Wright, 1903), um dos agentes da leishmaniose tegumentar do Velho Mundo, em indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado (Pessoa e Martins, 1982). Gaspar Vianna, em 1911, (citado por Silveira *et al.*, 1997) em suas observações, considerou o parasito diferente da *Leishmania tropica*, e deu o nome de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911), ficando assim denominado o agente etiológico da "úlcer de Bauru", "ferida brava" ou "nariz de tapir".

2.2 Agentes etiológicos das leishmanioses

As leishmanioses são causadas por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados (Brasil, 2014).

Na década de setenta, no Brasil, todos os casos de LT eram atribuídos a *Leishmania braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos outras espécies foram descritas. Nas Américas são conhecidas 13 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana, distribuídas em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Quadro 1) (Lainson e Shaw, 1987; Brasil, 2009; Brasil, 2010; Lainson, 1997; Silveira *et al.*, 1997).

Quadro 1: Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, sua distribuição geográfica, vetores e formas clínicas.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Distribuição geográfica	Vetor	Forma Clínica
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	América do Sul e América Central	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia cruzi</i> , <i>Lutzomyia evansi</i>	Visceral
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	América do Sul e América Central	<i>Nissomyia intermedia</i> , <i>Nissomyia neivai</i> , <i>Nissomyia whitmani</i> , <i>Migonemyia migonei</i> , <i>Psychodopygus wellcomei</i> , <i>Psychodopygus complexus</i>	Cutânea / Mucocutânea
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Norte do Brasil, Guiana Francesa e Suriname	<i>Nissomyia umbratilis</i>	Cutânea / Mucocutânea
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	Norte da América do Sul e América Central	<i>Nissomyia trapidoi</i> , <i>Nissomyia ylephiletor</i> , <i>Lutzomyia gomezi</i> , <i>Psychodopygus panamensis</i>	Cutânea
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	Peru	<i>Lutzomyia peruensis</i> , <i>Lutzomyia verrucarum</i>	Cutânea
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	Norte do Brasil, Bolívia e Peru	<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i> , <i>Lutzomyia nuneztovari</i> , <i>Trichophoromyia velascoi</i>	Cutânea
<i>Leishmania (Viannia) naiff</i>	Norte do Brasil e Guiana Francesa	<i>Psychodopygus Ayrozai</i>	Cutânea
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	Norte do Brasil	<i>Nyssomyia whitmani</i>	Cutânea
<i>Leishmania (Viannia) colombiensis</i>	Colômbia e Panamá	<i>Lutzomyia hartmanni</i> , <i>Lutzomyia gomezi</i> , <i>Psychodopygus panamensis</i>	Cutânea
<i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i>	Norte do Brasil	<i>Nyssomyia antunesi</i>	Cutânea
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	América do Sul e América Central	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i> , <i>Pintomyia nuneztovari</i>	Cutânea / Difusa
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	Sul dos Estados Unidos, México e América Central	<i>Bichromomyia olmeca olmeca</i>	Cutânea / Difusa
<i>Leishmania (Leishmania) venezuelensis</i>	Venezuela	<i>Bichromomyia olmeca bicolor</i>	Cutânea

Fonte: Adaptado de Brazil (2015)

As espécies *Leishmania (Vianna) guyanensis* (Floch, 195), *Leishmania (Vianna) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonenses* (Lainson e Shaw, 1972), são os principais agentes responsáveis pela maioria dos casos de LTA no Brasil, enquanto a *Leishmania (Leishmania) infantum* é reconhecida como responsável pela LV nas Américas.

2.3 Os vetores no ciclo de transmissão da *Leishmania* spp.

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. São pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania* (Ashford, 2000; Brasil, 2014).

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm de comprimento, com o corpo revestido por intensa pilosidade, apresentam uma coloração clara (castanho claro). Além de holometabólicos, suas formas imaturas têm o habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Na fase adulta apresentam corpo delgado, pernas longas e finas, encontram-se adaptados a diversos ambientes. Tanto os machos quanto as fêmeas adultas necessitam de carboidratos como fonte energética, porém as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos (Aguiar e Medeiros, 2003; Brasil, 2014; Rangel e Lainson, 2003).

Os abrigos utilizados pelos flebotomíneos adultos podem variar de acordo com o micro-habitat, estação do ano, umidade relativa do ar e com a espécie. A densidade populacional dos flebotomíneos pode ser afetada por fatores climáticos, alterações do 'micro-habitat', disponibilidade de sangue para o repasto das fêmeas, competição entre espécies e fatores ligados a alterações antrópicas do ambiente (Aguiar *et al.*, 1987; Ferro *et al.*, 1997).

As primeiras espécies de flebotomíneos registradas nas Américas foram descritas entre os anos de 1907 a 1940 e se limitavam a 33 espécies. Com a incriminação de algumas espécies de flebotomíneos como transmissores de leishmanioses o interesse de estudar estes insetos aumentou e o quadro das espécies conhecidas mudou, passando atualmente para aproximadamente 500 espécies e subespécies descritas nas Américas. O Brasil possui uma grande variedade de espécies de flebotomíneos, sendo o país com maior número relato de espécies, entorno de 274 já foram identificadas (Andrade *et al.*, 2013).

As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA, no Brasil, são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei*. No município de Timóteo, já foram relatadas as presenças de *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Bichromomyia flaviscutellata* e *Migonemyia migonei*, sendo essas as principais espécies encontradas no estado de Minas Gerais e envolvidas na transmissão de LTA (Aguiar e Medeiros, 2003; Souza *et al.* 2009; Brasil, 2007).

Em relação a LV no Brasil, duas espécies de flebotomíneos estão relacionadas à transmissão, são elas: *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Migonemyia migonei*. Sendo que *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor da *Leishmania (Leishmania) infantum* no Brasil, possui uma distribuição geográfica ampla, encontrado em quatro das cinco regiões do Brasil: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. Recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetor no estado de Mato Grosso do Sul (Oliveira, 2015; Brazil *et al.*, 2015; Brasil, 2014).

2.4 Os reservatórios na transmissão da *Leishmania* spp.

O Ministério da Saúde considera como reservatório, a espécie ou o conjunto de espécies que garantem a circulação de um determinado parasito na natureza, dentro de um recorte de tempo e espaço. A dispersão da leishmaniose está diretamente ligada aos movimentos de seus reservatórios, e identificá-los é de fundamental importância para o controle efetivo da transmissão (Brasil, 2010; Roque e Jansen, 2014).

Os reservatórios podem ser classificados em dois tipos: reservatórios mantenedores, que se refere aos mamíferos capazes de se infectar e manter infecções estáveis por uma determinada espécie de parasito; e os reservatórios amplificadores, que além de manter, garante a transmissibilidade do parasita (Roque e Jansen, 2014).

As investigações com mamíferos para identificar possíveis reservatórios de *Leishmania* vêm sendo desenvolvidas desde as primeiras décadas do século XX e muitos relatos têm sido documentados, como a presença de *Leishmania* em

roedores silvestres, marsupiais, edentados e canídeos silvestres (Nery Guimarães *et al.*, 1968; Sherlock *et al.*, 1984; Oliveira *et al.*, 2005; Quaresma *et al.*, 2011). No Brasil, muitos autores já descreveram a participação de roedores na epidemiologia das leishmanioses. No estudo realizado por Melo (2008), em Belo Horizonte, foi investigada a taxa de infecção natural em 34 marsupiais do gênero *Didelphis*, e foi detectada uma taxa de 23,5% de animais positivos para *Leishmania (V.) braziliensis*. Esses animais são facilmente encontrados em florestas alteradas pela ação antrópica e são frequentemente vistos nos quintais de residências situadas próximo de matas. Eles são fonte de alimento para diferentes espécies de flebotomíneos, o que os levam a serem elos perfeitos entre os ciclos silvestres e periurbano (Cabrera *et al.*, 2003). No estado de Minas Gerais, Ferreira *et al.*, (2015) relataram a infecção mista de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* presentes em amostras de sangue, pele e tecido de roedores sinantrópicos.

Inúmeros animais domésticos já foram relatados com infecção por *Leishmania*, tais como: suínos (Brazil *et al.*, 1987), felinos (Pennisi *et al.*, 2004; Souza, 2005) e equinos (Aguilar *et al.*, 1986), porém seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi esclarecido.

Em relação a participação dos cães enquanto reservatório doméstico, é importante relatar que seu papel na transmissão do agente da LV já é reconhecido, porém não se pode afirmar que sejam um reservatório também na transmissão do agente da LTA, pois não há evidências científicas que comprovem o seu papel como reservatório, apesar de já terem sido observados cães infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* em áreas endêmicas de LTA (Gontijo *et al.*, 2002; Madeira *et al.*, 2003), seu papel na LTA é considerado como um reservatório acidental da doença (Brasil, 2007).

O Ministério da Saúde não recomenda ações de controle de animais silvestres e sinantrópicos em áreas endêmicas para LTA e nos casos de animais domésticos com LTA só é permitida a eutanásia quando as lesões mucosas e infecções secundárias causem sofrimento ao animal e quando for o caso do, neste caso do cão, estiver soro positivo para LV. Desta forma, conhecer a biologia dos reservatórios é importante para oferecer alternativas mais eficazes para o controle dos vetores (Lainson e Shaw, 1988; Brasil, 2007; Brasil, 2014).

2.5 Ciclo biológico da Leishmania

A transmissão do gênero *Leishmania* para o vertebrado se dá quando a fêmea de flebotômio infectada pica o hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo, inoculando formas promastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro. No ciclo de vida de *Leishmania* intracelular, no tecido do hospedeiro vertebrado, a formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário e se transformam em formas amastigota e, onde o parasito se desenvolve e multiplica por divisão binária e avançam para infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário, e se multiplicar (Figura 1) (Nieves e Pimenta, 2000; Rey, 2001; Pimenta *et al.*, 2003; CDC, 2015).

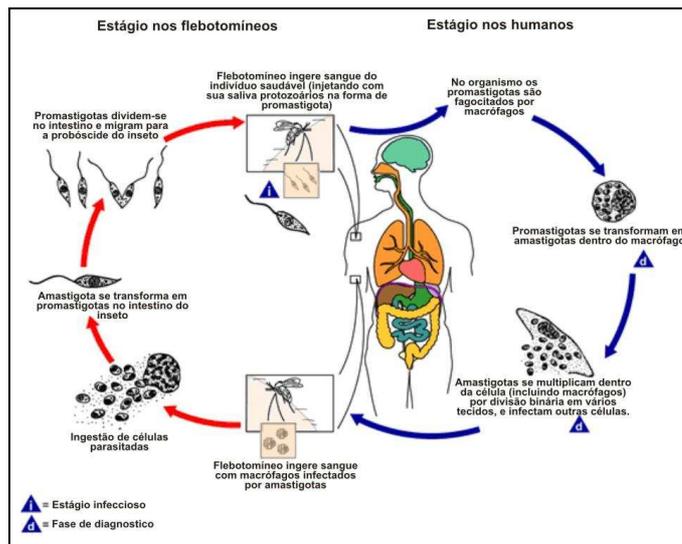


Figura 1: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. - Fonte: adaptado de CDC (2015)

A infecção nos flebotomíneos ocorre no momento do repasto sanguíneo em um vertebrado infectado com as formas amastigotas, essas formas ingeridas pelos flebotomíneos se transformam em promastigotas, com ciclo de vida de extracelular, desenvolvendo no intestino dos flebotomíneos, e migrando para a probóscide para

que o ocorra uma nova infecção no vertebrado, mantendo o ciclo de vida da Leishmania. (Figura 1) (Nieves e Pimenta, 2000; Rey, 2001; Pimenta *et al.*, 2003; Desjeux, 2004; CDC, 2015).

2.6 Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses têm afetado todo mundo, com epidemias em países do continente Africano, como no caso da LV na Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão causando grande morbidade e mortalidade em comunidades afetadas, assim como as epidemias de LT tem afetado diferentes partes do Afeganistão e a República Árabe Síria (WHO, 2015).

As leishmanioses afetam principalmente pessoas de baixa renda na África, Ásia e América Latina, e está associada a desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico fraco e falta de recursos. As leishmanioses são encontradas em quase todos os continentes, exceto Austrália e Antártida. Uma análise recente mostra que mais de 90 países e territórios apresentam casos de leishmaniose. Apesar de não se ter o número de casos anual com precisão, estima-se que aproximadamente de 0,7 milhões a 1,2 milhões de casos novos de LT e de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV são relatados anualmente em todo o mundo (CDC, 2015).

A LT é mais amplamente distribuída, cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões epidemiológicas, nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e Ásia. Os dez países com as contagens de casos mais alto estimados são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, representam de 70 a 75% da incidência global estimada LT. Enquanto que 90% dos casos de LV globais ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. (WHO, 2015; Brasil, 2014; Brasil, 2010)

Segundo informações da Organização Mundial de Saúde, há casos de leishmanioses distribuídos em quase todo continente americano, com destaque o Brasil. O Brasil esta entre os países do mundo com mais de 1.000 casos de LV notificados apenas no ano de 2013 (Figura 3), enquanto pra LT são mais de 5.000 novos casos notificados, também em 2013 (Figura 2) (WHO, 2015).

Na América do Sul, apenas Chile e Uruguai não apresentam registro de casos de leishmanioses (Figuras 2 e 3). A Organização Mundial de Saúde considera a Leishmaniose como uma das seis mais importantes doenças infecciosas. Pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades, é classificada como uma doença negligenciada, devido aos limites dos recursos investidos em diagnóstico, tratamento, controle e sua grande associação à população de baixa renda (WHO, 2015; Brasil, 2007; CDC, 2015).

A epidemiologia das leishmanioses nas Américas é complexa, com variação nos ciclos de transmissão, reservatórios, vetores, manifestações clínicas e resposta à terapia, além das espécies de *Leishmania* que circulam na mesma área geográfica. As leishmanioses eram, predominantemente, uma doença profissional, relacionada com atividades como extração de borracha, operações militares, construção de estradas, mineração e de desenvolvimento agrícola. A exposição ocupacional continua a ser importante, mas o desmatamento generalizado levou a um rápido aumento no número de casos, mudando os aspectos epidemiológicos da doença. No Brasil, por exemplo, de 1980 a 2001, houve um aumento de 10 vezes na incidência de LTA, em todos os estados (Brasil, 2007; WHO, 2010).

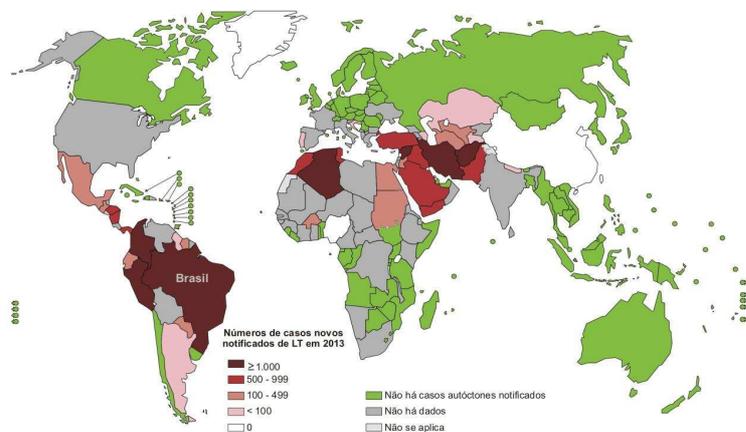


Figura 2: Status de endemicidade de leishmaniose tegumentar no mundo, dados de 2013 - Fonte: adaptado de WHO (2015).

A incidência das leishmanioses aumenta substancialmente, as subnotificações dos casos nos impedem de conhecer a intensidade do problema. Apesar do controle das leishmanioses ser uma das prioridades da OMS, as medidas de controle e combate, até então adotadas, como: eliminação de vetores com inseticidas no domicílio e peridomicílio, colares impregnados para prevenção de infecção canina, além da eutanásia de cães com LV, não causaram o impacto esperado, os casos e sua distribuição geográfica continuam aumentando. A vacina eficaz seria uma alternativa, porém o que se tem até o momento são pesquisas clínicas (Desjeux, 2004; FUNASA, 1999; Brasil, 2007).

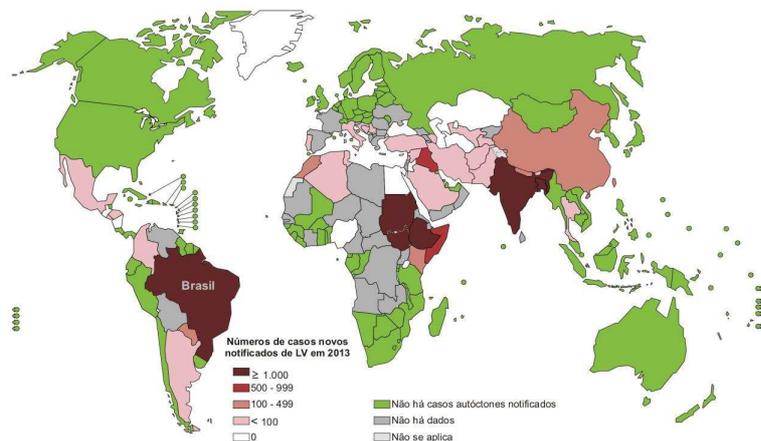


Figura 3: Status de endemicidade de leishmaniose visceral no mundo, dados de 2013 - Fonte: adaptado de WHO (2015).

No Brasil o estado de Minas Gerais tem registrado ocorrências de surtos desde a metade do século passado e a grande maioria dos casos está relacionada com atividades de desmatamento para a construção de estradas, mineração e implantação de projetos agrários (Martins *et al.*, 1956; Furtado *et al.*, 1966). Ao longo dos anos, este quadro veio se modificando, com registro de ocorrência de surtos em áreas já colonizadas (Hermeto *et al.* 1994; Gontijo *et al.*, 2002), além do aparecimento de casos em áreas periurbanas das cidades, como por exemplo no

estudo de Mayrink *et al.*, (1979), realizado na cidade de Caratinga, Vale do Rio Doce.

2.7 Uso de ferramentas moleculares para detecção e identificação de *Leishmania* spp.

Estudos para a identificação de *Leishmania* sempre proporcionaram grandes desafios. As primeiras tentativas de identificação do parasita se fundamentaram em classificar os parasitos do gênero *Leishmania* apenas considerando aspectos clínicos e epidemiológicos da doença, pois a sua identificação por meio da morfologia nunca foi um método simples, devido a grande similaridade entre as espécies e sua quase imperceptíveis diferenças morfológicas (Ross, 1903). Considerando essas limitações na identificação, da década de 80 em diante, técnicas de biologia molecular vêm sendo desenvolvidas para a detecção e identificação precisa desses parasitos, seja em amostras clínicas humanas, isolamento em cultura, em flebotomíneos, e em amostra de tecido ou sangue de mamíferos (Michalsky *et al.*, 2002; Quaresma *et al.*, 2009; Margonari *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Quaresma *et al.*, 2011; Saraiva *et al.*, 2010).

São varias as técnicas que se encontram em franco desenvolvimentos e aprimoramento, destacando-se a amplificação de alvo gênico, mais conhecida como PCR (Reação em cadeia da polimerase), com suas variantes (PCR multiplex, nested-PCR, PCR quantitativo), seguido de sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados por meio das técnicas (Cupolillo, 2005).

A PCR trouxe inovação nas pesquisas tanto de vetores quanto no estudo dos hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* spp. É um método com alta sensibilidade e especificidade, com resultados rápidos e seguros. O método tem como base a síntese de milhares de cópias de DNA *in vitro* catalisada pela Taq DNA polimerase. Para o prosseguimento da técnica é necessário o conhecimento prévio do DNA alvo do organismo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que irão hibridizar-se especificamente à sequência alvo (Yang e Rothman, 2004; Roselino, 2008; Soares *et al.*, 2005).

A PCR também tem sido muito utilizada para diagnóstico etiológico da leishmaniose por se tratar de uma técnica com sensibilidade maior que as convencionais (Garcia *et al.*, 2005). Os autores de um estudo desenvolvido no estado de São Paulo observaram que a técnica de PCR foi superior, quando comparada à detecção histopatológica de *Leishmania* para o diagnóstico da LTA (Medeiros *et al.*, 2002).

Além do bom desempenho no diagnóstico etiológico, a PCR tem sido muito utilizada nos estudos epidemiológicos que buscam identificar animais silvestres ou domésticos como possíveis hospedeiros e/ou reservatórios de diferentes espécies de *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; Quaresma *et al.*, 2009; Quaresma *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2015).

A partir da PCR outra técnica empregada é o sequenciamento de DNA, que permite a análise detalhada de um gene. Nessa técnica o método mais utilizado é o automático, baseado no método de Sanger-Coulson, desenvolvido em 1979, também conhecido como método de terminação de cadeia, que permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA. No sequenciamento automático, os nucleotídeos são marcados com quatro fluorocromos diferentes, um para cada nucleotídeo (A, C, G, T). Esse método necessita de um DNA de fita simples e, normalmente, é clonado em um vetor. A técnica baseia-se na síntese de uma segunda fita de DNA complementar ao DNA molde, na presença de um primer complementar à sequência adjacente ao sítio múltiplo de clonagem do vetor. O fragmento de Klenow da DNA polimerase I inicia o alongamento da cadeia complementar a partir da extremidade 3' do primer; os deoxinucleotídeos - dNTP - (dATP - deoxiadenosina trifosfato -, dTTP - deoxitimidina trifosfato -, dGTP - deoxiguanosina trifosfato -, dCTP - deoxicitosina trifosfato) são selecionados de acordo com o pareamento ao molde e ligados a cadeia por ligações fosfodiéster (Ausubel *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 1999).

Como para cada dNTP utiliza-se um fluorocromo diferente, a eletroforese é realizada em um único canal do gel de sequenciamento. À medida que os fragmentos passam pelo feixe de laser, os fluorocromos são excitados e a luz emitida, em diferentes comprimentos de onda, é detectada por um fotomultiplicador.

Esta informação é traduzida na forma de sequência por meio de um computador e apresentada no eletroferograma. (Ausubel *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 1999).

As análises das sequências revolucionou o estudo de várias áreas de pesquisa, é comum hoje a estimativa de árvores filogenéticas relacionando organismos com base na similaridade dos seus genes e não apenas na morfologia (Ferreira e Neto, 2003).

2.8 O estudo da variabilidade genética

Nas últimas décadas várias metodologias foram desenvolvidas contribuindo para o grande avanço do conhecimento sobre variabilidade genética dos organismos. A utilização de metodologias moleculares permitiu o desenvolvimento de novas abordagens e a determinação de correlações filogenéticas existentes entre as espécies e dentro de cada uma delas. Fatores epidemiológicos como a infecciosidade, virulência, patogenicidade, imunogenicidade e suscetibilidade à ação de quimioterápicos entre populações de parasitos dentro e entre espécies podem ser respondidos com os estudos da variabilidade gênica. No caso dos estudos sobre a evolução e a variabilidade genética em *Leishmania* vêm sendo realizados e diferentes metodologias têm sido empregadas na caracterização do parasita. O estudo desenvolvido por Cupolillo (1994) é um exemplo, onde os resultados obtidos pela análise de isoenzimas apontam o subgênero *Leishmania* (*Viannia*) como um grupo monofilético e o subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) parece ser polifilético. Alguns pesquisadores têm empregado a técnica de RAPD para identificar polimorfismo genético inter e intraespecífico em parasitos do gênero *Leishmania* (Pogue *et al.*, 1995; Noyes *et al.*, 1996).

O genoma de eucariotas contém várias cópias de rDNA, em diversos cromossomos, sendo estes genes constituídos de várias subunidades. As regiões SSU e LSU da *Leishmania* são conservadas, mas as regiões ITS (Internal Transcribed Spacers) ou espaçadores transcritos internos do DNA têm alto nível de variação intra e interespecífica, sendo útil no estudo de genética populacional. A maioria das espécies de *Leishmania* de importância médica foram distinguidas pelo ITS1 com a enzima RsaI, com 85,7% de sensibilidade em biópsias (Rotureau *et al.*,

2006). Outros autores também obtiveram esse diagnóstico utilizando outras enzimas como HAEIII (Schonian *et al.*, 2003; Cuervo *et.al.*, 2004).

No presente estudo, foi utilizado como método para verificar a existência de variabilidade gênica o sequenciamento dos fragmentos amplificados na PCR do gene ITS1. Onde a busca de cluster gênico de DNA pode facilitar a identificação e contribuir para expandir o conhecimento da variabilidade da *Leishmania*, que permitam um melhor entendimento da complexa interação dos parasitos com os hospedeiros vertebrados no contexto urbano de transmissão, e contribuir no esclarecimento da epidemiologia da doença com os dados genéticos obtidos em diferentes níveis de resolução.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Estudar aspectos relacionados ao ciclo de transmissão do agente da LTA na área urbana do município de Timóteo e na área silvestre do Parque Estadual do Rio Doce, localizados na região Leste do estado de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

Identificar as espécies de flebotomíneos nas áreas em estudo.

Caracterizar, através de técnicas moleculares, a presença de infecção natural por *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos capturadas;

Caracterizar, através de técnicas moleculares, a presença de infecção natural por *Leishmania* em animais silvestres (roedores e marsupiais) e sinantrópicos (roedores) capturados no Parque Estadual do Rio Doce e na área urbana do município de Timóteo respectivamente;

Detectar infecção natural por *Leishmania* em cães domésticos do município de Timóteo por meio de sorologia e através de técnicas moleculares;

Estudar a variabilidade genética de fragmentos de DNA de *Leishmania* amplificados de amostras positivas provenientes de flebotomíneos, de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) e cães domésticos;

Identificar a fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneos naturalmente alimentadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de estudo

O estudo foi realizado em duas áreas distintas localizadas na região Leste do estado de Minas Gerais, uma área urbana que compreende o município de Timóteo, e outra, uma área silvestre localizada no Parque Estadual do Rio Doce.

O município de Timóteo-MG, localizado na Mesorregião do Vale do Rio Doce, Região Metropolitana do Vale do Aço, com área territorial de 145.159 km², situa-se a 42°38'16" de Longitude Oeste e 19°30'36" de Latitude Sul, distando 198 km da cidade de Belo Horizonte, capital do estado, e possui uma população de 81.243 habitantes, dos quais 99,85% e 0,15% vivem em áreas urbanas e rurais, respectivamente¹. Timóteo tem como municípios limítrofes, Antônio Dias, Bom Jesus do Galho, Caratinga, Coronel Fabriciano, Ipatinga, Marliéria, e Jaguarapu².

O Parque Estadual do Rio Doce – PERD foi criado pelo Decreto-Lei nº 1.119, de 14 de julho de 1944, sendo a primeira unidade de conservação estadual no estado de Minas Gerais, inserido entre os municípios de Timóteo, Marliéria, Dionísio. Uma das maiores áreas de conservação de mata atlântica do país, em seus 35.976 hectares é a terceira maior área alagada do Brasil, depois da Amazônia e Pantanal. A Unidade recebe diariamente turistas, pesquisadores e instituições de ensino como o intuito de promover a educação ambiental, turismo ecológico e a pesquisa da sua biodiversidade. Atualmente o Parque conta com duas trilhas que são constantemente utilizadas para essas atividades: a Trilha do vinhático e a trilha do Juquita localizada na porção pertencente ao município de Timóteo. Essa trilha foi escolhida para desenvolver o trabalho, devido a sua proximidade com uma área endêmica de leishmaniose, e por ser uma área com visitas diárias³.

¹ http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados_do_censo2010.php

² http://www.mapas.ibge.gov.br_MapadeDivisõesTerritoriais

³ <http://www.ief.mg.gov.br>

4.2 Estudos dos mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos

No estudo dos reservatórios silvestres, sinantrópicos e animais domésticos todos os procedimentos de captura e coleta de amostras de reservatórios estão sendo realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

4.2.1 Seleção de pontos de coleta

Para a seleção dos pontos de coletas foram realizadas metodologias diferenciadas em duas áreas do município de Timóteo, uma na área silvestre pertencente ao PERD (19°42'23"S; 42°34'33"O) e outra área localizada na região urbana de Timóteo (19°34'58"S; 42°38'38"O).

Na área silvestre foram selecionados pontos de coleta ao longo da Trilha do Juquita, que inicia na margem do parque, limite com a área urbana do município, e vai em direção ao interior da mata, um percurso de 3.300m. Essa trilha foi dividida em três segmentos para a instalação das armadilhas de animais silvestres: início (ponto 01), meio (ponto 02) e fim (ponto 03). A distribuição desses pontos se deu da seguinte forma: (i) o ponto 01 foi identificado no início da trilha, entre os metros 0 a 1.100 da trilha, à uma distância de no aproximadamente 300 m da área urbana do município; (ii) o ponto 02 foi identificado na metade da trilha entre os metros 1.101 a 2.100; e (iii) o ponto 03 foi identificado no final da trilha entre os metros 2.101 a 3.300, próximos as margens da lagoa "Juquita", no interior do Parque.

Na área urbana do município foram instaladas armadilhas em residências com registro de flebotomíneos infectados naturalmente por *Leishmania*. Para a elaboração dessa metodologia foi utilizado como referência o trabalho desenvolvido por Souza (2011), o qual relatou a presença de flebotomíneos infectados naturalmente por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, em 19 residências da área urbana do município de Timóteo-MG. Caso não houvesse possibilidade da instalação da armadilhas na residência, seria selecionada para substituir, a residência localizada imediatamente à direita da residência que não pudesse participar, caso a residência da direita não concordasse em participar, seria escolhida a residência à esquerda, e assim sucessivamente. Foram adotados como critérios de exclusão as residências que não tiveram espaço livre em torno da construção, o que inviabilizaria

a instalação das armadilhas, e, também, as residências onde o/a proprietário/a não permitisse a instalação das armadilhas.

4.2.2 Coleta de sangue dos animais domésticos

No estudo dos animais domésticos foram utilizadas amostras de sangue canino coletadas na área urbana de Timóteo.

Os cães utilizados foram aqueles que se encontravam nas residências selecionadas para disposição das armadilhas para roedores e em residências localizadas no entorno, não ultrapassando raio de 500 metros de distância.

Foram coletados 4 ml de sangue periférico, nas veias cefálica ou jugular, para realização de diagnóstico sorológico através de teste imunocromatográfico (TR DPP®) e reação Imunoenzimática ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), fornecido por Biomanguinhos. Os diagnósticos sorológicos foram realizados em todas amostras coletadas, para execução de teste imunocromatográfico (TR DPP®) foram utilizados kits (130TV017Z e 13PTV018Z - fornecido por Biomanguinhos) gentilmente disponibilizados pela Secretaria Municipal de Saúde de Timóteo, já as reações de ELISA foram realizadas por kit (146EL003Z- fornecido por Biomanguinhos) gentilmente cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e produzido por Biomanguinhos, em Minas Gerais. As amostras eram mantidas a temperatura de -20°C. As metodologias aplicadas foram de acordo com as especificadas pelo fabricante.

4.2.3 Captura dos pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos

No estudo dos mamíferos silvestres, na área pertencente ao PERD, foram estabelecidos 03 transectos lineares com 25 estações de captura em cada, considerando os 03 pontos (início, meio e fim) de coleta distribuídos ao longo da trilha do Juquita. Em cada estação de captura foram dispostas armadilhas do tipo live-trap, uma do modelo Tomahawk® (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) e uma do modelo Sherman® (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm), apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3 Kg. Foram dispostas 150 armadilhas na área silvestre.

Já para coletas, realizadas nas residências, de animais sinantrópicos foram distribuídas 38 armadilhas, duas em cada residência, sendo uma do modelo Tomahawk® e uma do modelo Sherman®. As coletas foram realizadas em quatro expedições ao longo de 18 meses, sendo que cada expedição de coleta teve duração de quatro noites, totalizando um esforço de captura de 752 armadilhas-noite por expedição (600 no PERD e 152 nas residências) e 3008 armadilhas-noite no total do estudo (2400 no PERD e 608 nas residências). A isca utilizada foi uma mistura composta de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim. A periodicidade das expedições foi semestral seguindo a estacionalidade (época seca e época chuvosa) na região estudada: agosto/2012, fevereiro/2013, agosto/2013 e fevereiro/2014.

Os transectos, localizados na área silvestre, e as armadilhas instaladas nas residências foram percorridos diariamente pela manhã para verificar a presença de animais capturados. As armadilhas contendo os animais foram armazenadas em sacos plásticos, com todo equipamento de biossegurança (máscara e luva) e transportados, imediatamente após sua remoção, para a base laboratorial de campo, localizada nas dependências do Parque Estadual do Rio Doce, onde os animais foram processados e as amostras coletadas segundo normas estritas de biossegurança, com toda a equipe paramentada com equipamentos de nível 3 (filtros motorizados, máscaras com pressão positiva, e demais acessórios) garantindo a segurança dos membros da equipe de campo contra zoonoses de transmissão por aerossóis.

Na base laboratorial de campo, os animais foram anestesiados, conforme orientação veterinária, e tiveram seus dados coletados (sexo, peso corpóreo e medidas de corpo e cauda), A idade dos animais foi estimada nos marsupiais pelo estágio de desenvolvimento da dentição (condição do terceiro pré-molar e número de molares eclodidos), e nos roedores pelo peso corpóreo relativo.

Todos os espécimes capturados tiveram coletados sangue, amostras de baço, fígado, medula e de tecido (pedaços de orelha e cauda) para estudo de infecção natural de *Leishmania* por meio de isolamento do parasita e análises moleculares.

Para o isolamento de *Leishmania* as amostras foram mantidas em ambiente estéril. As amostras coletadas foram preservadas em solução salina a 1% com antibiótico, por um período de 24 horas. Após esse período os fragmentos foram colocados em tubos de cultura estéril de 15ml contendo meio sólido NNN (Nicolle, Novy and Mc Neal) com meio líquido Schneider. As culturas foram observadas semanalmente, por um período de 2 meses.

A identificação taxonômica se baseou inicialmente na morfologia externa. Assim, todos os espécimes foram identificados por gênero, sendo possível apenas para algumas espécies a identificação específica. A identificação específica da maioria das espécies foi realizada através de análise cariotípica através de cultura de medula óssea e quando necessário complementadas através de análise da morfometria craniana.

Amostras de fígado foram também fixadas e preservadas em etanol para posteriores estudos moleculares filogenéticos dos animais. A técnica de cariotipagem visa determinar o número cromossômico diplóide e fundamental, com objetivo de descrever e associar cada complemento cromossômico à espécie confirmando a identificação morfológica. A metodologia é aplicada segundo (Bonvicino, 2011) e consiste em cultura de medula óssea por 2 horas a 37°C, hipotonização em KCl 0,075M por 30 minutos à temperatura ambiente e fixação em 10 ml de Carnoy (3 Metanol:1 Ácido Acético). Em laboratório são preparadas lâminas coradas com Giemsa (4%) em tampão fosfato para obtenção das fotografias das metáfases. Os cariótipos são montados seguindo uma ordem decrescente de tamanho dos autossomos, sendo que os cromossomos sexuais são colocados a parte.

Todas as identificações taxonômicas foram realizadas no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, sob a supervisão do Dr. Bernardo Rodrigues Teixeira, do Dr. Paulo Sérgio D'Andrea e da Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino.

Todos os animais coletados foram taxidermizados e seus esqueletos preparados, para serem depositados como material testemunho na coleção científica da Coleção de Mastozoologia do Museu de Ciências Naturais PUC Minas (Belo Horizonte, Brasil) (Anexo 01).

O sucesso de captura foi verificado utilizando seguinte cálculo: quantidade de animais coletados dividido por esforço de captura multiplicado por 100.

4.3 Estudo dos flebotomíneos

4.3.1 Captura dos flebotomíneos

Na captura dos flebotomíneos foram utilizadas armadilha luminosa do modelo HP, tipo CDC, distribuídas adotando metodologia diferentes para cada área estudada.

As coletas foram realizadas de setembro de 2012 a fevereiro de 2014. As armadilhas foram expostas por 48 horas consecutivas, com coletas mensais, tanto no ambiente peridomiciliar, no município de Timóteo, quanto nas áreas silvestres localizadas no Parque Estadual do Rio Doce.

4.3.1.1 Armadilhas instaladas na trilha do Juquita localizada no PERD

Foram instaladas armadilhas luminosas ao longo da trilha, com distância de 300 metros entre elas, com início na margem do parque, limite com a área urbana do município de Timóteo, e vai em direção ao interior da mata, um percurso de 3.300 metros. Os pontos foram distribuídos da seguinte forma: Ponto 1 - 0 metro(m) (início da trilha); Ponto 2 - 300m; Ponto 3 - 600m; Ponto 4 - 900m; Ponto 5 - 1.200m; Ponto 6 - 1.500m; Ponto 7 - 1.800m; Ponto 8 - 2.100m; Ponto 9 - 2.400m; Ponto 10 - 2.700m; Ponto 11 - 3.000m; Ponto 12 - 3.300m (Figura 4). Com essas distribuições, foram instaladas 04 armadilha luminosa em cada ponto anteriormente definido (início, meio e fim da trilha), totalizando 12 armadilhas localizadas na área silvestre.

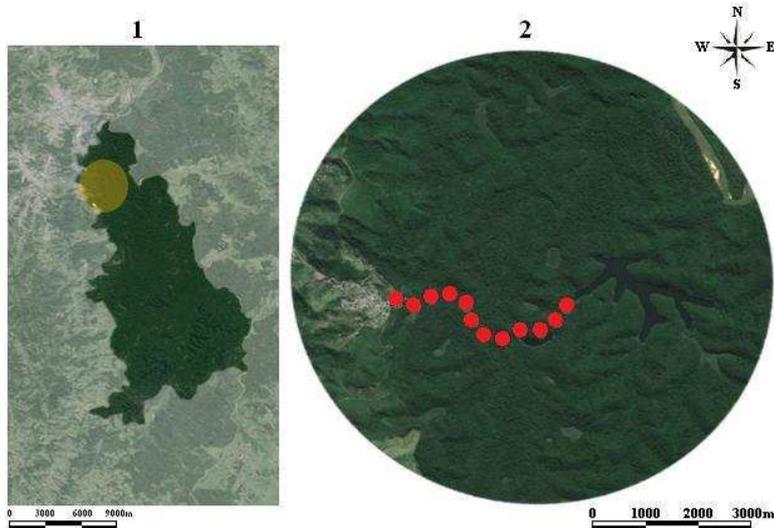


Figura 4: (1) Ilustração do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil; (2) (●) Pontos indicando a distribuição de armadilhas luminosa na Trilha do Juquita no PERD, Minas Gerais.

Fonte: <https://maps.google.com.br/>

4.3.1.2 Armadilhas instaladas na área urbana do município

Foram instaladas 19 armadilhas luminosas para coleta de flebotomíneos em 19 residências da área urbana do município (Figura 5).

As armadilhas foram georeferenciadas utilizando receptor GPS (*Ground Position System*) de navegação, para construção de um mapa de densidade de flebotomíneos na região de estudo.

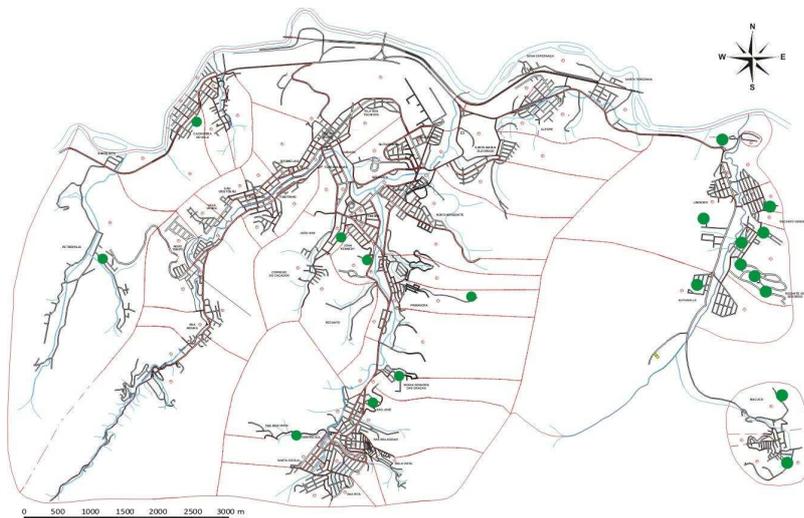


Figura 5: Mapa ilustrando a distribuição de armadilhas na área urbana do município de Timóteo-MG, Brasil (●) Pontos indicando a localização a distribuição de armadilhas luminosa na Trilha do Juquita no PERD, Minas Gerais.

4.3.2 Identificação dos flebotomíneos

Os insetos capturados foram mortos em câmara refrigerada para a realização da triagem do material. Todos os machos capturados e parte das fêmeas foram montados em lâminas e lamínulas e identificados quanto a espécie de acordo com Galati (2003), as fêmeas montadas eram parte das fêmeas que foram coletadas no PERD, uma área que até então não se tinha conhecimento da fauna, esse método foi utilizado com o intuito de ter o registro desses espécimes preservados. As outras fêmeas de flebotomíneos coletadas foram dissecadas e identificadas, com agulhas e lamina e lamínulas descartáveis, observando a cabeça e o último segmento, para visualização do sibirium e espermateca, segundo técnica empregada por Lainson (1997) com modificações. Após a identificação todas as partes do corpo das fêmeas (cabeça, último segmento, abdômen e tórax com asas e pernas) foram preservadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml em solução de DMSO a 6 % para posterior estudo molecular. A abreviação do nome das espécies segue a proposta de Marcondes (2007). Nas fêmeas que apresentavam ausência de repasto sanguíneo no intestino foi verificada infecção por *Leishmania* spp., já as fêmeas alimentadas

foram realizados estudos para a identificação de fonte alimentar ambas atividades envolvendo métodos de biologia molecular.

4.4 Ensaios moleculares para detecção de *Leishmania* spp.

Foram utilizadas para detecção de *Leishmania* spp., as fêmeas de flebotomíneos capturadas que não apresentaram sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen, amostras biológicas coletadas de animais silvestres e sinantrópicos e cães domésticos.

4.4.1 Extração de DNA das amostras coletadas

As fêmeas de flebotomíneos identificadas e armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml com DMSO 6% foram utilizadas para extração de DNA.

Em relação ao sangue canino, as amostras de tecido de pele (cauda e orelha), baço, fígado, sangue e medula óssea de roedores e marsupiais foram pesados a quantidade de 10 mg e armazenados individualmente em microtubos de polipropileno de 1,5 ml e estocado à temperatura de -20°C para a extração de DNA, como controle negativo foi utilizada amostra de água livre de DNA.

Durante a extração do DNA foi utilizado o kit comercial de extração Genra Puregene® Cell and Tissue (QIAGEN), as concentrações dos reagentes não foram especificadas pelo fabricante.

A extração das amostras seguiu utilizando a mesma sequência da metodologia para todas amostras, porém os utilizados nos reagentes: lise celular, proteinase K e RNase foram diferentes, foi utilizado um volume para amostras de fêmeas de flebotomíneos e outro volume as demais amostras (roedores, marsupiais e cães). Os volumes empregados na extração das amostras de roedores, marsupiais e cães estão especificados a seguir dentro dos parênteses. Os microtubos de polipropileno contendo as amostras foram retiradas do freezer -20°C e, após o descongelamento, as amostras foram maceradas, com ajuda de um pistilo estéril e descartável, foi adicionado em 100µl (300µl para amostras de roedores, marsupiais e cães) de solução de lise celular, contendo 1µl (1,5µl para amostras de roedores,

marsupiais e cães) de proteinase K nos microtubos. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C *overnight*. Após esse período, foi adicionado 1µl (1,5µl para amostras de roedores, marsupiais e cães) de RNase, os microtubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora, incubado por 1 min no gelo e foi adicionado 100µl de solução de precipitação de proteína. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 14.000rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e identificado, contendo 300µl de isopropanol (100%). Os microtubos foram homogeneizados e, novamente, centrifugados por 5 minutos a 14.000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300µl de etanol (70%) e 30µl de acetado de sódio (10%) em cada amostra. Os tubos foram incubados em freezer -80°C por 1 hora e, posteriormente foram centrifugados por 5 minutos a 14.000rpm. Ao término da centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e os microtubos foram invertidos em papel absorvente para a evaporação do etanol.

O DNA extraído foi ressuspensão em 20µl de solução de reidratação e os microtubos foram incubados a 65°C por 1 hora para a reidratação do DNA. Em seguida, o DNA foi incubado em temperatura ambiente *overnight*, e posteriormente, foram estocados em freezer -20°C até a utilização. As amostras de DNA total extraído das fêmeas de flebotomíneos chegaram a uma concentração final média de 6 ng/µl, já a concentração das amostras coletadas de mamíferos foram padronizadas em 100 ng/µl.

4.4.2 PCR para verificar a infecção natural por *Leishmania* spp. nas amostras coletadas.

O DNA extraído foi submetido à técnica de PCR para amplificação de uma região alvo do DNA de *Leishmania* spp., para essas análises utilizamos dois indicadores: o ITS1 (internal transcribed spacer 1) (LITSR 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb) (Schonian *et al.*, 2003), que é uma região intergênica entre os genes SSU e 5.8S (Figura 6), podendo distinguir as seguintes espécies de *Leishmania*: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*,

Leishmania mexicana, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamanensis* (Cupolillo et al., 2009).

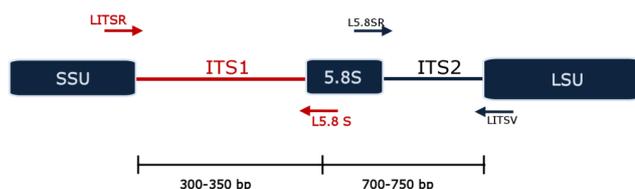


Figura 6: Região intergênica do ITS1.

Na PCR foi realizada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 350pb por meio da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen) e 5 µl de DNA molde, em um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada alternando-se 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, anelamento a 53°C por 1min e extensão a 72°C por 1min em equipamento termociclador automático de DNA (MaxyGene Gradient - AXYGENE®). Os perfis banda amplificada foram analisados em gel de agarose 2% corado com GelRed™, concentração utilizada: GelRed 10.000X em 500µl de água livre de contaminações (1:500), foi aplicado 1µl de GelRed™ diluído, 01µl de tampão de carregamento e 5µl de produto amplificado na PCR, e comparados com produto de PCR de cepas referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Para a obtenção do DNA das cepas de referências foram adotado os seguintes procedimentos: as alíquotas de culturas de cepas referência de *Leishmania* foram adicionados a tubos contendo meio de cultura NNN (Novy e Mc Neal, 1903; Nicolle, 1908) enriquecidos com Schneider, mantidos à 25° C ± 1°C por aproximadamente 30 dias. Quando o número de células promastigotas alcançou 1x10⁸, foi realizada a lavagem da massa de parasitos e posterior extração do DNA. A massa de promastigotas foi obtida centrifugando um volume de 30mL de cultura a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, despejou-se o sobrenadante e recolheu-se o pellet, o qual foi lavado três vezes com PBS 1x pH 7,2 estéril. O pellet contendo as promastigotas foi submetido à extração utilizando também o kit comercial de

extração Gentra Puregene® (QIAGEN), como procedeu para as amostras coletadas. A concentração de DNA de *Leishmania* empregada como controle positivo nos experimentos de PCR foi de 100ng/μl.

Foi realizado o cálculo da taxa de infecção natural, definida pela presença de fragmentos amplificados de *Leishmania* spp. nas amostras, calculada como número de testes positivos dividido pelo número total de amostras e multiplicado por 100.

4.4.3 Clonagem, sequenciamento e estudo de variabilidade genética das amostras positivas na PCR para identificação de infecção natural por *Leishmania* spp.

As amostras de tecido e sangue de roedores, marsupiais, cães e as amostras de fêmeas de flebotomíneo que apresentaram a banda de aproximadamente 350pb, na PCR do gene ITS1, foram clonadas por meio de transformação bacteriana, utilizando como células competentes bactéria a espécie *Escherichia coli* (DH5-α) e Kit comercial de clonagem.

A clonagem molecular consiste na difusão de moléculas de DNA idênticas e baseia-se na propagação natural de células ou indivíduos geneticamente idênticos ao inicial. O experimento de clonagem gênica consiste em introduzir o gene dentro de células bacterianas e isolá-las em colônias. As células de cada colônia são idênticas entre si (Nascimento *et al.*, 1999). A clonagem foi utilizada para aumentar a material gênico das amostras positiva e selecionar apenas o fragmento amplificado para sequenciamento.

Os procedimentos realizados na clonagem foram:

- Preparação da célula competente pelo método químico (CaCl₂), no qual as colônias de DH5-α foram incubadas a 37°C overnight sob agitação em 04 ml de meio Luria-Bertani (LB), no dia seguinte foi incubado 02 ml cultura crescida em 100 mL de meio LB e incubado a 37° sob agitação até DO₆₀₀=0,5. Após ter atingido a DO₆₀₀ o meio com DH5-α foi centrifugado 4000 RPM/10/4°C, para formação de pellet, mantendo em gelo. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 40 ml de CaCl₂ 0,1M estéril e refrigerado, as amostras foram mantidas por uma hora em gelo. Em seguida foi realizado uma nova centrifugação a 4000 RPM/10/4°C,

mantendo sempre em gelo. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 01 mL de CaCl₂ 0,1M estéril e congelado, foram feitas alíquotas de 100ml utilizando microtubos de polipropileno de 1,5ml estéril.

Após as células competentes terem sido preparadas foi realizado a reação de ligação, onde foi utilizado o kit comercial CloneJET™ PCR Cloning Kit. O preparo da reação foi realizado para cada amostras e se seguiu o protocolo do fabricante, foi utilizado um microtubo de polipropileno de 0,2ml para realizar a reação. Na reação, foram adicionados 10µl de tampão 2x, 4µl de produto da PCR (~150ng), 3µl de água livre de DNA, 1µl de DNA Blunting Enzyme. Os reagentes foram incubados a 70°C/5min, em seguida resfriado no gelo e adicionado à reação 1µl de pJET 1.2 Blunt Cloning Vector (50ng/ µL) e 1µl de T4 DNA ligase. A reação de ligação foi incubada a temperatura ambiente por 30min para que fosse realizada a próxima etapa da clonagem.

Por fim, a última etapa da clonagem foi a transformação da célula competentes DH5-α, nessa etapa foi preparada para cada amostras uma solução onde utilizou-se as células competentes já preparadas na primeira etapa, a essas células foram adicionados 10µl da reação de ligação e homogeneizadas, as amostras foram mantidas em gelo por 45min, em seguida foi aplicado choque-térmico a 42°C/2min, retornando para o gelo por 2min, em seguida foi adicionado às amostras 1 mL de meio LB, incubou-se à 37°C sob agitação (150 RPM) por 60min, aplicou-se um "spin", utilizando a centrífuga, descartou o sobrenadante e ressuspendeu o pellet em 200 µl de LB para concentrar a amostra, em seguida as amostras foram plaqueadas em meio seletivo sólido contendo meio LB Agar com ampicilina, as placas foram incubadas à 37° C overnight. A partir daí só cresceram colônias transformadas.

Ao fim da clonagem foi selecionado aleatoriamente colônias nas placas com a bactéria transformada e realizando a PCR das colônias, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, porém a reação teve um volume final de 50µl onde foram substituídos 4µl de DNA molde por água livre de DNA e 1µl de colônia crescidas de bactérias transformadas, o ciclo utilizado no termociclador seguiu a mesma metodologia anteriormente descrita assim como o procedimento para revelar os perfis de banda amplificada.

Do material amplificado na PCR das amostras clonadas, contendo perfil de banda de aproximadamente 350pb, foi utilizado 5µl para verificar os perfis de banda amplificada e o restante, 45µl (~150ng/µl), foram encaminhados para sequenciamento, cada amostra teve seu DNA sequenciado nas duas direções. As amostras foram armazenadas em placas de 96 poços embaladas e enviadas para a empresa MacroGen® (Seul, Coreia), onde foi utilizado o sequenciador automático (Applied Biosystems 3730XL).

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando o programa Sequencher®4.1.4. Após o alinhamento das sequências foi iniciada a avaliação de variabilidade genética das sequências obtidas do material amplificado das amostras positivas para infecção natural por *Leishmania*, observado na PCR, para isso foi elaborado um banco de dados com dois tipos de sequências: (i) as sequências obtidas na PCR da gene ITS1 a partir das amostras coletadas; (ii) e sequências da região do ITS1 de espécies de *Leishmania* descritas no novo mundo, depositadas no GenBank⁴.

Para selecionar as sequências depositadas no GenBank foi realizada uma pesquisa de Nucleotídeos, utilizando a seguinte descrição "*Leishmania* and internal transcribed spacer 1", a partir do resultado dessa pesquisa foi realizado um filtro onde foram selecionadas apenas as sequências de espécies de *Leishmania* já registrada nas Américas, em seguida foram selecionadas apenas sequências depositadas que continha separadamente o produto amplificado da região "internal transcribed spacer 1". A partir daí o produto e informações como: data de depósito, país de origem, hospedeiro e número de depósito no GenBank foram coletados, caso as informações estivesse disponíveis.

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando a plataforma online de alinhamento múltiplo global (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>), comparando diferentes ferramentas (CLUSTAL W, MAFFT e MUSCLE), a fim de obter o resultado mais aproximado do alinhamento ótimo das sequências do banco de dados. Todas as ferramentas utilizadas apresentaram o mesmo resultado e, por convenção, foi

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>

escolhido o algoritmo MUSCLE para o alinhamento das sequências. Após alinhamento, todas as lacunas foram removidas para cada par de sequências e um total de 416 sítios foram obtidos para cada sequência no banco de dados final.

A construção da árvore filogenética foi conduzida no aplicativo MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). As sequências foram agrupadas pelo método de distância por agrupamento, utilizando o algoritmo Neighbor-joining (Saitou *et al.*, 1987) e o modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura- 2- parâmetros (Kimura, 1980). A consistência estatística foi calculada por 10.000 repetições pelo método de bootstrap (Felsenstein, 1985).

Após a análise da árvore filogenética foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI utilizando como algoritmo Blast, para verificar a identidade entre espécie depositada no Genbank e as sequências amplificadas de infecção, na busca de se identificar a espécie de *Leishmania* presente nas amostras.

4.5 Extração, PCR e sequenciamento das fêmeas alimentadas

As fêmeas de flebotomíneos com sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen (fêmeas alimentadas) foram analisadas através das técnicas de PCR e sequenciamento, de forma a identificar a qual espécie animal pertence o DNA do sangue encontrado no abdome da fêmea de flebotomíneo alimentada. A técnica da PCR foi utilizada para amplificação do gene citocromo B, o indicador utilizado será Cyt B (FOR5' – CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA - 3' e REV5' – GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA - 3' amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb) (Steuber *et al.*, 2005).

Antes da PCR foi realizado a extração de DNA das amostras de fêmeas alimentadas, toda extração ocorreu dentro de capela de fluxo, tomando todas as medidas e cuidado para que não houvesse contaminação com DNA humano, durante a extração foram utilizadas três amostras como controle negativo uma contendo água livre de DNA e duas contendo uma fêmeas de flebotomíneos sem presença de sangue no intestino. A metodologia empregada na extração foi a mesma utilizada para extração na verificação de infecção por *Leishmania* spp., metodologia já descrita anteriormente.

O DNA extraído foi submetido a PCR do gene CytB para amplificação de um fragmento de aproximadamente 400pb solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen) e 5 µl de DNA molde, em um volume final de 50µL. A amplificação foi realizada alternando-se 32 ciclos de desnaturação a 95°C por 20seg, anelamento a 53°C por 30seg e extensão a 72°C por 1min em equipamento termociclador automático de DNA (MaxyGene Gradient - AXYGENE®). O perfil da banda amplificada foi analisada em gel de agarose 2% corado com GelRed™, concentração utilizada: GelRed 10.000X em 500µl de água livre de contaminações (1:500), foi aplicado 1µl de GelRed™ diluído, 01µl de tampão de carregamento e 5µl de produto amplificado na PCR, e comparados com amostras amplificadas de extração de DNA de sangue de cão e roedor como controle positivo.

As amostras que apresentaram perfil de banda de aproximadamente 400pb foram enviadas para sequenciamento para na empresa Macrogen® (Seul, Coréia), onde foi utilizado o sequenciador automático (Applied Biosystems 3730XL), cada amostra teve seu DNA sequenciado nas duas direções. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando o programa Sequencher®4.1.4. Após as sequências alinhadas foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando como algoritmo Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*), que consiste em uma ferramenta de busca de similaridade em sequências biológicas (DNA ou aminoácidos), para verificar a identidade entre espécie depositada no Genbank⁵ (National Center for Biotechnology Information) e as sequências amplificadas das amostras de fêmeas alimentadas.

4.6 Análises dos dados

Os dados referentes aos flebotomíneos foram trabalhados a partir do cálculo de proporções de vetores segundo o local e período de captura, a espécie, o sexo e

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>

existência ou não de infecção por *Leishmania*. Foi analisada a densidade de flebotomíneos coletados utilizando o mapa de densidade de Kernel, o qual é uma técnica estatística de interpolação, não paramétrica, exploratória que mostra o padrão de distribuição de pontos gerando uma superfície de densidade com identificação visual de áreas com maior intensidade da ocorrência de um evento. Trata-se de uma alternativa simples para analisar o comportamento de padrões de distribuição de pontos (eventos) e estimar a intensidade pontual do processo em toda a região de estudo, identificando áreas de risco para ocorrência do evento, nominadas “áreas quentes” ou “hotspots”. (Brasil, 2013).

Foi analisado o comportamento sazonal a partir da distribuição proporcional dos flebotomíneos segundo meses de captura e variáveis climáticas: temperatura (°C), pluviosidade (%) e umidade (mm). Essa temática tem sido explorada em diferentes estudos, sendo que as variáveis climáticas frequentemente correlacionadas à ocorrência de flebotomíneos são temperatura (Andrade-Filho *et al.*, 1998; Mayo *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1980; Salomón *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007), pluviosidade (Salomón *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2007) e umidade relativa do ar (Andrade-Filho *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1980; Saraiva *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007). Essas variáveis são utilizadas na busca de se entender e explicar o comportamento das populações de flebotomíneos e, conseqüentemente, a variação na ocorrência de casos humanos. Os resultados desses estudos são importantes para orientar o planejamento e a seleção de períodos mais adequados para coleta de flebotomíneos.

Foram realizadas análises descritivas (média, mediana e desvio padrão) das variáveis climáticas e após teste de normalidade foi calculado Coeficiente de Correlação de Spearman entre as proporções de flebotomíneos capturados e variáveis climáticas. Os dados referentes às variáveis climáticas foram obtidos na página eletrônica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)⁶ e corresponderam ao período da coleta dos flebotomíneos (agosto de 2012 a fevereiro de 2014), o mês de janeiro de 2013 não foi incluído no estudo pois a estação meteorológica, não

⁶ [http:// http://www.inmet.gov.br/portal/](http://www.inmet.gov.br/portal/)

funcionou durante o mês. Para as variáveis temperatura e umidade, os valores foram trabalhados em termos de média e mediana; para a variável pluviosidade foram trabalhados apenas os valores médios, uma vez que os dados de pluviosidade resultaram sistematicamente em valores nulos.

Em relação às coletas de flebotomíneos realizadas no Parque Estadual do Rio Doce, foram selecionadas três espécies vetoras consagradas de *Leishmania* spp. (*Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*), para verificar a distribuição das mesmas ao longo da trilha. As análises foram realizadas, após teste de normalidade, calculando também o coeficiente de correlação de Spearman entre as proporções de flebotomíneos segundo a localização das armadilhas instaladas ao longo da trilha.

As análises envolvendo os cálculos de proporções foram realizados utilizando o programa Microsoft® Office Excel 2012, após o teste de anormalidade, as comparações entre proporções realizadas foram obtidas utilizando o teste Z e as análises de correlação foram realizadas utilizando a correlação de Spearman os dados foram tabuladas no Microsoft® Office Excel 2012 e analisados no STATA®12 e no XLSTAT®15. As interpretações foram feitas adotando-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4.7 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Fiocruz sob o nº LW-65/12 (Anexo 2), para avaliação dos procedimentos envolvendo a coleta de material biológico em animais. Para as capturas dos flebotomíneos no PERD foi utilizada a licença permanente para coleta de material zoológicos (N. 16.237-2), concedida pelo Ministério do Meio Ambiente (Anexo 3). Para a coleta de pequenos mamíferos foi concedida pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) a autorização de número 33445-1 (Anexo 4). Além das licenças do ICMBio foi solicitado e concedido pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais – IEF/MG, a licença para realização de pesquisa em unidade de conservação, sob o número 058/12 (Anexo 5).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo dos flebotomíneos coletados

Entre os meses de setembro de 2012 e fevereiro de 2014 foram coletados um total de 5.935 flebotomíneos, distribuídos entre 32 espécies: *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932), *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima, 1932); *Evandromyia tupynambai* (Mangabeira, 1942), *Evandromyia cortelezii* (Brethes, 1923), *Evandromyia costalimai* (Mangabeira, 1942), *Evandromyia edwardsi* (Mangabeira, 1941), *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Evandromyia sallesi* (Galvão e Coutinho, 1939); *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão e Silva, 1964), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), *Micropygomyia ferreirana* (Barreto, Martins e Pellegrino, 1956), *Micropygomyia capixaba* (Dias, Falcão, Silva e Martins, 1987), *Micropygomyia oswaldoi* (Mangabeira, 1942); *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia whitmani* (Antunes e Coutinho, 1939), *Nyssomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912), *Pintomyia bianchigalatae* (Andrade-Filho, Aguiar, Dias e Falcão, 1999), *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Pintomyia misionensis* (Castro, 1959), *Pintomyia pessoai* (Coutinho e Barreto, 1940), *Pressatia choti* (Floch e Abonnenc, 1941), *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929), *Psathyromyia aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Psathyromyia lanei* (Barreto e Coutinho, 1941), *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932), *Psathyromyia pascalei* (Coutinho e Barreto, 1940), *Psychodopygus carreirai* (Barreto, 1946), *Psychodopygus davisi* (Root, 1934), *Psychodopygus geniculatus* (Mangabeira, 1941), *Sciopemyia sordellii* (Shannon e Del Ponte, 1927), *Trichopygomyia longispina* (Mangabeira, 1942) (Tabela 1).

O estudo foi realizado em duas áreas distintas, sendo assim pode-se observar tanto o número de espécimes quanto o de espécies diferente em cada área. A seguir são descritos com mais detalhes os resultados obtidos tanto na área do PERD quanto na urbana do município.

Tabela 1: Flebotomíneos capturados no PERD e área urbana de Timóteo-MG, segundo sexo e local de captura, 2012-2014

ESPÉCIE	Flebotomíneos coletados no PERD						Flebotomíneos coletados na área urbana de Timóteo						T. Geral	(%)
	Macho	%	Fêmea	%	Total	%	Macho	%	Fêmea	%	Total	%		
<i>Lutzomyia</i> sp.	0	0,00	6	0,49	6	0,30	0	0,00	1	0,04	1	0,03	7	0,12
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0,00	42	3,45	42	2,11	0	0,00	73	2,71	73	1,85	115	1,94
<i>Brumptomyia avellari</i>	54	6,96	0	0,00	54	2,71	98	7,84	0	0,00	98	2,49	152	2,56
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	40	5,15	0	0,00	40	2,01	4	0,32	0	0,00	4	0,10	44	0,74
<i>Evandromyia tupynambai</i>	1	0,13	46	3,78	47	2,36	0	0,00	0	0,00	0	0,00	47	0,79
<i>Evandromyia cortelezii</i>	0	0,00	1	0,08	1	0,05	1	0,08	0	0,00	1	0,03	2	0,03
<i>Evandromyia costalimai</i>	1	0,13	0	0,00	1	0,05	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,02
<i>Evandromyia edwardsi</i>	0	0,00	4	0,33	4	0,20	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,07
<i>Evandromyia lenti</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	0,48	7	0,26	13	0,33	13	0,22
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0,00	3	0,25	3	0,15	0	0,00	32	1,19	32	0,81	35	0,59
<i>Evandromyia termitophila</i>	1	0,13	4	0,33	5	0,25	0	0,00	4	0,15	4	0,10	9	0,15
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,32	3	0,11	7	0,18	7	0,12
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	20	2,58	1	0,08	21	1,05	0	0,00	0	0,00	0	0,00	21	0,35
<i>Micropygomyia capixaba</i>	0	0,00	45	3,70	45	2,26	0	0,00	4	0,15	4	0,10	49	0,83
<i>Micropygomyia osvaldoi</i>	0	0,00	3	0,25	3	0,15	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,05
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	1	0,13	16	1,31	17	0,85	11	0,88	113	4,20	124	3,15	141	2,38
<i>Migonemyia migonei</i>	16	2,06	48	3,94	64	3,21	25	2,00	91	3,38	116	2,94	180	3,03
<i>Nyssomyia whitmani</i>	16	2,06	75	6,16	91	4,57	837	66,96	1.784	66,27	2.621	66,49	2.712	45,70
<i>Nyssomyia intermedia</i>	141	18,17	85	6,98	226	11,34	214	17,12	504	18,72	718	18,21	944	15,91
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	0	0,00	1	0,08	1	0,05	0	0,00	1	0,04	1	0,03	2	0,03
<i>Pintomyia fischeri</i>	3	0,39	41	3,37	44	2,21	21	1,68	23	0,85	44	1,12	88	1,48
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	0,00	5	0,41	5	0,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,08
<i>Pintomyia pessoai</i>	0	0,00	3	0,25	3	0,15	15	1,20	4	0,15	19	0,48	22	0,37
<i>Pressatia choti</i>	198	25,52	183	15,04	381	19,12	9	0,72	31	1,15	40	1,01	421	7,09
<i>Psathyromyia shannoni</i>	0	0,00	2	0,16	2	0,10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,03
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0,00	2	0,16	2	0,10	0	0,00	2	0,07	2	0,05	4	0,07
<i>Psathyromyia lanei</i>	0	0,00	7	0,58	7	0,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00	7	0,12
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	0,00	7	0,58	7	0,35	0	0,00	1	0,04	1	0,03	8	0,13
<i>Psathyromyia pascalei</i>	97	12,50	59	4,85	156	7,83	2	0,16	1	0,04	3	0,08	159	2,68
<i>Psychodopygus carreirai</i>	28	3,61	143	11,75	171	8,58	1	0,08	6	0,22	7	0,18	178	3,00
<i>Psychodopygus davisi</i>	18	2,32	294	24,16	312	15,65	1	0,08	6	0,22	7	0,18	319	5,37
<i>Psychodopygus geniculatus</i>	0	0,00	4	0,33	4	0,20	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,07
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	0,26	20	1,64	22	1,10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	22	0,37
<i>Trichopygomyia longispina</i>	139	17,91	67	5,51	206	10,34	1	0,08	1	0,04	2	0,05	208	3,50
TOTAL (%)	776	100,00	1.217	100,00	1.993	100,00	1.250	100,00	2.692	100,00	3.942	100,00	5.935	100,00

5.1.1 Flebotomíneos do Parque Estadual do Rio Doce

Uma das áreas utilizadas no estudo foi o Parque Estadual do Rio Doce, o local é uma área silvestre, onde foram capturados 1.993 espécimes de flebotomíneos, pertencentes a 30 espécies (Tabela 1). As espécies mais abundantes foram *Pressatia choti* (19,12%), *Psychodopygus davisii* (15,65%) e *Nyssomyia intermedia* (11,34%). *Pressatia choti*, apesar do grande número encontrado, não se trata de uma espécie envolvida na transmissão de *Leishmania* spp. O mesmo não pode se dizer da espécie *Psychodopygus davisii* a qual já foi relatada sua participação na epidemiologia da transmissão da *Leishmania (Viannia) naiffii*, na região da Amazônia (Rangel e Lainson, 2003) e posteriormente no estado de Roraima (Gil *et al.*, 2003). Esses relatos chamam a atenção para a possibilidade de *Psychodopygus davisii* estar participando do ciclo de transmissão da *Leishmania* spp. Caso essa hipótese venha a ser confirmada, essas espécies também podem estar atuando como vetores no PERD.

Quanto a *Nyssomyia intermedia*, é uma espécie que desperta total atenção, além de ser reconhecida como vetor de leishmanioses, é um dos principais vetores de *Leishmania braziliensis* em área de Mata atlântica (Tolezano, 1994; Ferreira *et al.*, 2001). O seu grande número de espécimes coletados indica que essa espécie seja um dos prováveis vetores de leishmaniose tegumentar, na área do PERD.

Além de *Nyssomyia intermedia*, outras duas espécies reconhecidas como vetores, foram capturadas no PERD, sendo elas, *Nyssomyia whitmani* (4,57%) e *Migonemyia migonei* (3,21%). Apesar de não serem as espécies predominantes, a presença delas gera preocupação, uma vez que são espécies que atuam como vetores de *Leishmania* spp. (Young e Duncan, 1994; Aguiar e Medeiros, 2003).

Na análise de correlação entres as espécies vetores e distância das armadilhas instaladas na trilha do Juquita, a partir da borda da mata, foi identificado uma forte correlação negativa ($n=12$; $\rho=-0,6643$. $P> 0.0185$) (Tabela 2), ou seja, a medida que a armadilha foi se distanciando da borda, em direção ao interior da mata, o número de flebotomíneos vetores reconhecidos (*Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei*) capturados foi diminuindo, sendo que 54,36% dos flebotomíneos vetores reconhecidos, foram capturados até os 300 metros iniciais de mata, essa correção pode ser ilustrada observado no mapa de

densidade de Kernel (Figura 7), onde uma porção mais escura apresenta concentração dessas espécies, consideradas vetora, próximo a borda da mata. É interessante ressaltar que a borda da mata faz limite com a área urbana do município de Timóteo, área endêmica de leishmaniose tegumentar (Souza *et al.*, 2014). É uma região antropizada, com grande presença de animais domésticos e de plantações, contribuindo para manutenção e ocorrência dessas espécies vetores. O perímetro da grande ocorrência e vetores, os primeiros 300 metros da trilha do Juquita, gera grande preocupação, um vez que é uma área de intensa visita de pesquisadores, alunos, professores, praticantes de ecoturismo, funcionários, entre outros, e que coloca em risco a saúde dessas pessoas, com a possibilidade transmissão de leishmaniose.

Os dados de correlação também despertaram a atenção para a possibilidade de outros vetores estarem participando do ciclo de transmissão do agente da leishmaniose na área mais interna da mata. Uma vez que o número de flebotomíneos vetores reconhecidos vai reduzindo (Tabela 2) a medida que vai se aproximando do interior da mata. E o fato dos flebotomíneos vetores reconhecidos reduzirem não permite afirmar que a transmissão de *Leishmania* desapareça, caso haja a transmissão no interior da mata poderia ser relacionada a presença de uma outra espécie de flebotomíneos até o momento não reconhecida como vetor.

Tabela 2: Total de flebotomíneos coletados distribuídos pela distância entre a borda em direção ao interior da mata, Parque Estadual do Rio Doce, Timóteo-MG, 2012-2014.

Local de coleta (m) [#]	Flebotomíneos vetores reconhecidos [#]	(%)	Outras espécies de flebotomíneos	(%)	Total	(%)
0	137	36,15	65	4,03	202	10,14
300	69	18,21	56	3,47	125	6,27
600	15	3,96	94	5,82	109	5,47
900	25	6,60	158	9,79	183	9,18
1200	26	6,86	270	16,73	296	14,85
1500	23	6,07	120	7,43	143	7,18
1800	21	5,54	257	15,92	278	13,95
2100	6	1,58	106	6,57	112	5,62
2400	7	1,85	145	8,98	152	7,63
2700	37	9,76	205	12,70	242	12,14
3000	3	0,79	35	2,17	38	1,91
3300	10	2,64	103	6,38	113	5,67
Total (%)	379(19,02)	100,00	1.614(80,98)	100,00	1.993	100,00

Notas: (*) Locais onde foram instaladas as armadilhas, a, distância a partir do início da trilha do Juquita (borda a mata), em direção ao centro da mata. (#) A análise de correlação entre o local de coleta e a quantidade de flebotomíneos considerados, segundo a literatura, vetores de leishmanioses: n=12; $\rho = -0,6643$. $P > 0,0185$. Flebotomíneos vetores reconhecidos = *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonomyia migonei*

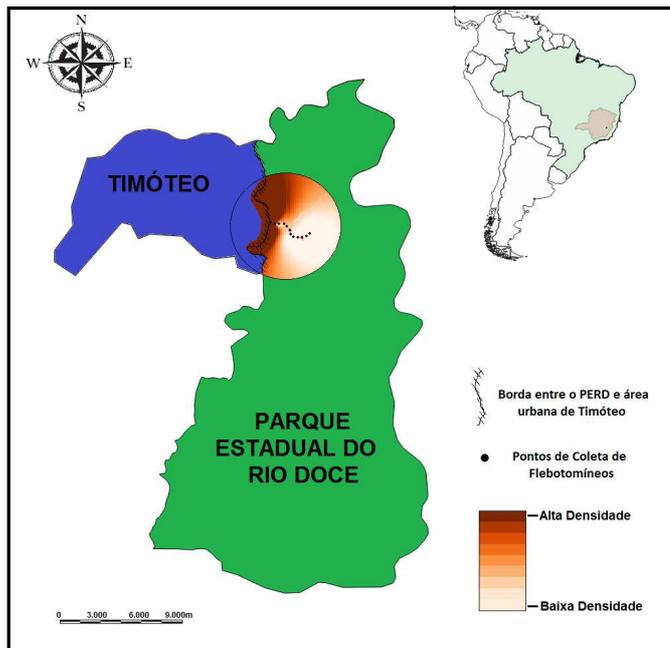


Figura 7: Mapa de densidade de Kernel, demonstrando a densidade de flebotomíneos, considerados vetores, coletados no PERD, Timóteo-MG, 2012-2014.

5.1.2 Flebotomíneos da área urbana de Timóteo

Durante as coletas realizadas em residências localizadas nas áreas urbana, foram coletados 3.942 espécimes de flebotomíneos, pertencentes a 22 espécies (Tabela 1). As espécies predominantes foram *Nyssomyia whitmani* (66,49%), *Nyssomyia intermedia* (18,21%) e *Micropygomyia quinquefer* (3,15%). Entre as espécies predominantes apenas *Micropygomyia quinquefer* não é reconhecida como uma espécie vetora.

Por outro lado a grande quantidade de *Nyssomyia whitmani* e *Nyssomyia intermedia*, um total de 84,7% dos flebotomíneos coletados na área urbana, fazem dessas espécies as prováveis responsáveis pelo ciclo de transmissão do agente da LTA no município, uma vez que as mesmas são consideradas vetores de *Leishmania*, observação essa que vem a corroborar com as observações realizadas no estudo desenvolvido por Souza (2014). *Nyssomyia whitmani* e *Nyssomyia*

intermedia são espécies com relatos de serem predominantes em ambientes antrópicos onde há registros de casos de LTA como demonstrado no estudo de Saraiva *et al.* (2011) no município de Belo Horizonte-MG. Essas espécies passam por um processo de adaptação domiciliar rápido e com grande importância epidemiológica, são citadas como as principais envolvidas na transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Andrade Filho *et al.*, 2007, Brazil e Brazil, 2014).

Outra espécie que chama atenção pela sua presença, podendo ser um possível vetor de *Leishmania* no município de Timóteo é a espécie *Migonemyia migonei* (2,94%). Rangel e Lainson (2003) apontam *Migonemyia migonei* como espécie vetora de *Leishmania*. Em estudo realizado no Rio de Janeiro, Pita-Pereira *et al.* (2005) observaram a presença de infecção natural em *Migonemyia migonei* por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, por meio de técnicas moleculares. É uma espécie que possui grande antropofilia e alta adaptação ao ambiente alterado pelo homem (Brazil e Brazil, 2014).

Observando o mapa de densidade de kernel (Figura 8) nota-se uma grande densidade de flebotomíneos capturados em residências localizadas próximas a borda do PERD, sendo que a grande maioria das espécies encontradas nessa área, um total de 91,00%, são espécies consideradas vetores (*Nyssomyia whitmani* e *Nyssomyia intermedia Migonemyia Migonei*) com alta concentração próximo as bordas do PERD. Essas espécies de flebotomíneos possuem grande facilidade de se adaptar com o ambiente peridomicílio (Rangel e Lainson, 2003). Esses resultados sugerem que essas espécies tenham se adaptado ao ambiente próximo as bordas do parque, uma vez que possam ter encontrado todas as condições (alimento e local de reprodução) para se estabelecer, apesar de ser um ambiente urbano são inúmeros os abrigos de animais e há uma grande proximidade com área de mata.

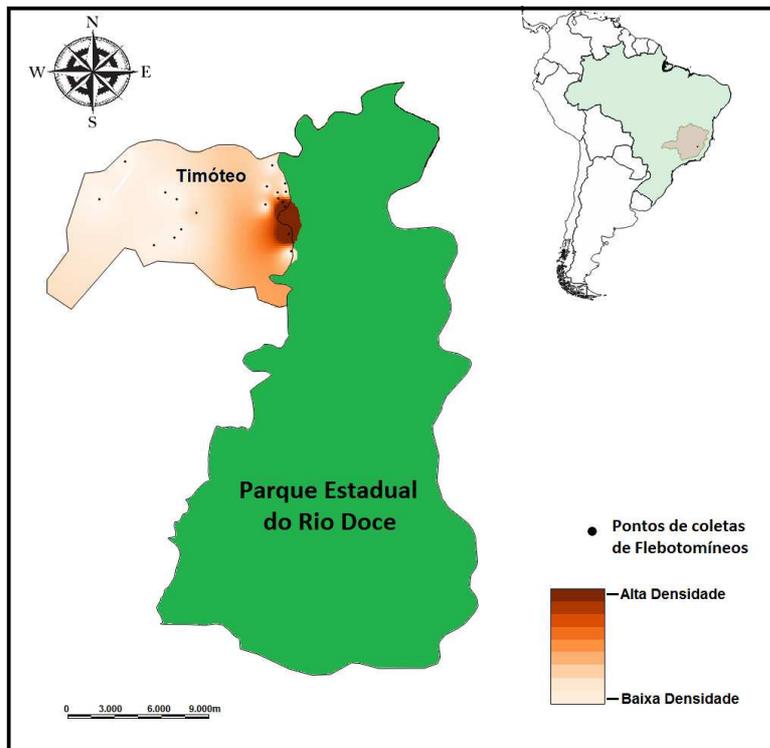


Figura 8: Mapa de densidade de Kernel, demonstrando a densidade de flebotomíneos, capturado nos domicílios da área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014.

Foi observado uma grande diferença de proporção entre flebotomíneos capturados na área urbana (66,42%) e flebotomíneos coletados no PERD (33,58%). Essas informações sugerem que os flebotomíneos presentes em Timóteo, estejam adaptados ao ambiente antrópico, encontrando condições ideais para alimentação e reprodução. Observando a diferença entre as proporções de espécies vetoras comprovados (*Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia Migonei*) entre as duas áreas, foi verificado que dos 3.836 flebotomíneos vetores 3.455(90,07%) foram coletados na área urbana enquanto que 381 (9,93%) foram coletados no PERD, sendo a diferença estatisticamente significativa entre as proporções ($z=70,191$; $p<0,0001$). *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia Migonei* são espécies já descritas com alto grau de antropofilia e com alta capacidade de

adaptação ao ambiente modificados pelo homem (Rangel *et al.*, 1986, Gontijo *et al.*, 2002, Aguiar e Medeiros, 2003), já *Nyssomyia whitmani* os estudos tem apontado que essa é uma espécie provavelmente silvestre, mas com tendência a se adaptar ao peridomicílio (Aguiar e Medeiros, 2003; Brazil e Brazil, 2014). O grande número coletado dessas espécies em Timóteo, demonstra que essas espécies já estão adaptadas ao meio urbano de município, e por se tratarem de espécies vetoras é necessário uma atenção especial por parte das autoridades de saúde, tais informações podem auxiliar na tomada de medidas de prevenção e controle.

5.1.3 Análise de correlação entre a presença de flebotomíneos e sazonalidade

No presente trabalho, as análises de correlação (Tabela 3) não demonstraram um padrão sazonal entre o número de flebotomíneo coletado e os dados climáticos. Embora haja estudos onde não é observado um padrão sazonal, como no caso de Guimarães *et al.* (2012), em estudo realizado no estado de Pernambuco, há estudos que demonstram a presença de comportamento sazonal em flebotomíneos. Como nos trabalhos desenvolvidos por Brazil e Brazil (2003), onde relatam que a duração das diferentes etapas do ciclo biológico dos flebotomíneos depende das condições de temperatura, umidade e disponibilidade de alimento. E ainda esclarece que a umidade é um fator determinante da longevidade dos insetos adultos, sendo que a maioria das espécies neotropicais não sobrevive muito tempo em condições de umidade abaixo de 50%.

É interessante ressaltar que o local de coleta é uma área de mata atlântica e que os flebotomíneos estão inseridos em microhabitats que podem passar por variações, principalmente em sua temperatura, umidade, alterando a dinâmica da população (Gomes *et al.*, 1980). Portanto, apesar do presente estudo não demonstrar um comportamento sazonal, é interessante um estudo mais detalhado, envolvendo padrões sazonais dos microhabitats para uma caracterização mais precisa comportamento sazonal dos flebotomíneos.

Tabela 3: Estudo sazonal de flebotomíneos capturados, segundo precipitação, umidade e temperatura, coletados no Parque Estadual do Rio Doce e na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014

Período	Flebotomíneos coletado no PERD	Flebotomíneos coletado na área urbana	Total de Flebotomíneos coletado	(%)	Precipitação (mm)				Umidade (%)				Temperatura (°C)			
					μ (%)	Med	DP	CV(%)	μ (%)	Med	DP	CV(%)	μ (%)	Med	DP	CV(%)
Set/2012	19	40	59	0,95	0,0	0,0	0,0	0,0	60,1	60,0	15,1	25,12	20,4	19,6	3,3	16,18
Out/2012	71	337	408	3,56	0,0	0,0	0,0	0,0	50,6	48,0	14,8	29,25	21,7	21,7	3,3	15,21
Nov/2012	51	175	226	2,56	0,0	0,0	0,1	0,0	78,7	79,0	9,1	11,56	24,4	24,3	2,4	9,84
Dez/2012	180	350	530	9,03	0,0	0,0	0,0	0,0	66,3	67,0	12,7	19,16	24,6	24,1	2,5	10,16
Jan/2013*	267	745	1012	13,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fev/2013	163	215	378	8,18	0,1	0,0	0,3	300,00	64,5	66,0	12,4	19,22	25,2	24,7	2,7	10,71
Mar/2013	238	205	443	11,94	0,0	0,0	0,0	0,0	75,8	76,0	9,0	11,87	25,3	25,2	2,6	10,28
Abr/2013	208	15	223	10,44	1,4	0,0	3,8	271,42	89,3	91,0	5,6	6,27	22,1	22,0	1,5	6,79
Mai/2013	169	260	429	8,48	0,0	0,0	0,0	0,0	78,0	82,0	11,4	14,62	21,0	20,0	2,7	12,86
Jun/2013	74	176	250	3,71	0,0	0,0	0,0	0,0	79,2	82,0	12,1	15,28	19,3	18,7	2,7	13,99
Jul/2013	133	435	568	6,67	0,0	0,0	0,0	0,0	76,4	80,0	11,2	14,66	21,0	20,2	2,8	13,33
Ago/2013	68	171	239	3,41	0,0	0,0	0,0	0,0	61,6	60,0	14,7	23,86	21,6	20,5	3,5	16,20
Set/2013	49	106	155	2,46	0,0	0,0	0,0	0,0	62,0	63,0	15,5	25,00	22,1	21,0	3,2	14,48
Out/2013	8	37	45	0,40	0,8	0,0	1,0	125,00	94,1	95,0	3,6	3,83	15,7	15,5	0,9	5,73
Nov/2013	71	289	360	3,56	1,9	0,0	3,6	189,47	80,3	86,0	16,3	20,30	21,3	20,4	2,9	13,62
Dez/2013	173	178	351	8,68	0,7	0,0	2,2	314,28	74,0	73,0	16,1	21,76	25,7	24,6	4,0	15,56
Jan/2014	32	163	195	1,61	0,0	0,0	0,0	0,0	64,0	61,0	12,1	18,91	25,9	25,7	3,5	13,51
Fev/2014	19	45	64	0,95	0,0	0,0	0,0	0,0	60,3	59,0	15,1	25,04	25,3	24,2	3,3	13,04
TOTAL	1,993	3,942	5,935	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: *Período em que a estação meteorológica esteve desativada. μ - média. Med - mediana. DP - Desvio Padrão. CV - Coeficiente de Variação.

Flebotomíneos coletado no PERD: Precipitação Média: n=17; p= 0,1530; P=0,5577, Umidade Média: n=17; p= 0,2859; P=0,2660, Umidade Mediana: n=17; p= 0,3163; P=0,2161
Temperatura média: n=17; p= 0,2551; P=0,3231, Temperatura Mediana: n=17; p= 0,3043; P=0,2350.

Total de flebotomíneos coletado: Precipitação Média: n=17; p= -0,1475; P= 0,5721, Umidade Média: n=17; p= 0,0809; P= 0,7576, Umidade Mediana: n=17; p= 0,1166; P= 0,6559
Temperatura média: n=17; p= 0,0970; P= 0,7111, Temperatura Mediana: n=17; p= 0,1667; P= 0,5226.

Flebotomíneos coletado na área urbana: Precipitação Média: n=17; p= -0,1703; P= 0,5134, Umidade Média: n=17; p= -0,0245; P= 0,9256, Umidade Mediana: n=17; p= 0,0049; P= 0,9851
Temperatura média: n=17; p= 0,0307; P= 0,9069, Temperatura Mediana: n=17; p= 0,0809; P= 0,7576.

5.2 Análise de infecção natural por *Leishmania* spp. nas amostras coletadas

Os estudos de infecção natural por *Leishmania* spp. foram realizados em todas as fêmeas de flebotomíneo não alimentadas, coletadas na área urbana de Timóteo, e em parte, das fêmeas de flebotomíneo não alimentadas coletadas no PERD. Além das amostras de flebotomíneos, foram realizadas análises de infecção natural por *Leishmania* spp. em amostras de sangue, baço, medula óssea, fígado, tecido de pele de cauda e tecido de pele de orelha dos roedores e marsupiais capturados. Também foram realizadas análises moleculares e sorológicas de amostras de sangue canino.

5.2.1 Estudo da infecção natural nas fêmeas de flebotomíneos

A pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. foi realizada a partir de 3.312 fêmeas não alimentadas de flebotomíneos, dessas 20,0% foram capturadas no PERD e 80,0% foram na áreas urbana de Timóteo.

Através da reação de PCR (utilizando o fragmento de aproximadamente 350pb do ITS1), observando o gel de agarose (Figura 9), foram detectadas 57 amostras positivas, sendo que 6 (10,5%) amostras foram coletadas no PERD e 51 (89,5%) na área urbana (Tabela 4). O grande número de espécimes coletados na área urbana pode estar relacionado a capacidade de adaptação desses flebotomíneos a ambiente antrópicos, e a disponibilidade de alimento e abrigo ideal para a manutenção e sobrevivência dos flebotomíneos na área urbana.

A Partir dos dados obtidos de amostras positivas, foi realizado o cálculo da Taxa de Infecção das fêmeas de flebotomíneos, tanto para o parque quanto para a região urbana de Timóteo. Os valores expressos foram 0,91% para o PERD e 1,92% para a área urbana de Timóteo.

Foram observados também taxas de infecção por espécie coletada, na qual, as espécies *Psychodopygus davisii* (1,3%) *Pressatia choti* (3,8%) foram as únicas encontradas com infecção no PERD, apesar de não serem consideradas espécies vetoras, deve ser dada uma atenção especial a essas espécies, principalmente em se tratando de áreas silvestres, Como já mencionado anteriormente, há registro da

participação de *Pressatia choti* na transmissão de *Leishmania* na região Amazônica (Rangel e Lainson, 2003; Gil *et al.*, 2003).

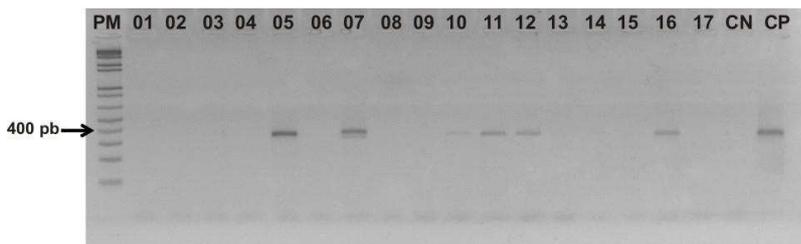


Figura 9: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp em fêmeas de flebotomíneo coletadas no PERD e área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (100pb); CN: Controle negativo (água pura livre de DNA); CP: controle positivo de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 01, 02, 03, 04, 06, 08, 09, 13, 14, 15 e 17: amostras negativas; 05, 07, 10, 11, 12 e 16: amostras positivas.

Em relação às amostras da áreas urbana, a espécie vetora que apresentou maior taxa de infecção foi *Migonemyia migonei* com 3,30%, enquanto *Nyssomyia whitmani* e *Nyssomyia intermedia* apresentaram 2,07% e 1,39% respectivamente.

As taxas encontradas estão acima das taxas normalmente relatadas nos estudos, a exemplo o estudo desenvolvido por Oliveira-Pereira *et al.* (2006) no estado do Maranhão, onde foi verificado uma taxa de 0,80% em fêmeas de *Nyssomyia whitmani*. No estudo de Neitzke-Abreu *et al.* (2014) realizado em regiões endêmicas de LTA no estado do Paraná, foi relatado a taxa de infecção de 1,12% em *Nyssomyia whitmani*. Carvalho *et al.* (2008), em estudo realizando no estado de Minas Gerais verificou taxa de 0,83% em *Nyssomyia whitmani*.

Apesar o grande número de fêmeas coletadas da espécie *Nyssomyia whitmani*, a maior taxa de infecção foi de *Migonemyia migonei* uma espécie já reconhecida como vetora e que pode estar participando ativamente do ciclo de transmissão da *Leishmania* no município, juntamente com *Nyssomyia whitmani* e *Nyssomyia intermedia*. É possível assim, sugerir que sejam essas espécies responsáveis pela transmissão de *Leishmania* na área urbana do município.

Em relação às espécies *Evandromyia lenti* (Taxa de infecção de 14,29%) *Evandromyia sallesi* (Taxa de infecção de 3,13%) e *Micropygomyia quinquefer* (Taxa

de infecção de 0,88%) foram espécies que apresentaram apenas uma amostra positiva, porém como apresentaram um baixo número de espécimes capturados, o resultado da taxa de infecção foi elevado. O que não indica que essas espécies sejam os principais responsáveis pela transmissão da leishmania na área. Entretanto, não devemos ignorar esses achados mesmo sendo espécies não relatadas como vetoras. Há inclusive outros estudos registrando a infecção natural dessas espécies, o que não é o suficiente para definir como vetores.

Micropygomyia quinquefer já foi registrada com infecção natural em estudo realizado no Mato Grosso do sul, com infecção com por *Leishmania braziliensis* (Paiva *et al.*, 2010), e em Minas Gerais (Souza, 2011). É importante lembrar que essa espécie pertence a um grupo de flebotomíneos em que as fêmeas se alimentam de animais de sangue frio (Deane e Deane, 1957).

Evandromyia lenti e *Evandromyia sallesi* também foram identificadas com infecção natural em estudos por métodos moleculares realizados no estado de Minas Gerais. No caso de Saraiva *et al.* (2009) realizando estudos na cidade de Corinto e Lassance verificou a presença de *Leishmania braziliensis* em *Evandromyia sallesi*. Já Sanguinette (2011) em estudo desenvolvido na cidade de Várzea da Palma verificou infecção natural tanto em *Evandromyia sallesi* *Evandromyia lenti*.

Os resultados obtidos no presente estudo, podem ser explicados em parte pela metodologia empregada, onde foram utilizados análises moleculares de fêmeas individualmente. Nos estudos desenvolvidos por Neitzke-Abreu *et al.* (2014) e Carvalho *et al.* (2008) as análises moleculares foram realizadas a partir de pool de fêmeas de flebotomíneos, podendo os resultados serem subestimados. Por outro lado, a região do estudo é uma área endêmica de LTA, o que também justifica a alta taxa de infecção nas fêmeas de flebotomíneos.

Tabela 4: Taxa de infecção por *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneo segundo espécie, coletadas no Parque Estadual do Rio Doce e na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014.

Espécie*	Coletas realizadas no PERD					Coletas realizadas na área urbana					Total				
	N, de Fêmeas#	%	Amostras positivas	%	TI	N, de Fêmeas#	%	Amostras positivas	%	TI	N, de Fêmeas#	%	Amostras positivas	%	TI
<i>Lutzomyia</i> sp.●	1	0,27	0	0,00	0,00	1	0,04	1	1,96	0,00	2	0,07	1	1,75	-
<i>Evandromyia lenti</i>	0	0,00	0	0,00	0,00	7	0,27	1	1,96	14,29	7	0,24	1	1,75	14,29
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0,00	0	0,00	0,00	32	1,25	1	1,96	3,13	32	1,09	1	1,75	3,13
<i>Migonemyia migonei</i>	26	7,03	0	0,00	0,00	91	3,54	3	5,88	3,30	117	3,99	3	5,26	2,56
<i>Nyssomyia whitmani</i>	23	6,22	0	0,00	0,00	1.784	69,44	37	72,55	2,07	1807	61,61	37	64,91	2,05
<i>Nyssomyia intermedia</i>	53	14,32	0	0,00	0,00	504	19,62	7	13,73	1,39	557	18,99	7	12,28	1,26
<i>Psychodopygus davisii</i>	154	41,62	2	33,33	1,30	6	0,23	0	0,00	0,00	160	5,46	2	3,51	1,25
<i>Pressatia choti</i>	105	28,38	4	66,67	3,81	31	1,21	0	0,00	0,00	136	4,64	4	7,02	2,94
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	8	2,16	0	0,00	0,00	113	4,40	1	1,96	0,88	121	4,13	1	1,75	0,83
Total	370	100,00	6	100,00		2-569	100,00	51	100,00		2939	100,20	57	100,00	

* Espécies de fêmeas de flebotomíneos positivas na PCR. TM - Taxa de Infecção.

Apenas as fêmeas de flebotomíneos que foram realizadas análises moleculares para infecção por *Leishmania* spp.

● A taxa de infecção não foi calculada pois não houve possibilidade de definir a espécie.

5.2.2 Estudo da infecção natural nos roedores e marsupiais

Nos estudos desenvolvidos sobre roedores e marsupiais, foram coletados um total de 33 espécimes, distribuídos em sete espécies, sendo duas espécies pertencentes a ordem Didelphimorphia, *Marmosa (Micoureus) paraguayana* e *Didelphis aurita*, e 5 espécies da ordem Rodentia, três espécies de roedores silvestres, *Akodon cursor*, *Hylaeamys megacephalus* e *Calomys cerqueirai*, e duas espécies de roedores sinantrópicos, *Rattus rattus* e *Mus musculus*. As espécies predominantes foram *Rattus rattus* (39,4%) seguida das espécies *Mus musculus* (30,3%) e *Marmosa (Micoureus) paraguayana* (15,2%). Dos 33 espécimes coletados 11 ocorreram no PERD e 22 na área urbana, As únicas espécies que ocorreram na área urbana foram *Rattus rattus* (n=12) e *Mus musculus* (n=10) (Tabela 5). O sucesso de captura foi maior na área urbana, sendo de 3,6% enquanto que o sucesso de captura no PERD foi de 0,5%, já a riqueza de espécies no PERD foi maior (n=6).

As espécies coletadas no PERD foram espécies silvestres (Tabela 5) com exceção de um espécime de *Rattus rattus*, encontrado na parte dois da trilha, próximo ao 1500m. A presença dessa espécie pode ser justificada observando o local de coleta. A armadilha se encontrava as margens de um lago com características e objetos que demonstram a presença frequente de humanos no local. Foram encontrados restos de roupas, alimentos, utensílios de pesca, barcos de pesca entre outros objetos que demonstram a presença de pessoas no local, o que pode justificar a presença dessa espécie às margens do lago.

Em relação aos estudos de infecção por *Leishmania*, as tentativas de cultivo do parasita não foram eficazes, uma vez que não foi observado presença de parasitas nas amostras de cultura. Há estudos que já demonstraram as dificuldades no cultivo do parasita de amostras naturais de tecido de animais silvestres e sinantrópicos (Jansen *et al.*, 2010), possivelmente devido a uma baixa parasitemia ou até mesmo por dificuldade de uma padronização mais adequada da técnica desenvolvida.

Em contrapartida, os estudos moleculares, com sua alta sensibilidade e especificidade apontaram positividade em 26 (78,8%) das 33 espécimes coletadas

(Figura 10). Dos animais coletados no PERD, 90,91% tiveram amostras positivas nos estudos moleculares, já na área urbana 72,73% foram positivas.

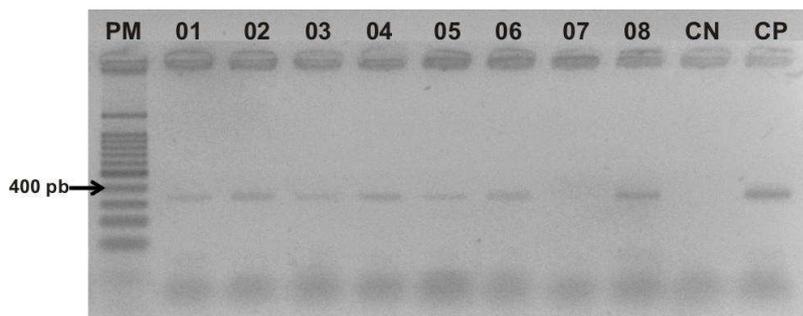


Figura 10: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais coletados no PERD e área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014. Gel de agarose 2% corado com gel Red, PM: marcador de pares de base (100pb); CN: Controle negativo (água pura livre de DNA); CP: controle positivo de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 07: amostras negativas; 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 08: amostras positivas.

Entre os espécimes capturadas da ordem Didelphimorphia, seis (85,7%) em sete espécimes coletadas foram positivas. Essa ordem é descrita como principal reservatório de *Leishmania* spp. em áreas silvestres (Brasil, 20014). Santiago *et al.* (2007), em estudo desenvolvido no estado de São Paulo, verificou a infecção por *Leishmania* spp. em *Didelphis aurita* empregando técnicas moleculares. Já o gênero *Marmosa* spp. foi encontrado com infecção natural por *Leishmania amazonensis*, no estado do Amazonas (Arias *et al.*, 1981) e por *Leishmania braziliensis*, no estado de Pernambuco (Brandão-Filho *et al.*, 2003).

Já a ordem Rodentia, dos 26 espécimes capturados 20 (76,9%) foram positivas nas análises moleculares para infecção por *Leishmania* spp. Das quatro espécies de roedores encontradas no PERD todas elas foram positivas nas análises moleculares (Tabela 5).

A espécie *Akodon cursor*, com registro de um único espécime encontrado, foi coletado na área mais interna do parque no ponto C da trilha, próximo aos 3.000 metros distantes da borda da mata, corroborando com os estudos infecção por *Leishmania* spp. desenvolvidos por Nardi (2010) no estado de São Paulo. Esse gênero de roedor tem hábitos terrestre podendo habitar formações florestais, áreas

abertas adjacentes e campos de altitude ao longo de toda a Mata Atlântica, sendo encontrado em região costeira, do estado da Paraíba ao Paraná, e no leste do estado de Minas Gerais região onde foi desenvolvido o presente estudo (Bonvicino *et al.*, 2008).

Também foram coletadas apenas um único exemplar, no ponto C, das espécies *Hylaeamys megacephalus* e *Calomys cerqueirae* e por sua vez também foram positivos na PCR do gene ITS1. Ambas as espécies são de hábitos terrestres, *Hylaeamys megacephalus* habita formações florestais e formação vegetal aberta de Mata Atlântica, há registro de sua distribuição geográfica em vários estados brasileiros incluindo Minas Gerais (Bonvicino *et al.*, 2008). No caso de *Calomys cerqueira* teve seu primeiro registro recente em estudo desenvolvido por Bonvicino *et al.* (2010).

É válido ressaltar que as três espécies silvestres de roedores aqui relatados, foram encontradas no ponto C da trilha, uma áreas mais central da mata, local sem características de antropização, a infecção natural observada nesses roedores é um indicativo que essas espécies possam ter um papel importante na manutenção do ciclo silvestre de transmissão da *Leishmania* spp. no PERD. A espécie *Akodon cursor* é uma espécie de hábitos generalistas, e é frequentemente encontrada em áreas de transição entre o ambiente silvestre e o ambiente peridomiciliar ou rural, Então isso pode determinar sua importância na manutenção do ciclo também nessas áreas de transição.

Em relação a área urbana, dos 22 roedores coletados, 16 (72,7%) foram positivos nas análises moleculares, sendo 10 (62,5%) da espécie *Rattus rattus* e seis (37,5%) *Mus musculus*, ambos sinantrópicos esse alta taxa de infecção pode sugerir que esses roedores possam participar da manutenção do ciclo das leishmanias na área urbana do município.

Tabela 5: Resultado da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais, segundo local de coleta, Timóteo-MG, 2012-2014

Espécie	Coletas realizadas no PERD				Coletas realizadas na área urbana				Total			
	N. de espécimes	%	Espécimes positivos	%	N. de espécimes	%	Espécimes positivos	%	N. de espécimes	%	Espécimes positivos	%
<i>Marmosa (Micoureus) paraguayana</i>	5	45,4	4	40,0	-	-	-	-	5	15,2	4	15,4
<i>Akodon cursor</i>	1	9,1	1	10,0	-	-	-	-	1	3,0	1	3,8
<i>Didelphis aurita</i>	2	18,2	2	20,0	-	-	-	-	2	6,1	2	7,7
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	1	9,1	1	10,0	-	-	-	-	1	3,0	1	3,8
<i>Calomys cerqueirai</i>	1	9,1	1	10,0	-	-	-	-	1	3,0	1	3,8
<i>Rattus rattus</i>	1	9,1	1	10,0	12	54,6	10	62,5	13	39,4	11	42,3
<i>Mus musculus</i>	-	-	-	-	10	45,4	6	37,5	10	30,3	6	23,1
Total	11	100,00	10	100,00	22	100,00	16	100,00	33	100,00	26	100,00

A espécie *Rattus rattus* é geralmente encontrada próximo às habitações humanas, com grande habilidade para escalar, frequentando forros de casas. Possui também registro longe de habitações humanas, como em estradas por onde sejam transportados grãos ou outros itens que lhe podem servir de alimento. Nessas situações, abrigam-se em troncos caídos, considerados roedores originalmente do Velho Mundo, introduzidos pela colonização européia, e com registro de distribuição da espécie em todos os estados do Brasil (Bonvicino *et al.*, 2008). Essa espécie já foi encontrada com infecção por *Leishmania braziliensis* em áreas residenciais e plantações no estado do Pernambuco, em estudo realizado por Brandão-Filho *et al.* (2003), e na região norte do estado de Minas (Quaresma *et al.*, 2011).

Mus musculus é uma espécie que vive essencialmente em habitações humanas, um roedor originalmente do Velho Mundo, também introduzido pela colonização européia (Bonvicino *et al.*, 2008). Entre os estudos de infecção por *Leishmania* spp. em *Mus musculus* há registro de infecção em Minas Gerais, em estudo desenvolvido por Melo (2008). E por ser uma espécie encontrada em todo mundo há também registro de infecção em Portugal (Helhazar *et al.*, 2013) e em região localizada no sul do Irã (Parhizkari *et al.*, 2011).

É importante informar que em cada espécime de roedor e marsupial foram coletadas e analisadas seis amostras (tecido de pele de cauda e orelha, medula óssea, baço, fígado e sangue) totalizando 198 amostras analisadas por biologia molecular. Dessas foram positivas três amostras de pele de cauda, com taxa de Infecção de 1,51%, uma amostra de pele de orelha, taxa de Infecção de 0,50% e 24 amostras de sangue, com uma taxa de Infecção de 12,12% (Tabela 6). Outros estudos verificando a taxa de infecção em amostras coletadas de roedores e marsupiais, revelaram resultados diferentes dos obtidos no presente trabalho. No estudo desenvolvido por Melo (2008) em Minas Gerais, foi observado grande taxa de infecção em fragmentos de fígado e tecido de pele de orelha e cauda, não foram encontradas amostras positivas em sangue. O mesmo ocorreu no trabalho desenvolvido por Helhazar *et al.* (2013) em Portugal. A alta taxa de infecção observada nas amostras de sangue periférico podem indicar que não haja necessidade de utilizar amostras de outros tecidos, quando o objetivo for apenas identificar a detecção de infecção natural por *Leishmania* spp. em roedores.

Tabela 6: Frequência de amostras positivas na investigação de infecção natural por *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais, segundo local de coleta, Timóteo-MG, 2012-2014

Amostra	Amostras coletadas no PERD				Coletas realizadas na área urbana			
	N. de amostras	%	Amostras positivas	%	N. de amostras	%	Amostras positivas	%
Tecido de pele de cauda	11	16,67	2	18,18	22	16,67	1	5,88
Tecido de pele de Orelha	11	16,67	0	0,00	22	16,67	1	5,88
Sangue	11	16,67	9	81,82	22	16,67	15	88,24
Baço	11	16,67	0	0,00	22	16,67	0	0,00
Fígado	11	16,67	0	0,00	22	16,67	0	0,00
Medula Óssea	11	16,67	0	0,00	22	16,67	0	0,00
Total	66	100,00	11	100,00	132	100	17	100,00

Os dados de infecção em *Mus musculus* e *Rattus rattus* são de grande importância epidemiológica, sua capacidade de dispersão somada a capacidade de adaptação aos mais variados ambientes, tornam essas espécies um grande problema de saúde pública com possibilidade de participação direta no ciclo de transmissão dos agentes das leishmanioses.

5.2.3 Estudo da infecção natural em cães

A participação do cão no ciclo de transmissão das *Leishmanias* é bem complexa. Seu papel enquanto reservatório no ciclo de transmissão do agente da LV é bem definido e sedimentado sendo considerado um importante reservatório doméstico. Em contra partida na transmissão do agente da LTA, até o presente momento, é desconhecido o seu papel enquanto reservatório (Figueiredo e Madeira 2014), apesar dos estudos identificando infecção natural por espécies de *Leishmania* responsáveis por LTA, como exemplo a *Leishmania braziliensis* (Madeira *et al.*, 2003; Dantas-Torres, 2007; Dantas-Torres, 2009).

Para verificar a situação dos cães no município de Timóteo foram realizados diagnósticos sorológicos e moleculares em sangue coletado em 305 cães, esses cães pertenciam às residências no entorno dos 19 pontos de coleta de flebotômicos e animais sinantrópicos da área urbana.

A primeira análise realizada foi ainda no município junto à Secretaria Municipal de Saúde. Foi realizado o teste imunocromatográfico (TR DPP®) das 305 amostras coletadas, 10 amostras foram positivas. Outra análise sorológica realizada, dessa vez junto a FUNED no município de Belo Horizonte no estado de Minas Gerais, utilizando o Kit de diagnóstico ELISA, também nas 305 amostras, 27 foram positivas (Figura 11). Os cães soro positivos nas duas análises sorológicas foram recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses do município para os procedimentos preconizados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2011).

Estudos utilizando os teste DPP® e ELISA já desmotraram uma alta sensibilidade e especificidade na aplicação dos testes como observado por Coura-Vital *et al.* (2013) e Laurenti (2014), onde autores propõem a utilização do DPP® não só como um teste de triagem e sim como um teste confirmatório em áreas

endêmicas e com alta demanda. Porém essas interpretações devem ser tratadas com bastante cautela.

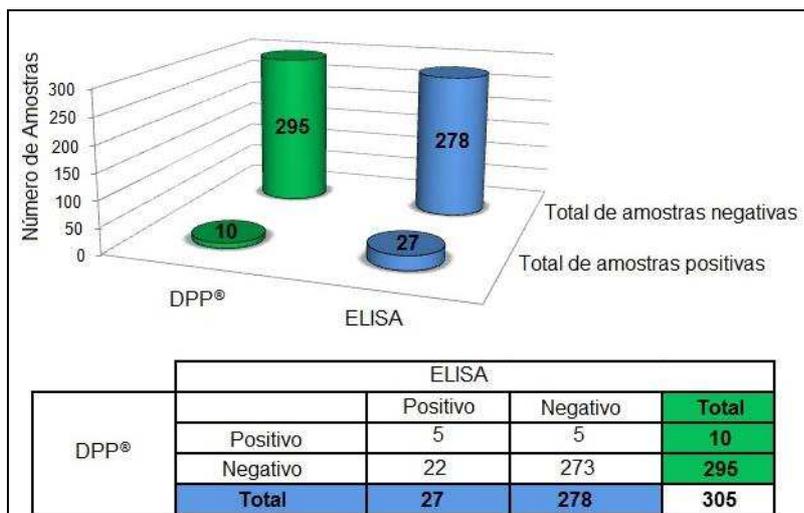


Figura 11: Resultado de análise sorológica (DPP® e ELISA) em sangue canino, coletado na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014.

É importante mencionar que das 27 amostras positivas no ELISA apenas cinco foram positivas no DPP®, os testes sorológicos aqui disponíveis são para diagnóstico de *Leishmania Visceral Canina*. Essas técnicas são preconizadas pelo Ministério da Saúde sendo o DPP® um teste rápido para triagem e o ELISA o confirmatório (Brasil, 2011). A partir da positividade nos dois diagnósticos os Centros de Controles de Zoonoses dos municípios procedem as coletas e eutanásias dos cães soro positivos. No estudo não foi possível calcular a sensibilidade e especificidade dos métodos a partir dessa amostras, pois eram amostras que não se tinham uma sorologia pré definida e apenas um cão dos 305 apresentou sintomas clínicos para LVC.

Segundo Gonçalves (2010) o ELISA, assim como outras sorologias, podem apresentar resultados falso-positivos por *Leishmania spp.*, onde amostras de sangue sob movimentação brusca e contínua, além de exposição a calor mais intenso que a

temperatura corporal, ou, mesmo o congelamento, sofrem hemólise e liberam o pigmento cromático hemoglobina, sendo o ELISA uma técnica colorimétrica. O ensaio de amostras hemolisadas podem acarretar leituras elevadas, propiciando possível resultado positivo.

Possíveis falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um número desconhecido de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos (Faria e Andrade, 2012).

Além dos estudos sorológicos desenvolvidos foram utilizadas ferramentas moleculares no intuito de se identificar infecção natural por *Leishmania* spp.

O diagnóstico foi realizado nas mesmas 305 amostras de sangue utilizadas na sorologia. A técnica empregada consiste na amplificação do fragmento nas amostras por meio do PCR do gene ITS1 observado em gel de agarose (Figura 12).

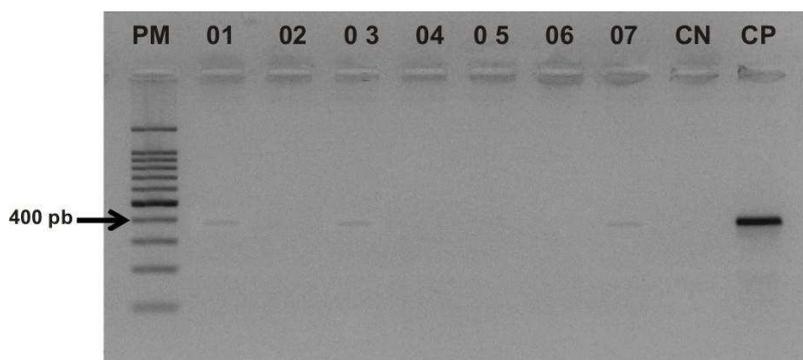


Figura 12: Resultado da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. em amostras de sangue canino, coletadas na área urbana de Timóteo-MG, 2012-2014. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (100pb); CN: Controle negativo (água pura livre de DNA); CP: controle positivo de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 02, 04, 05 e 06: amostras negativas; 01, 03 e 07: amostras positivas.

Das 305 amostras de sangue periférico coletadas 32(10,5%) foram positivas (Figura 13). As amostras utilizadas nesse estudo foram apenas amostras de sangue periférico, portanto não foi possível comparar os resultados entre amostras de outros tecidos. Nos estudos são utilizadas diversas amostras biológicas nas análises moleculares como: baço, linfonodos, pele, biópsia conjuntiva, sangue e medula óssea. Em estudo realizado por Sanguinette (2011), comparando amostras de

medula óssea, pele e sangue de cães coletados no estado de Minas Gerais, foi observada maior eficiência das análises moleculares em medula óssea. Já Solano-Gallego *et al.* (2001) em estudo realizado na Espanha obteve resultados diferentes foram observados maior taxa de positividade quando analisaram os tecidos de pele.

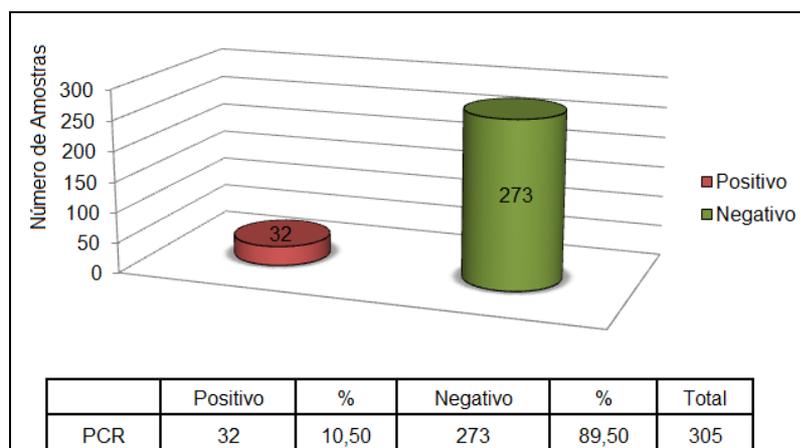


Figura 13: Resultado de análise molecular (PCR) em sangue canino, coletado na área urbana do município de Timóteo-MG, 2012-2014.

Manna *et al.* (2004) realizando estudo na Itália verificou que amostras clínicas biológicas de aspirados ou biópsias de linfonodo, baço, medula óssea e fígado de cão podem ser selecionadas para a detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela PCR, mas as amostras de sangue podem favorecer uma colheita menos invasiva e apresentar melhores resultados.

Os resultados aqui obtidos, através de análises moleculares de sangue canino do município, em uma área endêmica de LTA, demonstra a possibilidade de haver espécies de *Leishmania* spp., diferente de *Leishmania infantum*, presente na corrente sanguínea de cães do município.

5.3 Estudo da variabilidade genética das amostras biológicas

Durante o presente estudo, além de diagnosticar as amostras coletadas, por meio da PCR do gene ITS1, foi elaborado uma análise filogenética em busca de

verificar se as amostras possuem variabilidade genética entre amostras depositadas no banco de dados do Genbank. Essas análises foram essenciais para identificar as espécies presentes nas amostras positivas.

Nas análises de variabilidade genética foram utilizadas as amostras positivas da PCR, um total de 115 amostras foram clonadas e enviadas para o sequenciamento. Porém, do total sequenciado 101 (87,8%) alinharam (Figura 14) e foram utilizadas nas análises, as outras 14 (12,2%) foram excluídas do estudo. Além das sequências das amostras positivas, foram utilizadas no estudo filogenético 81 sequências depositadas no Genbank, distribuídas em 11 espécies (Quadro 2).

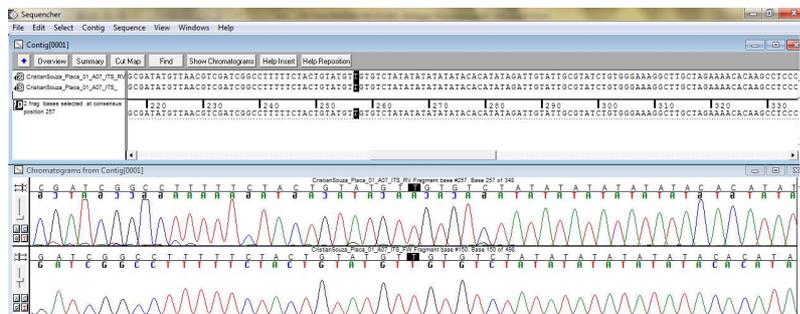


Figura 14: Ilustração do alinhamento das sequências das amostras positivas no estudo da infecção natural por *Leishmania* spp. em amostras biológicas coletadas em Timóteo-MG, 2012-2014.

A partir do estudo das 182 sequências nucleotídicas foi gerada uma árvore filogenética, na qual foi possível verificar a formação de três grandes grupos. Nos grupos 1 e 2 foram formados por sequência do subgênero *Leishmania*, no grupo 1 foram observado sequências de *Leishmania infantum* e no grupo 2 foram observadas sequências das espécies *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis*. Já o grupo 3 foi formado por agrupamentos de sequências de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, as espécies agrupadas foram *Leishmania braziliensis*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania shawi*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania peruviana*, *Leishmania utingensis*. As amostras positivas apresentaram variabilidade genética, uma vez que houve três diferentes agrupamentos de sequências das amostras positivas na PCR, demonstrando que há presença de mais de uma espécie *Leishmania* no município de Timóteo. No grupo 1

foi observada presença de uma sequência de amostra positiva na PCR, no grupo 2 foram observadas três sequências positivas das amostras na PCR e no Grupo 3 foram observadas sequências de 97 amostras (figura 15).

Quadro 2: Relação das sequências depositadas no Genbank utilizadas na análise filogenética

Espécie	Número de identificação de depósito da sequência no GenBank
<i>Leishmania braziliensis</i>	Fj753379, Fj753375; Fj753376; Kf985166; Kf985172; Fj753384; Kf985167; Fj753383; Kp274863; Aj300484; AJ300483; Fj753380; FJ753377; Fn398338; Dq182537; Fn398337; Fj753382; Fj753381; Fj753385; Fj753374; Jn936955; Fn398336; Fn398335; Fn398334; Fn398333; Jq061322; Jx448547; Jx448548; Jx448549; Jq397604 e Fj753378
<i>Leishmania peruviana</i>	Fn398339 e Fn398340
<i>Leishmania guyanensis</i>	Dq182539; Dq182539; Dq182541; Dq182540; Jn671917; Fn398330; Fn398331 e Fn398332
<i>Leishmania shawi</i>	Fn398328
<i>Leishmania lainsoni</i>	Fn398154
<i>Leishmania naiffi</i>	Fn398152
<i>Leishmania utingensis</i>	FN398153
<i>Leishmania amazonensis</i>	Af339753
<i>Leishmania mexicana</i>	Af466381; Af466383 E Af466380
<i>Leishmania infantum</i>	Aj634362; Aj634361; Aj634363; Aj634364; Aj634371; Aj634370; Aj634369; Aj634355; Aj634354; Aj634353; Aj634352; Aj634351; Aj634350; Aj634349; Aj634348; Aj634347; Aj634346; Aj634345; Aj634344; Aj634343; Aj634342; Aj634341; Aj634340; Aj634339; Fn398343; Fn398341; Fn398342; Fm164420; Fm164419; Fm164418; Fm164417 e Fm164416

Utilizando a mesma na região do ITS1, em estudos desenvolvidos Berzunza-Cruz *et al.* (2002) e Rotureau *et al.* (2006) utilizando o método de enzimas de restrição foi por observado a distinção dos subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, como apresentado neste estudo.

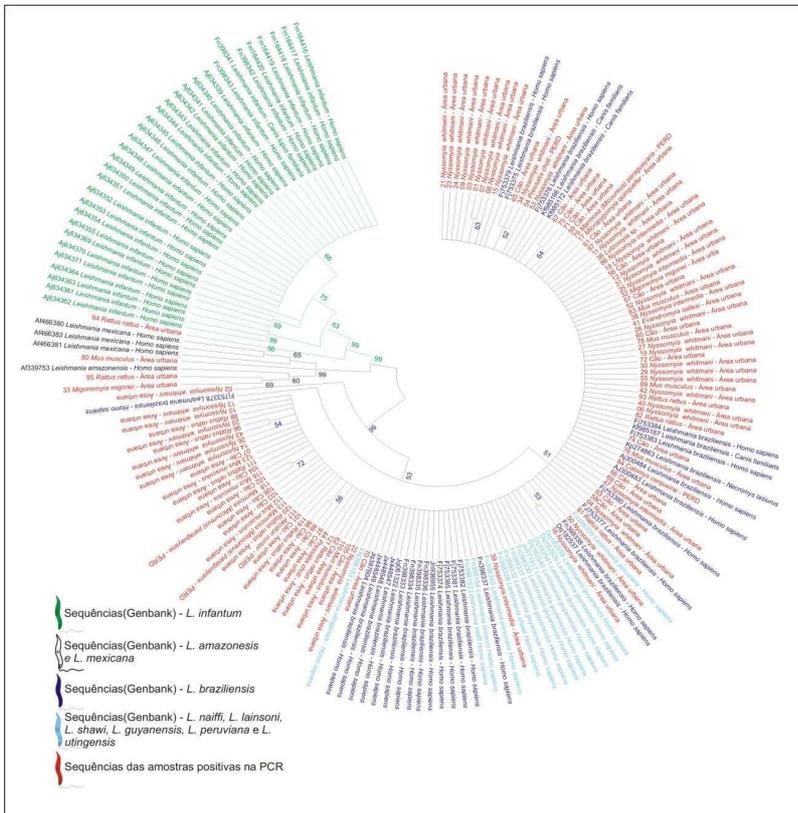


Figura 15: Árvore filogenética com sequências nucleotídicas de amostras positivas do estudo de infecção por *Leishmania* spp. em amostras biológicas coletadas no município de Timóteo-MG, 2012-2014.

A grande diferença entre a técnica empregada no presente trabalho e as técnicas desenvolvidas por Berzunza-Cruz *et al.* (2002) e Rotureau *et al.* (2006) é que o padrão das sequências entre as amostras são muito próximas, o que pode se tornar indistinguíveis pelas enzimas de restrição utilizadas, não permitindo, desta forma, identificar cada espécie. Nessa situação o sequenciamento é uma ferramenta de fundamental importância. O que foi observado no Grupo 3 da árvore filogenética, onde o agrupamento relacionou espécies apresentando diferenças bem sutis que por meio do sequenciamento podem ser visíveis, enquanto outras técnicas, como a restrição por enzima, pode não ser percebidas.

Alterações nas sequências nucleotídicas da região do ITS1 não irá refletir na habilidade do organismo em se adaptar a mudanças ecológicas, isso porque não é uma região codificante. Entretanto, devido a seu alto grau de polimorfismo na composição deste *locus* vêm sendo realizados estudos epidemiológicos e moleculares empregando o ITS1 (Cupolillo *et al.*, 2003). A região do ITS1, apesar de apresentar-se bastante conservada, tem sido usada para a taxonomia e as análises dessas regiões podem identificar diferentes espécies de *Leishmania*. Os marcadores da ITS1 podem gerar um grande número de informações e determinar uma medida mais precisa de distâncias genéticas entre espécies, facilitando a análise filogenética com inferência na variação taxonômica das espécies (Dávila e Momen, 2000).

Schonian *et al.* (2001) em estudo realizado no velho mundo, utilizando técnicas de enzima de restrição, relataram que análises da região ITS1 em espécies de *Leishmania* identificam predominantemente espécies dermatrópicas aos seres humanos. Essas observações puderam ser relatadas, pois, todas as espécies identificadas são espécies responsáveis por doenças no ser humano. O agrupamento de todas as sequências de amostras positivas de infecção natural de *Leishmania* spp. obtidas em Timóteo demonstram que as espécies de *Leishmania* presentes no município podem causar leishmanioses nos seres humanos.

A maioria das espécies de *Leishmania* de importância médica foram distinguidas pelo ITS1 no estudo desenvolvido por Rotureau *et al.* (2006) utilizando enzimas de restrição. Outros autores também obtiveram esse mesmo diagnóstico empregando a mesma técnica (Schonian *et al.*, 2003; Cuervo *et al.*, 2004). Isso demonstra o quanto o gene ITS1 é útil para a identificação de espécies de *Leishmania*.

5.4 Identificação das sequências de *Leishmania* spp. quanto espécies.

A partir do estudo filogenético todas as amostras sequenciadas de infecção natural por *Leishmania* spp. e que alinharam foram utilizadas na análise para identificação da espécie.

Foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI utilizando o algoritmo Blast, para verificar a identidade entre sequências amplificadas com sequências de

espécie depositada no Genbank. Foram identificadas as espécies de *Leishmania* spp. em 98 animais (Tabela 7), sendo 27(27,55%) em cães, 22(22,45%) em animais sinantrópicos e silvestres e 49(50,00%) em fêmeas de flebotomíneos.

Em relação as amostras de sangue canino todas as 27 amostras foram positivas para *Leishmania braziliensis*. Esses resultados também foram obtidos em outros trabalhos, como os resultados obtidos por Reithinger *et al.* (2000) no qual os autores verificaram infecção natural por *Leishmania braziliensis* em cães provenientes de 16 aldeias do Peru, e sugeriu que a alta prevalência de *Leishmania braziliensis* verificada tanto em cães assintomáticos como sintomáticos fornecem evidências para seu papel suspeito como reservatórios de LTA. Da mesma forma Leça Júnior *et al.* (2015) realizando estudos no sul da Bahia observou presença de infecção por *Leishmania braziliensis* em sangue canino. Os estudos com sangue canino em busca de verificar infecção natural por *Leishmania braziliensis* se intensificaram com a utilização de métodos moleculares para diagnóstico auxiliando as pesquisas. Velasquez *et al.* (2006) observaram que a difusão hematogena do parasita em cães não é uma ocorrência rara, reforçando a hipótese de que os cães podem atuar como um possível reservatório secundário do agente da LTA secundário em algumas áreas da transmissão de *Leishmania braziliensis* no Brasil.

Os resultados obtidos analisando as sequências das amostras positivas na infecção natural por *Leishmania braziliensis* em sangue canino sugerem, assim como os estudos desenvolvidos por Leça Júnior *et al.* (2015) e Reithinger *et al.* (2000), que o cão possa ter o papel de reservatórios do agente da LTA, ainda que não seja comprovada sua participação no ciclo, enquanto hospedeiro ou reservatório. Esses resultados indicam que cães possam ser importantes na manutenção do agente de LTA em Timóteo, uma vez que o município e uma região endêmica de LTA.

Nas análises das sequências das amostras positivas coletadas de animais sinantrópicos e silvestres, três (3,06%) sequências foram coletadas de *Marmosa (Micoureus) paraguayana* capturados no PERD, sendo positivos para *Leishmania braziliensis*. Em relação aos roedores foram 19 (19,39%) sequências, dessas três (15,79%) eram de roedores capturados no PERD, sendo um *Rattus rattus*, um *Akodon cursor*, e um *Calomys cerqueirai*, nas três espécies foi identificado infecção

natural por *Leishmania braziliensis*. No restante das sequências de roedores (16/84,21%), capturados na área urbana de Timóteo, cinco (31,25%) eram de *Mus musculus* e 11(68,75%) *Rattus rattus*. Nos cinco espécimes de *Mus musculus* coletado na área urbana, foram identificadas as espécies *Leishmania amazonensis*, em um espécime, e *Leishmania braziliensis* em quatro espécimes. Nos 11 *Rattus rattus* coletados as espécies identificadas foram um com *Leishmania amazonensis*, um com *Leishmania infantum* e 9 espécimes com *Leishmania brasizliensis*.

A presença da ordem Didelphimorphia no ciclo de vida da *Leishmania* é comprovada (Brasil, 20014), estudo como o desenvolvido por Brandão-Filho *et al.* (2003), no estado do Pernambuco, verificando infecção por *Leishmania braziliensis* por meio de análises moleculares e a presença de amastigota em esfregaço de tecido coletados de marsupiais do gênero *Marmosa* sp. Essas informações somadas às obtidas no presente estudo sugerem que *Marmosa (Micoureus) paraguayana* tenha um papel importante na manutenção do ciclo de transmissão do agente da leishmaniose tegumentar na área silvestre do PERD.

Assim como *Marmosa (Micoureus) paraguayana* a infecção natural encontrada em roedores silvestre como *Akodon cursor* é também indicativo da participação do roedor no ciclo de transmissão do agente da leishmaniose tegumentar na área silvestre do PERD, essa hipótese ganha força quando é observado os estudos de Brandão-Filho *et al.* (2003) e Nardi (2010) onde os autores sugerem o gênero *Akodon* como possível reservatório de *Leishmania*, uma vez que os mesmos encontraram espécies do gênero *Akodon* com infecção natural por *Leishmania* spp.

E interessante observar a presença da espécie *Mus musculus* com infecção natural. Estudos como os de Melo (2008), Helhazar *et al.* (2013) e Parhizkari *et al.* (2011) onde os autores verificaram a presença de *Leishmania* spp. apoiam os resultados obtidos no presente estudo. É de grande relevância esses relatos uma vez que *Mus musculus* é uma espécie constantemente encontrada nos mais diversos ambientes e por se tratar de um roedor sinantrópicos.

Outra espécie que pode ser muito importante no cenário da leishmaniose na área urbana é o roedor *Rattu rattus*, assim como *Mus musculus*, é uma espécie sinantrópica e que no presente trabalho foi identificado com infecção natural por três

espécies diferentes de *Leishmania* (*Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis*, e *Leishmania braziliensis*). A espécie *Rattus rattus* já foi encontrada com infecção natural por *Leishmania infantum*, no estudo realizado por Quaresma (2011) foi observado a infecção por meio de métodos moleculares em *Rattus rattus* coletado em área peridomiciliar, na região norte de Minas Gerais. Já Oliveira *et al.* (2005) em estudo realizado em área endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral, na região do Vale do Jequitinhonha no estado de Minas Gerais, identificou presença de *Leishmania braziliensis* em *Rattus rattus*.

Apesar da participação efetiva de *Mus musculus* e *Rattus rattus*, enquanto reservatório no ciclo de transmissão da *Leishmania* não ser comprovadas, as informações aqui apresentada, somada as observações relatadas na literatura sugerem que os roedores tenham um papel importante na manutenção do ciclo de transmissão dos agentes das leishmanioses. O grande número de roedores das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus* com infecção natural por *Leishmania* spp., e a presença de três espécies diferentes de *Leishmania* identificadas nos roedores fortalecem a sugestão da participação de roedores no ciclo de vida da *Leishmania* spp. no município.

Além das análises das sequências determinando as espécies de *Leishmania* presentes nos animais sinantrópicos e silvestres, foram identificadas sequências de infecção natural em 49 fêmeas de flebotomíneo, dessas apenas duas (4,08%) *Pressatia choti* foram coletadas no PERD, com infecção por *Leishmania braziliensis*. Os demais espécimes foram todos coletados na área urbana, sendo que 45 (91,84%) foram identificadas com *Leishmania braziliensis*. *Nyssomyia whitmani* (n=35) foi a espécie com maior número de fêmeas infectadas naturalmente com *Leishmania braziliensis*, seguida de *Nyssomyia intermedia* (n=6). Ainda na área urbana foi identificado um espécime de *Migonemyia migonei* como infecção natural por *Leishmania amazonensis*, e um em espécime de *Nyssomyia intermedia*. A sequência obtida teve 100% de identidade com duas espécies *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis*.

Tabela 7: Identificação das espécies de *Leishmania* spp. presente nos animais coletados, segundo área de coleta, Timóteo-MG, 2012-2014

Espécie de <i>Leishmania</i>	Espécies do Animal	Número de amostras coletadas					
		Área urbana	%	PERD	%	Total	%
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Cães	27	30,00	0	0,00	27	27,55
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Nyssomyia intermedia</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>Migonemyia migonei</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Micropygomyia quinquefer</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Lutzomyia</i> sp.	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Pressatia choti</i>	0	0,00	2	25,00	2	2,04
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Evandromyia sallesi</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Migonemyia migonei</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Nyssomyia whitmani</i>	35	38,89	0	0,00	35	35,71
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Nyssomyia intermedia</i>	6	6,67	0	0,00	6	6,12
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Marmosa (Micoureus) paraguayana</i>	0	0,00	3	37,50	3	3,06
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Calomys cerqueirai</i>	0	0,00	1	12,50	1	1,02
<i>L. (L.) amazonenses</i>	<i>Mus musculus</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (L.) amazonenses</i>	<i>Rattus rattus</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	<i>Rattus rattus</i>	1	1,11	0	0,00	1	1,02
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Akodon cursor</i>	0	0,00	1	12,50	1	1,02
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Rattus rattus</i>	8	8,89	1	12,50	9	9,18
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	<i>Mus musculus</i>	5	5,56	0	12,50	5	5,10
Total		90	100,00	8	100,00	98	100,00

Pressatia choti foi a espécie predominante entre as capturadas na área silvestre (PERD), a única verificada com infecção por *Leishmania braziliensis*. Diferentemente do presente estudo Oliveira-Pereira *et al.* (2006), analisando 170 fêmeas coletadas no Maranhão não observou infecção por *Leishmania*. Essa espécie não se encontra entre as espécies vetoras de *Leishmania*, porém, foi espécie predominante entre as espécies coletadas no PERD (19,12%) e foi a única espécie de flebotomíneo coletada no PERD com infecção natural para *Leishmania braziliensis*. Esses achados levantam a hipótese que a espécie *Pressatia choti*, possa participar como vetor de *Leishmania braziliensis* no PERD.

Os resultados obtidos da *Nyssomyia intermedia*, encontrada na área urbana demonstrando 100% de identidade com *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis*, devem ser tratados com cautela, uma vez que a região encontrada não pertence à região de distribuição geográfica dessas espécie, como verificado por Brazil *et al.* (2015), outro fator é o vetor, onde *Nyssomyia intermedia* não se encontra entre os possíveis vetores de *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis* (Brazil *et al.*, 2015). Outro fator que ajuda a explicar tal resultado está no estudo de filogenético, onde foi observada uma aproximação muito grande entre a identidade dessas espécies. Sendo assim, há uma necessidade de estudos que possam evidenciar melhor a presença dessas espécies na região de Timóteo, com possibilidade ate mesmo de registro de uma nova espécie.

Além das espécies de roedores (*Rattus rattus* e *Mus musculus*) identificados com infecção natural por *Leishmania amazonensis* coletados na área urbana do município, foi observado também um espécime de *Migonemyia migonei* com infecção natural por *Leishmania amazonensis* e coletado na área urbana. É importante que se esclareça que esse é o primeiro relato de *Migonemyia migonei* com infecção natural por *Leishmania amazonensis*. Em experimentos realizados em laboratório por Nieves e Pimenta (2000) verificaram que é possível a infecção natural por *Leishmania amazonensis* em *Migonemyia migonei*. Portanto, o presente estudo sugere que a *Leishmania amazonensis* possa também ser um possível agente da leishmaniose no município de Timóteo, tendo como possíveis reservatórios roedores.

Nas análises das sequências obtidas a partir do estudo de infecção natural por *Leishmania* spp. observou-se que no município de Timóteo há pelo menos três espécies de *Leishmania* spp. com possibilidade de manutenção do ciclo de vida, podendo ter participação direta nos caso de leishmaniose tanto na área urbana quanto na área silvestre (PERD) do município, porém com um possibilidade de diferentes vetores entre as duas áreas.

5.5 Estudo de fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneo alimentadas

As análises de fonte alimentar, desenvolvidas no presente estudo, tiveram como principal objetivo indicar os possíveis reservatórios de *Leishmania* spp., ou pelo menos indicar as espécie que ajudam a manter o ciclo de vida dos vetores. Com esse intuito foram realizados a PCR para amplificação do gene CyT B em 44 fêmeas de flebotomíneos alimentadas (Tabela 8), 39 (88,6%) foram coletadas na área urbana e 5 (11,4%) no PERD. Após o sequenciamento e as análise de identidade realizadas junto ao Genbank foram verificados material amplificado de seis espécies diferentes, sendo uma espécie de ave *Gallus gallus* (Galinha) e as outras cinco espécies de mamíferos: *Dasyprocta leporina* (Cutia), *Dasypus novemcinctus* (Tatu), *Sphiggurus villosus* (Ouriço), *Sus scrofa* (Porco) e *Homo sapiens*.

Entre os espécimes de fêmeas de flebotomíneo coletadas no PERD, com fonte alimentar identificada de *Dasyprocta leporina*, *Dasypus novemcinctus*, *Sphiggurus villosus* e *Homo sapiens*, apenas a fêmea de flebotomíneo com sangue de *Homo sapiens*, não foi coletada na área interna do PERD, essa fêmea de flebotomíneo foi identificada como *Nyssomyia intermedia*, coletada próxima a borda da mata, a uma distância de 300 metros, as outras foram coletadas em áreas mais internas, com distância acima de 1.000 metros da mata. É interessante informar que a borda da mata é uma área próxima a residências e a presença de seres humanos é intensa, isso justifica a identificação de fonte alimentar em fêmea de *Nyssomyia intermedia* como *Homo sapiens*.

Dasyprocta leporina foi identificado em DNA de sangue presente em fêmeas de *Pressatia choti*, enquanto *Dasypus novemcinctus* e *Sphiggurus villosus* foram

identificadas em sangue de fêmeas de *Psychodopygus davisii*. Essa espécie de flebotomíneos não são consideradas vetoras de *Leishmania* spp. Porém não se pode desprezar a hipótese dos mamíferos identificados no repasso sanguíneos de *Pressatia choti* e *Psychodopygus davisii* serem possíveis reservatórios de *Leishmania* spp. no PERD. Um exemplo são os relatos de Lainson *et al.*, (1981) com estudo desenvolvido no estado do Pará, relatando a presença de infecção natural em amostras de vísceras de *Dasypus novemcinctus*. Paiz *et al.* (2015) realizando estudo em Botucatu estado de São Paulo, em análise sorológica detectou anticorpos anti-*Leishmania* spp. em *Sphiggurus villosus*.

Em relação às 39 fêmeas de flebotomíneos alimentadas coletadas na área urbana do município, foi identificado fonte alimentar por *Homo sapiens* (n=6/15,4%), *Gallus gallus* (n=22/56,4%) e *Sus scrofa* (n=11/28,2%), as quatro espécies de fêmeas de flebotomíneo todas já forma incriminadas como vetores.

A presença de fonte alimentar por *Homo sapiens* deve ser vista com normalidade, uma vez que as fêmeas de flebotomíneo alimentadas foram coletadas na área urbana. Esses dados também foram verificados nos estudos realizados por Silva (2008) observando fonte alimentar de fêmeas de flebotomíneos coletadas na cidade de São Gonçalo-RN, o mesmo verificou que 100% das fêmeas apresentaram fonte alimentar por sangue de *Homo sapiens*. Outro estudo que apresentou proporção alta de fonte alimentar em humanos foi o estudo desenvolvido por Lopes (2014), também estudando fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, verificou que 67,9% das fêmeas alimentadas apresentaram fonte alimentar por *Homo sapiens*. Já no estudo de Fonteles *et al.*, (2009) empregando teste da reação da precipitina em fêmeas de *Nyssomyia whitmani* verificou fonte alimentar uma proporção de 12,7% em humanos. No presente trabalho os estudos indicam uma menor proporção de *Homo sapiens* em relação à *Gallus gallus* (z=4,276 p<0,0001) e *Sus scrofa* (z=1,715 p<0,05).

O papel das aves na epidemiologia das leishmanioses tem sido bastante discutido, mesmo sendo consideradas refratárias à infecção por *Leishmania* spp. (Dias *et al.*, 2003), estudos de fonte alimentar demonstram a participação mesmo que indireta de *Gallus gallus* no ciclo da *Leishmania* spp. Como demonstrado no estudo de Tanure *et al.*, (2015) no município de Governador Valadares,

empregando ensaio imunoenzimático verificou a fonte alimentar por *Gallus gallus* em 43,6% das amostras. Lopes (2014) também relatou fonte alimentar em *Gallus gallus* (25% das amostras) nos seus estudos. Em relação a *Sus scrofa* também foi verificada nos estudos de Baum *et al.* (2015), utilizando análises moleculares para verificar fonte alimentar em fêmeas de *Nyssomyia intermedia* coletadas no estado do Paraná. O papel de *Gallus gallus* e *Sus scrofa* mesmo que não comprovado como reservatórios de *Leishmania* spp. são importantes, uma vez que, essas espécies ajudam a manter o ciclo vida dos flebotomíneos na área urbana. Os resultados obtidos de fonte de infecção são essenciais para auxiliar a adoção de medidas mais eficazes de prevenção e controles das leishmanioses.

Tabela 8: Resultado da identificação de fonte alimentar em fêmeas de flebotomíneo naturalmente alimentadas coletadas no município de Timóteo-MG, 2012-2014

Flebotomíneo	Fonte alimentar	Número de amostras					
		Área urbana	%	PERD	%	Total	%
<i>Pressatia choti</i>	<i>Dasyprocta leporina</i>	-	-	1	20.0	1	2.3
	<i>Dasyprocta</i>						
<i>Psychodopygus davisii</i>	<i>novemcinctus</i>	-	-	1	20.0	1	2.3
<i>Psychodopygus davisii</i>	<i>Sphiggurus villosus</i>	-	-	1	20.0	1	2.3
<i>Pintomyia fischeri</i>	<i>Gallus gallus</i>	1	2.6	-	-	1	2.3
<i>Nyssomyia intermedia</i>	<i>Homo sapiens</i>	2	5.1	2	40.0	4	9.1
<i>Nyssomyia intermedia</i>	<i>Gallus gallus</i>	4	10.3	-	-	4	9.1
<i>Nyssomyia intermedia</i>	<i>Sus scrofa</i>	2	5.1	-	-	2	4.5
<i>Migonemyia migonei</i>	<i>Gallus gallus</i>	7	17.9	-	-	7	15.9
<i>Nyssomyia whitmani</i>	<i>Homo sapiens</i>	4	10.3	-	-	4	9.1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	<i>Gallus gallus</i>	10	25.6	-	-	10	22.7
<i>Nyssomyia whitmani</i>	<i>Sus scrofa</i>	9	23.1	-	-	9	20.5
Total		39	100,0	5	100,0	44	100,0

6 CONCLUSÕES

Com a realização do estudo foi possível identificar a presença de quatro espécies de *Leishmania* no município, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonenses*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania infantum*, sendo *Leishmania braziliensis* possivelmente a principal responsável pelos casos de LTA na região, um vez que essa espécie foi identificada nas mais diversas amostras coletadas.

O grande número de *Pressatia choti* e *Psychodopygus davis* na área silvestre (PERD), somado a presença de *Leishmania braziliensis* em *Pressatia choti* sugere uma possível participação dessas espécies no ciclo da *Leishmania* na área do PERD. Enquanto na área urbana o grande número de *Nissomyia whitmani*, associado a infecção natural por *Leishmania braziliensis* fazem dessa o principal vetor no município.

Foi relatado o primeiro registro de infecção natural por *Leishmania braziliensis* em *Pressatia choti*.

A presença de *Rattus rattus* e *mus musculus* com infecção natural por *Leishmania braziliensis* fazem desses roedores prováveis reservatórios na área urbana, porém são necessários mais estudos que confirmem sua eficiência e capacidade enquanto reservatório de *Leishmania* spp.

Foi observado o primeiro registro de infecção natural por *Leishmania braziliensis* em *Calomys cerqueirai*.

Em relação ao PERD ficou evidente a participação de espécies já reconhecidas como reservatórios, como exemplo os marsupiais.

Foi descrito o primeiro registro de *Rattus rattus*, *mus musculus* e *Migonemyia migonei* com infecção natural por *Leishmania amazonensis*.

Foi observado presença de infecção por *Leishmania braziliensis* em cães da região urbana de Timóteo.

O encontro de flebotomíneos tendo como fonte alimentar *Gallus gallus* mostram que, mesmo sendo aves uma espécie refrataria, são fundamentais para manter a proliferação dos vetores na área urbana.

Em relação a presença de *Sus scrofa* como fonte alimentar, deve ser dada uma atenção especial, o qual são necessários mais estudos para entender melhor o papel dessa espécie no contexto das leishmanioses.

Esses resultados auxiliam o serviço de vigilância em saúde do município de Timóteo na adoção de medidas mais eficazes, auxiliando na prevenção e no controle da LTA no município, como por exemplo, a priorização das regiões onde houve maior registro de flebotomíneos vetores e intensificar as campanhas preventivas junto ao PERD e às residências do entorno do parque.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos no Brasil, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p.207-256.
- Aguiar GM, Vilela ML, Lima RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Food preferences (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82(4):583-584.
- Aguilar CM, Rangel EF, Deane LM. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81(4):471-472.
- Andrade AJ, Shimabukuro PHF, Galati EAB. On the taxonomic status of *Phlebotomus breviductus* Barretto, 1950 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Zootaxa. 2013; 3734(4): 477-484.
- Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *Ny. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Ny. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(4):481-487.
- Andrade Filho JD, Lima MLN, Falcão AL, Brazil RP. Sazonalidade dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) dos arredores da Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Entomologia. 1998; 42(3/4):93-95.
- Arias JR, Naiff RD. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia : Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. Transactions Royal Soc Tropical Med & Hyg. 1981; 75(4):537-541.
- Ashford RW. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitology. 2000; 30(12/13):1269-1281.

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley. 2003. p.4755
- Baum M, Castro EA, Pinto MC, Goulart TM, Bauraa W, Klisiowicz DR, Costa-Ribeiro MCIV. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica*. 2015; 143:8-12.
- Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Perez-Montfort R, Becker, I, Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania Mexicana*. *Parasitology Research*. 2002; 88:918-925.
- Bonvicino CR, De Oliveira JA, Gentile R. A new species of *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Eastern Brazil. *Zootaxa*. 2010; 2336:19–25.
- Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea, PS. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos, Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS. 2008. p.120.
- Bonvicino CR. Diversidade cariotípica em roedores Akodontini do Brasil. *Boletim Soc Bras Mastozologia*. 2011; 62:7–11.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97: 291-6.
- Brasil. Guia de vigilância epidemiológica. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed. Brasília-DF. 2009. p.816.
- Brasil. Leishmaniose tegumentar americana. Ministério da Saúde. 2015. [Acesso em 20 ago 2015]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>

- Brasil. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypti* (LIRAA) para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis - Brasília: Ministério da Saúde. 2013. p.84.
- Brasil. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2ª ed. Brasília-DF. 2007. p.182.
- Brasil. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2ª ed. Brasília-DF. 2010. p.816.
- Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1ª ed. Brasília-DF. 2006. p.120.
- Brasil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1ª ed. 5ª reimpressão. Brasília-DF. 2014. p.120.
- Brazil RP, Brazil BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. p.257-274
- Brazil RP, Brazil BG. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmaniose do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. p.193-200.
- Brazil RP, Nascimento MDSB, Macau, RP. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82 (1):145.
- Brazil RP, Rodrigues AF, Andrade Filho JD. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. Entomol Ornithol Herpetol. 2015; 4:144

- Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM, Canine visceral *Leishmaniasis* in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. Ver Inst Med Tropical São Paulo. 2003; 45(2):79-83.
- Carini A, Paranhos U. Identification de "l'ulcera de Bauru" avec le Bouton d'Orient. Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique. 1909; 2: 255-257.
- Carvalho GM, Andrade Filho JD, Falcao AL, Rocha Lima AC, Gontijo CM. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a Leishmania-Endemic Area of Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8(3):407-14
- CDC. Leishmaniasis. Centers for Disease Control and Prevention. 2015. [Acesso em 20 ago 2015]. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/>
- Chance ML. The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. In: Chang/Gray (eds) Elsevier Science Publishing Company, USA. 1935. p.93-110.
- Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Moreira ND *et al.* Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. PLoS One. 2014; 9(3):e91009.
- Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saraiva N, Fernandes O. Leishmania (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. Experimental Parasitology. 2004; 108:59-66.
- Cupolillo E, Schoenian G, Kuhls K, Auwera GV, Mauricio I, Cruz I. Manual Molecular Procedures: Training course, molecular epidemiology end leishmaniasis. Leishmaniasis Epidemiology Network South America. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2009.
- Cupolillo E, Grimaldi GJR, Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50:296-311.

- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A *et al.* Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol. 2003; 41(7):3126-32.
- Cupolillo E. Avanço dos estudos moleculares de Leishmania (*Leishmania*) chagasi aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. 2005. p.57-62,
- Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. Parasites & Vectors. 2009; 2(Suppl 1): doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S1
- Dantas-Torres, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Veterinary Parasitology. 2007; 49:139–146
- Dávila AMR, Momen, H. Internal transcribed spacer sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. Annals Trop Med and Parasitology. 2000; 94:651-654.
- Deane LM, Deane MP. Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no Noroeste do estado do Ceará. Ver Bras Malariologia Doenças Trop. 1957; 9(2):225-246.
- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2004; 27(5):305-318.
- Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Paula, KM, Gonçalves CM, Barata RA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(1):49-52.
- Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). Cadernos de Saúde Pública. 2003; 19(5):1373-1380.

- Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz Saude. 2012; 3(2):47-57.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39:783-791.
- Ferreira AL, Sessa PA, Varejão JBM, Falqueto A. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96:1061-1067.
- Ferreira EC, Cruz I, Cañavate C, de Melo LA, Pereira AA, Madeira FA, Valério SA, Cunha HM, Paglia AP, Gontijo CM. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. BMC Veterinary Research. 2015; 11:71
- Ferreira ME, Neto CRB. Importância da Pesquisa Genômica e do Seqüenciamento de DNA. Comunicado Técnico 91. Embrapa: 1ª edição. 2003
- Ferro C, Prado R, Torres ME, Morrison AC. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral Leishmaniasis in Colombia. Journal of Medical Entomology. 1997; 34(6):719-728.
- Figueiredo FB, Madeira MF. Os Parasitos e a questão da infecção em animais domésticos e domiciliados. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmaniose do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. p.259-273.
- Fonteles RS, Costa e Vasconcelos G, Azevêdo PCB, Lopes GN, Moraes JLP, Lorosa ES, Kuppinger O, Rebêlo JMM. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(6):647-650

- FUNASA. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998. Fundação Nacional De Saúde. Boletim Epidemiológico: Ed. Especial. 1999.
- Furtado I, Aleixo J, Lopes CF. Surto de Leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. O Hospital. 1966; 70:259-266.
- Galati EAB. Morfologia e taxonomia. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. p.23-206.
- Garcia FCB, Santos SSR, Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de *Leishmania* em amostras cutâneo-mucosas. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2005. 80(3):340-345.
- Gil LHS, Basano SA, Souza AA, Silva, MGS, Barata I, Ishikawa E, Shaw J. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davis* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98:751-5.
- Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana: 1- Estudo experimental da frequência de flebotomíneos a ecótopos artificiais com referência especial a *Psychodopygus intermedius*. Rev Saúde Pública. 1980; 14: 540-56.
- Gonçalves BS. Dissertação: Leishmaniose visceral canina na área urbana de Cuiabá-MT: comparação de técnicas laboratoriais, tentativa de desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico e caracterização da espécie de leishmania circulante em amostra selecionada. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Departamento de Ciências Biológicas. 2010. p.125.
- Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MB, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of

cutaneous Leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*. 2002, 81(2):143-150.

Guimarães VCFV, Costa PL, S FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AIF, Rodrigues EHG, Brandão-Filho SP. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45:66-70.

Helhazar M, Leitão J, Duarte A, Tavares L, Fonseca IP. Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal. *Parasites & Vectors*. 2013; 6:88.

Hermeto MV, Vieira-Dias D, Genaro O, Rotondo-Silva A, Da Costa CA, Toledo VP, Michalick MS, Williams P, Mayrink W. Outbreak of cutaneous Leishmaniasis in the Rio Doce Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89(4):519-521.

IEF. Áreas Protegidas. Instituto Estadual de Florestas. 2015. [Acesso em 20 ago 2015]. Disponível em <http://www.ief.mg.gov.br/>

INMET. Estações Automáticas. Instituto Nacional de Meteorologia. 2012. [Acesso em 10 set 2012] Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>

Jansen AM, D'Andrea PS, Roque ALR, Rocha FL, Fernandes FA, Gomes F, Faria MB, Araújo VAL. Estudo da prevalência e perfis de infecção por *Leishmania* sp, em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC. *Laboratório de Referência em Taxonomia e Diagnóstico de Reservatórios Silvestres das Leishmanioses/IOC-Fiocruz*. 2010. p.28

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1980; 16:111-120.

- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G. Comparative microsatellite typing of new world leishmaniainfantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. PLoSNegl Trop. 2011. 5(6):e1155.
- Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981; 75(4):530-6.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in biology and medicine. Academic Press. London. 1987; 1:1-120.
- Lainson R, Shaw JJ. New world Leishmaniasis: The Neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9^a Ed. London: Arnold. 1988. p. 241-66.
- Lainson R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. Revista Paraense de Medicina. 1997; 11: 29-40.
- Laurenti MD, Santana Leandro Jr MV, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, Silva RM, Marcondes M, Da Mata VLR. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 2014; 205:444–450.
- Laveran A. Leishmanioses. Kala – Azar. Bouton d'orient. Leishmaniose Américaine. Masson et Cie. Paris. 1917. p.521.
- Leça Júnior NF, Guedes PEB, Santana LN, Almeida VA, Carvalho FS, Albuquerque GR, Wenceslau AA, Munhoz AD, Silva FL. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. Acta Trop. 2015; 148:115-9.
- Lindenberg A. Lúlcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 1909; 2: 252-4.

- Lopes JV. Dissertação. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Centro de Pesquisas René Rachou. FIOCRUZ. 2014. p.108.
- Madeira MF, Uchoa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, SERRA CMB. *Leishmania (viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. Rev Soc Bras Med Trop. 2003, 36(5):551-555.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 2004; 125(3/4):251–262.
- Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomol News. 2007; 118(4):351–356.
- Moreira J. Existe na Bahia o botão de Biskra?. Gazeta Médica da Bahia. 1985; 254-6.
- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva RA, Oliveira ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and Leishmania Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. Journal Med Entomology. 2010; 47(6):1212-1219.
- Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais, Rev Bras Malariologia e Doenças Trop. 1956; 8(4):577-581.
- Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil. Ver Soc Bras Med Trop. 1998; 31(4):339-345.

- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Da Costa CA, Falcão AR, Melo, M,N, Falcão AL. Epidemiology of dermal *Leishmaniasis* in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Annals Trop Med Parasitology*. 1979; 73(2):123-137.
- Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Journal Med Biol Research*. 2002; 35(4):421-424.
- Melo LA. Dissertação: Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte-MG. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou. 2008. p.90.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PF, Secundino NF, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002; 44: 255-259.
- Nardi MS. Tese: Pesquisa de *Leishmania* sp, em flebótomos e mamíferos silvestres de fragmentos florestais na região do Pontal do Paranapanema-SP. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Experimental Aplicada às Zoonoses. 2010. p.63.
- Nascimento AAC, Espreafico EM, Larson MLP, MonesiN, Rossi NMM, Rodrigues V. Tecnologia do DNA recombinante. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. 1999. p.85.
- Neitzke-Abreu HC, Reinhold-Castro KR, Venazzi MS, Scodro RBL, Dias-Sversutti AC, Silveira TGV, Teodoro U, Lonardoní MVC. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) in *Ny. neivai* and *Ny. whitmani* by Multiplex Polymerase Chain Reaction, in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop de São Paulo*. 2014; 56(5): 391–395.

- Nery-Guimarães F, Damasceno R, Azevedo M, Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1968; 66(2):151-168.
- Nicoll C. Isolament et culture des corps de Leishman. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis. 1908; 3:55-56.
- Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei*(Diptera:Psychodidae). Journal of Medical Entomology. 2000; 37(1):134-140.
- Novy FG, McNeal WJ. The cultivation of *Trypanosoma brucei*: A preliminary note. The Journal of the American Medical Association. 1903; 41:1266-1268.
- Noyes HA, Belli AA, Maingon R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55(1):98-105.
- Oliveira EF. Tese. Capacidade vetorial de *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum*. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo. 2015. p.201.
- Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol. 2005; 129:219-227.
- Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39:540-3.
- Paiva BR, Oliveira AG, Dorval ME, Galati EA, Malafronte RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Acta Tropica. 2010; 115(1-2):126-130.

- Paiz LM, Fornazari F, Menozzi BD, Oliveira GC, Coiro CJ, Teixeira CR, Campanucci da Silva VM, Donalisio MR, Langoni H. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015; 15(11). DOI: 10.1089/vbz.2015.1806.
- Parhizkari M, Motazedian MH, Asqari Q, Mehrabani D. The PCR-based detection of *Leishmania major* in *Mus musculus* and other rodents caught in southern Iran: a guide to sample selection. *Annals Tropical Med Parasitology.* 2011; 105(4):319–323.
- Pennisi MG. Case report of Leishmaniasis in four cats. *Veterinary Research Communications.* 2004; 28(1):363-366.
- Pessôa SB, Martins AV. *Parasitologia Médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982. p.872.
- Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN. Interação *Leishmania* hospedeiro invertebrado. In: Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. p.257-274.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Figueiredo Barbosa AF, Britto CC. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 2005; 99(12):905-913.
- Pogue GP, Koul S, Lee NS, Dwyer DM, Nakhasi HL. Identification of intra- and interspecific *Leishmania* genetic polymorphisms by arbitrary primed polymerase chain reactions and use of polymorphic DNA to identify differentially regulated genes. *Parasitol Res.* 1995; 81(4):282-290.
- Quaresma PF, Murta SM, Ferreira EC, Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral *Leishmaniasis*: Identification of

Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 2009; 111(3):289-294.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CM. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(10):579-85.

Rangel EF, Lainson R. Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. p.257-274.

Rangel, EF,; Souza, N,A,; Wermelinger, E,D,; Azevedo, A,C,R,; Barbosa, A,F,; Andrade, C,A, *Flebótomos de Vargem Grande, Foco de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v, 81, n, 3,p, 347-349, 1986,

Reithinger R, Bronwen E, Lambson, Douglas C, Barker, e Clive R, Davies, Use of PCR To Detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Dog Blood and Bone Marrow, *J Clin Microbiol*, 2000 Feb; 38 (2): 748-751,

Rey L. *Parasitologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p.856.

Roque ALR, Jansen AM. Hospedeiros e Reservatórios de *Leishmania* sp. e sua importância na Manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestres e sinantropicos. In: Conceição-Silva F, Alves CR. *Leishmaniose do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. p.233-257

Roselino AM. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2008; 83(3):187-203.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal*. 1903; 2:1261-1262.

- Rotureau B, Ravel CL, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet J P, Carme B. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 2006; 44:459-467.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salomon OD, Orellano PW, LAMFRI M. Phlebotominae spatial distribution associated with a focus of tegumentary leishmaniasis in Las Lomitas, Formosa, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 101(3):295-299, 2002,
- Sanguinette CC. Tese: Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: Estudo dos flebotomíneos e da leishmaniose canina. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte. 2011. p.160.
- Santiago ME, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VM. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet Parasitol*. 2007; 150(4):283-90.
- Santos RV, Coimbra JRCEA. Saúde e Povos Indígenas Rio de Janeiro: 1994, Ed. FIOCRUZ. 1994. p.251.
- Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, Carvalho DA, Souza CM, Freitas CR, Lopes CRG, Moreno EC, Melo MN. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral Leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Tropica*. 2011; 117(2):137-145.
- Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(8):1033-1039.

- Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresma PF, Lima ACVMR, Falcão AL, Andrade Filho JD. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2009; 46(5):1159-1163.
- Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(1):56-63.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microb Infec Disease*. 2003; 47(1):349–358.
- Schönian G, Schnur L, El Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, Presber W. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001; 95(2):217-24.
- Sherlock IA, Miranda, JC, Sadigursky M, Grimaldi Júnior, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984; 79(4):511.
- Silva VPM. Dissertação. Preferencia alimentar e identificação das principais fontes de repasto sanguíneo de fêmeas *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas endêmicas para leishmaniose visceral na Grande Natal. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica. 2008. p.63.
- Silveira FT, Lainson R, Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, Souza AAA, Silva BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*, Belém: Editora CEJUP; 1997.
- Silveira FT, Lainson R, Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, Souza AAA, Silva BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*, Belém: Editora CEJUP. 1997. p.885.

- Soares MJV, Moraes, JRE, Roselino AMF. Polymerase chain reaction in detecting *Leishmania* sp in symptomatic and asymptomatic seropositive dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Trop Diseases*. 2005; 11(4):532-539.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine *Leishmaniasis* endemicity using PCR on several tissues and serology, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(2):560-563.
- Souza AI, Feline *Leishmaniasis* due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2005; 128(1-2):41-45.
- Souza CF, Borges, MAZ, Andrade AJ. Contribution to the Knowledge of the Phlebotomine Sand Flies Fauna (Diptera: Psychodidae) of Timóteo Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology*. 2009; 38(2):267-271.
- Souza CF, Quaresma PF, Andrade Filho JD, Bevilacqua PD. Phlebotomine fauna in the urban area of Timóteo, State of Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*. 2014; 134: 72-79.
- Souza CF. Dissertação: Estudo da Urbanização de flebotomíneos e aspectos epidemiológicos de leishmaniose tegumentar americana no município de Timóteo, Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. 2011. p.101.
- Splendore A. Leishmaniosi con localizzazione nelle cavità mucosa (nuova forma clinica). *Bulletin of Société Pathologie Exotique*. 1912; 5(6): 411-38.
- Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol Res*. 2005; 97: 247-254. Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 2013; 30: 2725-2729.

- Tanure A, Peixoto JC, Afonso MMS, Duarte R, Pinheiro AC, Coelho, SVB, Barata RA. Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015; 57(4): 321-324.
- Tolezano JE. Eco-epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89:427-434.
- Velasquez LG, Membrive N, Membrive U, Rodrigues G, Reis N, Lonardon MVC, Teodoro U, Tessmann IPB, Silveira TGV. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2006; 22(3):571-578.
- Verma N, Tripathi SK, Sahu D, Das HR, Das RH. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. *Mol Cell Biochem*. 2010; 336:127-135.
- Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota preliminar). *Brazil Médico*. 1911; 25: 411.
- WHO. Control of the *Leishmaniasis*: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of *Leishmaniasis*. World Health Organization. WHO Technical Report Series. 2010; 949: 22-26.
- WHO. Leishmaniasis. World Health Organization. 2015. [Acesso em 20 ago 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
- Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infect Diseases*. 2004; 4(6):337-348.
- Young DG, Duncan M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. 2004. p.881

ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Museu de Ciências Naturais

MCN/CA-169/2012

Belo Horizonte, 05 de junho de 2012

Ao Órgão Ambiental Competente

CARTA DE ACEITE

O Museu de Ciências Naturais PUC Minas manifesta o interesse em receber exemplares da Mastofauna provenientes do projeto: Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, coordenado pelo biólogo José Dilermando Andrade Filho CRBio: 13789/04-D.

Os laboratórios do Museu de Ciências Naturais PUC Minas encontram-se plenamente capacitados a receber o referido material sob condições satisfatórias de armazenamento e consulta. Todos os espécimes depositados nesta instituição estarão à disposição de pesquisadores.

Informamos que as normas dos laboratórios do Museu para recebimento dos exemplares são: os exemplares da Mastofauna deverão ser entregues com a pele taxidermizada e o esqueleto congelado; todo material biológico deve ser acompanhado de planilha constando data de coleta, local (incluindo município, localidade e coordenadas geográficas em graus, minutos e segundos) coletor e cópia da licença do Órgão Ambiental Competente.

Solicitamos que caso nenhum material testemunho for coletado gentileza comunicar aos curadores das coleções.

Atenciosamente,


Cláudia Guimarães Costa
(CRBio 16152/4D)


Prof. Bonifácio José Teixeira
Coordenador

Av. Dom José Gaspar, 290 - Prédio 40 - Coração Eucarístico - CEP 30535-610 - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil
Fone: (31) 3319-4152 Fax: (31) 3319-4983 e-mail: museu@pucminas.br website: www.pucminas.br/museu

ANEXO 2



LICENÇA

LW-65/12

Certificamos que o protocolo (P-91/11-6), intitulado "Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil", sob a responsabilidade de JOSÉ DILERMANDO ANDREDE FILHO, atende ao disposto na Lei 11734/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 27/08/2016 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 160 Machos.
- 160 Fêmeas.

Didelphimorphia

- 186 Machos.
- 186 Fêmeas.

Marsupialia

- 106 Machos.
- 106 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2012

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Marquinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3862.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO 3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 16237-2	Data da Emissão: 28/11/2011 17:38
Dados do titular	
Nome: José Otiliano Andrade Filho	CPF: 835.584.548-34
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIDORUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo realizadas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coleta de dados, material, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passado, obtidas por meio de pesquisas e técnicas que se destinam ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécimes que constam nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) resfriamento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros de sua equipe, bem como dados de expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente NÃO isenta o pesquisador titular da necessidade de obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente NÃO poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou exportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO isenta o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Iama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilamento de Áreas Ilustradas.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelas atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisas nessas unidades de conservação.
9	O titular da licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão coletar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a estabilidade da população do grupo taxonômico de interesse em condições <i>in situ</i> .
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o arquivamento de emissão da licença permanente.
11	O titular da autorização ou da licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação de legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falta descrição de informações relevantes que subsidiarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos de legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião de solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento de legislação que dispõe sobre acesso a componentes do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies transições constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, subespecíficas ou ameaçadas de subespeciação.

Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Reichrodus	Taxonomia
1	FAMILIA	Psychodidae	
2			

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	coleta	tipo destino
1	UMAM - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA/UFVPAIS	coleta	
2	CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIDORUZ	coleta	

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36646273



Página 1/2

ANEXO 4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 33445-1	Data da Emissão: 21/05/2012 17:02
Dados do titular	
Nome: Cristan Ferreira de Souza	CPF: 046.141.046-06
Título do Projeto: Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil	
Nome da Instituição: Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

#	Descrição da atividade	Início (Mês/ano)	Fim (Mês/ano)
1	Captura de pequenos mamíferos (rodentia e marsupiais)	08/2012	07/2014

De acordo com o art. 35 da Lei 11.429/2006, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser renovada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades e ser emitida por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar de data do aniversário de sua emissão.

Observações e ressalvas

- As atividades de campo exercidas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidas por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à preservação, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
- Esta autorização NÃO exonera o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possuidor ou condutor de área dentro dos limites de conservação federal, cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
- Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou exportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas no âmbito do ensino superior.
- A autorização para envio ao exterior de material biológico não coletado deverá ser requerida por meio de endereço eletrônico www.ibama.gov.br/Servicos/online-licenca-para-exportacao ou exportação de fora e fora - CITES e não CITES. Em caso de material coletado, consulte www.ibama.gov.br/ibama - menu, Exportação.
- O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura adequados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
- O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação de legislação vigente, ou quando da inexecução, omissão ou falta descrição de informações relevantes que ocasionarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão fundamentada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
- Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso e compartilhamento do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, preservação e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen.
- Em caso de pesquisas em UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá manter-se em administração de unidade e em de CONPRIMAR AS DADAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

- As armadilhas utilizadas para a captura deverão ser visitadas pelo menos duas vezes ao dia (pele manhã e tarde) para minimizar a morte devido a hipotermia ou hipertermia.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	TIMOTEO	MG	Parque Estadual do Rio Doce	Faixa de UO Federal
2	TIMOTEO	MG	Área Urbana do Município de Timóteo	Faixa de UO Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/tranporte de amostras biológicas in situ	Rodentia, Didelphimorphia

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91914694





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 33445-1		Data da Emissão: 21/05/2012 17:02	
Dados do titular			
Nome: Cristian Ferreira de Souza		CPF: 046.141.046-06	
Título do Projeto: Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil			
Nome da Instituição: Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0012-98	
2 Coléctos/amostra de espécimes de fauna silvestre in situ		Sierotina ("Célula 2")/Sintomologia ("Célula 2")	
* Células de indivíduos por espécie/hospitalidade/instância de conservação, a serem coletados durante um ano.			
Material e métodos			
1 Amostras biológicas (Outros materiais)		Sargues, Fragmento de tecido biológico	
2 Método de captura/coleta (Outros materiais)		Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap"/"armadilha/Sharmaj")	
Destino do material biológico coletado			
#	Nome local destino	Tipo Destino	
1	SOCIEDADE MINERÁ DE CULTURA - PUC/MG	criação	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91914694



Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 33445-1		Data da Emissão: 21/05/2012 17:02	
Dados do titular			
Nome: Cristian Ferreira de Souza		CPF: 046.141.046-06	
Título do Projeto: Estudo da leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil			
Nome da Instituição: Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0012-98	
2 Coléctores/espécies de espécimes de fauna silvestre in situ		Sierotina ("Célula 2") (Sierophormia ("Célula 2"))	
* Células de indivíduos por espécie/familia/idade/idade de conservação, a serem coletados durante um ano.			
Material e métodos			
1 Amostras biológicas (Outros mamíferos)		Sargues. Fragmento de tecido biológico	
2 Método de captura/coleta (Outros mamíferos)		Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Smellawa/Sharmay")	
Destino do material biológico coletado			
#	Nome local destino	Tipo Destino	
1	SOCIEDADE MINERÁ DE CULTURA - PUC/MG	criação	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91914694



Página 2/3



IEF
INSTITUTO ESPECIAL DE FLORESTAS

DIRETORIA DE PESQUISA E PROTEÇÃO À BIODIVERSIDADE
GERÊNCIA DE PROJETOS E PESQUISAS

LICENÇA PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISAS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Nº LICENÇA	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	RESPONSÁVEL PELA UC	ENDEREÇO / CONTATO	ASSINATURA RESPONSÁVEL UC
UC: 05012	Parque Estadual Rio Doce	Vinícius de Assis Moreira periodoeca@ambiente.mg.gov.br	Dist. de Santa Rita Mantida MG CEP: 35.025-000 (31) 3822-3009 (11) 6403-6870	

Esta licença será válida apenas com a autenticação do responsável pela(s) Unidade(s) de Conservação.

- PERÍODO DE VALIDADE: Junho de 2012 a Junho de 2013.
- TÍTULO DO PROJETO: "Estudo de leishmaniose tegumentar americana na região urbana do município de Timóteo e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil".
- RESPONSÁVEL PELO PROJETO: Cristian Ferreira de Souza.
- ORIENTADOR: José Dilemmando Andrade Filho.
- INSTITUIÇÃO: Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz.
- ENDEREÇO: Rua Café Filho, 864 Bairro São José Timóteo MG CEP: 35180-000
- CONTATO: (31) 3847-3668 (31) 87762932 E-mail: bloominas2004@yahoo.com.br

OBSERVAÇÕES: Esta licença autoriza captura e coleta de 2(dois) indivíduos por espécie de pequenos mamíferos (rodentídeos e marsupiais). Coleta de amostras biológicas.

1- Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Estadual, o pesquisador deverá contactar a administração desta unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das experiências, as condições para realização das coletas e de uso do infra-estrutura da unidade.
 2- O Instituto Estadual de Florestas não se responsabiliza por qualquer dano a equipamentos, acidentes ou lesões físicas ou psicológicas dentro da UC, estando atenta, o pesquisador responsável e sua equipe quanto da vulnerabilidade da área de realização da pesquisa.
 3- Esta autorização não exclui o titular e a sua equipe da necessidade de obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais, bem como do comprometimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
 4- O projeto poderá ser cancelado pelo órgão, caso o executor não atenda as normas exigidas para controle das pesquisas.
 5- Fica a Licença em vigor desde que o projeto seja concluído, desde que em conformidade com a legislação, o modo próprio possível.
 6- Junto o Termo de Compromisso o responsável pela expedição deverá apresentar relatório final ao término da validade desta licença, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto do presente licença.
 7- Esta licença não autoriza captura/transporte de material biológico nas áreas de influência do empreendimento sujeito ao licenciamento ambiental, conforme resolução da CONAMA de nº 237 de 18/12/97, salvo quando especificado.
 8- Esta licença não autoriza o uso de material biológico para obtenção de produtos genéticos, com ou sem fins de espécie vegetal, fungos, microbiano ou animal, em substâncias germinativas de metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, excetuando-se em condições de uso, inclusive doméstico, de materiais em coleções ex-litu, desde que coletados em condições in situ, de território nacional, de plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com prioridade de uso comercial de acordo com Medida Provisória nº 2.062 de 29 de junho de 2000 e Medida Provisória nº 2.185-10, de 23 de Agosto de 2001.
 9- Válida exclusivamente no estado de Minas Gerais.
 10- Esta licença não autoriza:
 - captura/transporte de espécies ameaçadas de extinção, salvo quando constante de projeto específico aprovado;
 - captura/coleta/transporte de fauna e flora em áreas de domínio privado, sem o consentimento expresso ou tácito do proprietário nos termos dos artigos 694,695,696,697 e 699 do código civil;
 - captura/coleta/transporte de fauna e flora em unidades de conservação federais, estaduais, distritais ou municipais, salvo quando acompanhadas de consentimento do órgão administrador competente;
 11- Válida somente sem anexos ou recursos.

O pesquisador deverá estar sempre acompanhado deste documento, para apresentá-lo às autoridades.

Data de Emissão: Assinatura do responsável pela Licença

14/05/12 

Rua da Administração Terraviva, Centro, Rio de Janeiro - RJ
 Rua da Administração Terraviva, Centro, Rio de Janeiro - RJ
 Tel: (21) 25191322 E-mail: pesquisa.ger@ambiente.mg.gov.br

Parasites & Vectors

The Phlebotomine Sand Flies Fauna in Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil
–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	PARV-D-15-01038
Full Title:	The Phlebotomine Sand Flies Fauna in Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil
Article Type:	Research
Section/Category:	Dipteran Vectors and Associated Disease
Funding Information:	
Abstract:	<p>Background: Phlebotomine sand flies are dipterans of the family Phlebotomidae. They are very important to veterinary medicine because some species are vectors of infective forms of <i>Leishmania</i> spp., the etiological agents of leishmaniasis. The Parque Estadual do Rio Doce is located in an area with constant reports of cases of leishmaniasis. In order to better understanding the phlebotomine sand fly fauna of the park, the present work was undertaken with the goal of analyzing phlebotomine sand flies collected there, verifying their seasonality and correlating their presence with forest and/or anthropic areas.</p> <p>Methods: To analyze the fauna of phlebotomine sand flies, HP-type, model CDC light traps were distributed along the Juquita trail of PERD. Twelve traps were installed between September 2012 and February 2014, and captured specimens were identified to species.</p> <p>Results and discussions: A total of 1,093 phlebotomine sand flies of 30 species were captured. The most abundant species were <i>Prosealia choffi</i>, <i>Psychodopygus davisi</i> and <i>Nyssomyia intermedia</i>. The high number of <i>Nyssomyia intermedia</i> captured drew attention because they are considered one of the vectors of the infective <i>Leishmania braziliensis</i> present at PERD. No seasonality was observed in the occurrence of phlebotomine sand flies captured at PERD. The number of captured specimens of vector species, and the distance of traps from the forest border, were negatively correlated, showing that these vectors (<i>Nyssomyia intermedia</i>, <i>Nyssomyia whitmani</i> and <i>Migonemyia migonei</i>) were less common inside the forest area and that attention should be drawn to other potential vector species in the forest.</p> <p>Conclusion: These results can contribute to leishmaniasis prevention strategies directed at the visitors and professionals at or near PERD. The finding of the presence of <i>Leishmania</i> vectors in the park area must be given attention, since disease transmission can threaten people who visit PERD and its surroundings. Therefore, information on the prevention of leishmaniasis needs to be provided to all people who go there.</p>
Corresponding Author:	Reginaldo Brazil, PhD BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Cristian Ferreira Souza, MSc.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Cristian Ferreira Souza, MSc. Reginaldo Brazil, PhD Paula Dias Bevilacqua, PhD José Diemarando Andrade Filho, PhD

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

RESEARCH

Open Access



The phlebotomine sand flies fauna in Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil

Cristian Ferreira de Souza¹, Reginaldo Peçanha Brazil^{2*}, Paula Dias Bevilacqua³ and Jose Dilermando Andrade Filho⁴

Abstract

Background: Phlebotomine sand flies are dipterans of the family Psychodidae. They are very important to veterinary medicine because some species are vectors of infective forms of *Leishmania* spp., the etiological agents of leishmaniasis. The Parque Estadual do Rio Doce is located in an area with constant reports of cases of leishmaniasis. In order to better understanding the phlebotomine sand fly fauna of the park, the present work was undertaken with the goal of analyzing phlebotomine sand flies collected there, verifying their seasonality and correlating their presence with forest and/or anthropic areas.

Methods: To analyze the fauna of phlebotomine sand flies, HP-type, model CDC light traps were distributed along the Juquita trail of PERD. Twelve traps were installed between September 2012 and February 2014, and captured specimens were identified to species.

Results and discussions: A total of 1993 phlebotomine sand flies of 30 species were captured. The most abundant species were *Pressatia choti*, *Psychodopygus davisii* and *Nyssomyia intermedia*. The high number of *Nyssomyia intermedia* captured drew attention because they are considered one of the vectors of the infective *Leishmania braziliensis* present at PERD. No seasonality was observed in the occurrence of phlebotomine sand flies captured at PERD. The number of captured specimens of vector species, and the distance of traps from the forest boarder, were negatively correlated, showing that these vectors (*Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani* and *Migonemyia migonei*) were less common inside the forest area and that attention should be drawn to other potential vector species in the forest.

Conclusion: These results can contribute to leishmaniasis prevention strategies directed at the visitors and professionals at or near PERD. The finding of the presence of *Leishmania* vectors in the park area must be given attention, since disease transmission can threaten people who visit PERD and its surroundings. Therefore, information on the prevention of leishmaniasis needs to be provided to all people who go there.

Keywords: Phlebotominae, Leishmaniasis, Rain forest, Brazil

Background

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are of particular importance to veterinary medicine because some species are vectors of the infective form of *Leishmania* spp., etiological agents of leishmaniasis. Leishmaniasis is a group of diseases classified as visceral leishmaniasis (VL), which presents a serious form of the disease affecting the internal organs, and tegumentary

leishmaniasis (TL), a more common form that causes ulcers of the skin and mucosal destruction of upper respiratory tract. Leishmaniasis are endemic in many regions of the world, including Brazil [1, 2], and current research is looking for information regarding their urban cycle, focusing on their adaptation to urban areas [3, 4].

According to data from the National System of Notification, between the years 2007 and 2013, there was a yearly average of 3674 cases of VL and 22,601 of TL. During the same period, the state of Minas Gerais, Brazil, reported 3321 cases of VL and 9721 cases of TL,

* Correspondence: brazil.reginaldo@gmail.com

²Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Avenida Brasil, 4365 - Manginhos, CEP: 21040-900 Rio de Janeiro-RJ, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 de Souza et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

placing it among the top five Brazilian states in terms of the number of reported cases of leishmaniasis [5].

Originally transmission of leishmaniasis was primarily associated with rural and wild areas. However, with changes in behavior and habitat use of vectors and reservoirs, and their adaptation to the anthropic environment, research has begun to investigate domiciliary and peridomiciliary areas [6–8]. Nonetheless, there remains a need for new information about leishmaniasis in wild areas since these areas are constantly being used for scenic beauty, ecological sports, tourist attractions, and education and research.

Parque Estadual do Rio Doce (PERD) is an area that receives a large number of visitors throughout the year, not only for research and tourism, but also for teaching students from nearby schools.

According to unpublished information from PERD, there are constant reports of cases of leishmaniasis among the workers that live in houses located in the park; these cases are reported and analyzed as cases from neighboring cities, such as Timóteo, Ipatinga and Marliéria.

Knowing the composition of the phlebotomine sand fly fauna that exists in PERD is vital to a better understanding the transmission cycle of leishmaniasis in and around the park and to identify possible vectors. Analyzing the seasonal occurrence of species of phlebotomine sand flies is also important and has been explored by different studies, which have found that the climatic variables related to their occurrence are, in general, temperature, rainfall and air relative humidity [9–14]. These variables have been used previously to explain the behavior of populations of phlebotomine sand flies and, consequently, variation in the occurrence of human cases. This can also be of importance to find a better attitude for the control of leishmaniasis in areas of risk.

The goal of the present study was to investigate the phlebotomine sand fly fauna of Parque Estadual do Rio Doce. More specifically, the seasonal occurrence of phlebotomine sand flies will be analyzed, as will the location of vectors relative to the forest boarder, in order to better understand the dynamics of leishmaniasis transmission in the area.

Methods

Parque Estadual do Rio Doce (PERD) was the first Conservation Unit to be established in the state of Minas Gerais, and is located among the municipalities of Timóteo, Marliéria and Dionísio. It remains one of the largest conservation areas of Atlantic Rainforest in the country with 35,970 hectares, and is the third largest flooded area in Brazil after the Amazon and the Pantanal [15].

Daily, PERD receives tourists, researchers and teaching institutes in order to promote environmental education, ecologic tourism and biodiversity research. Currently,

the park contains two trails that are constantly used for these activities: the Vinhático trail and the Juquita trail. The Juquita trail is located in the part of the park that lies within the municipality of Timóteo. Juquita trail was chosen for this study because of its proximity to a known endemic area of TL and because it receives frequent visits [15].

Phlebotomine sand flies were collected using HP-type, CDC model light traps distributed along the Juquita trail, which starts at the boarder of the park and the urban area of the municipality of Timóteo, and continues into the forest for 3300 m. The light traps were placed at sampling points along the trail at 300-meter intervals. The points were distributed in the following manner: Point 1–0 meter (m) (begin of trail); Point 2–300 m; Point 3–600 m; Point 4–900 m; Point 5–1200 m; Point 6–1500 m; Point 7–1800 m; Point 8–2100 m; Point 9–2400 m; Point 10–2700 m; Point 11–3000 m; Point 12–3300 m (Fig. 1). Sampling was performed from September 2012 to February 2014 with the traps being active for 48 h consecutively once each month for a total of 864 h of capture effort.

Captured male and female flies were slide-mounted and identified according to the classification of Galati [16]; the females were subjected to molecular review after identification. Species names and abbreviations follow the proposal of Marcondes [17]. Data were compiled in tables, and evaluated through the calculation of the proportion and prevalence of phlebotomine sand flies according to species and sex; sex ratios were compared using the Z test.

Seasonal behavior was analyzed using the proportional distribution of phlebotomine sand flies across monthly captures and the climatic variables of temperature (°C), rainfall (%) and humidity (mm). Descriptive analyses (mean and median) were performed on the climatic variables. After testing for normality, Spearman correlation coefficients were calculated between the proportions of captured phlebotomine sand flies and the climatic variables. Climatic variable data were obtained from the National Institute of Meteorology [18] for the sampling period of September 2012 to February 2014.

Temperature and humidity were analyzed using the mean and median, whereas rainfall was analyzed using only the mean.

Three species of known vectors of *Leishmania* spp. (*Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Migomyia migonei*), were selected to document their distribution along the trail. These analyses were done, after testing for normality, by calculating the Spearman correlation coefficients between the proportions of phlebotomine sand flies and trap location. These analyses were carried out using Microsoft® Office Excel 2012 and STATA*12 programs and a 5 % ($\alpha = 0.05$) significance

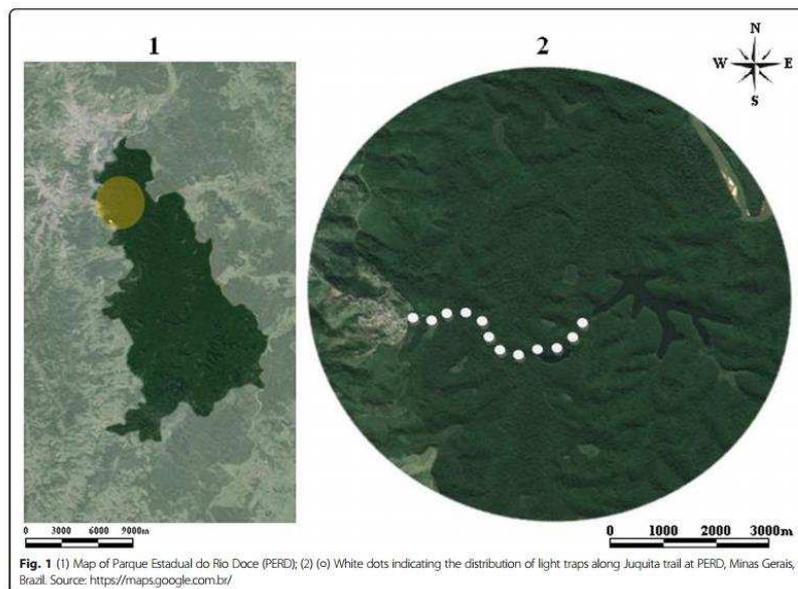


Fig. 1 (1) Map of Parque Estadual do Rio Doce (PERD); (2) (c) White dots indicating the distribution of light traps along Juquita trail at PERD, Minas Gerais, Brazil. Source: <https://maps.google.com.br/>

level was employed. Collecting of sand flies within PERD was performed under a permanent license to collect zoological material (N. 16,237-2), granted by the Environment Ministry.

Results and discussion

A total of 1993 specimens of phlebotomine sand flies belonging to 30 species were captured (Table 1). The most abundant species were *Pressatia choti* (19.12 %), *Psychodopygus davisi* (15.65 %) and *Nyssomyia intermedia* (11.34 %). The most abundant species, *Pressatia choti*, should not be of great concern because it is not involved in the transmission of *Leishmania* ssp. However, the same cannot be stated about *Ps. davisi*, which has been associated with the transmission of *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, in the Amazon region [19], and later in the state of Roraima [20]. This species of *Leishmania* is responsible for cutaneous leishmaniasis in the Amazon region [20], and draws attention to the possibility of new vectors in the transmission cycle of leishmaniasis at PERD.

Ny. intermedia is a species that draws attention because it is one of the known vectors of *Leishmania braziliensis* [21, 22] in the rain forest, and it is a known

vector of leishmaniasis. The large number of captured individuals of *Ny. intermedia* indicates that this species is likely one of the main vectors of tegumentary leishmaniasis in and around PERD.

In addition to *Ny. intermedia*, two other species that are recognized as vectors were captured at PERD, *Ny. whitmani* (4.57 %) and *Mi. migonei* (3.21 %). Despite not being predominant, their presence generates concern since they are known vectors of *Leishmania* ssp. [1, 23].

A strong negative correlation was identified between vector species and trap distance (into the forest) from the forest border (Table 2); as trap distance from the forest border increased, the number of captured known vectors (*Ny. intermedia*, *Ny. whitmani* and *Mi. migonei*) decreased. For example, 54.36 % of the known vector species of phlebotomine sand flies were captured in the first 300 m of the trail. It should be noted that the boarder of the forest (and the beginning of the Juquita trail) is on the edge of the urban area of Timóteo, a known endemic area of tegumentary leishmaniasis [4], an anthropic area, and an area with a strong presence of domestic animals and crops, all contributing to the maintenance and occurrence of these vectors.

Table 1 Frequency of species of phlebotomine sand flies captured, according to sex, Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil, from September 2012 to February 2014

Species	Male	Percent	Female	Percent	Total	Percent
<i>Lutzomyia</i> sp.	0	0.00	6	0.49	6	0.30
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0.00	42	3.45	42	2.11
<i>Br. avellari</i>	54	6.96	0	0.00	54	2.71
<i>Br. nitzulescui</i>	40	5.15	0	0.00	40	2.01
<i>Pa. aragaoi</i>	0	0.00	2	0.16	2	0.10
<i>Pi. bianchigalatae</i>	0	0.00	1	0.08	1	0.05
<i>Ps. geniculatus</i>	0	0.00	4	0.33	4	0.20
<i>Ml. borgmetrai</i>	20	2.58	1	0.08	21	1.05
<i>Ml. capixaba</i>	0	0.00	45	3.70	45	2.26
<i>Ps. carreirai</i>	28	3.61	143	11.75	171	8.58
<i>Pr. choti</i>	198	25.52	183	15.04	381	19.12
<i>Ev. cartelezzii</i>	0	0.00	1	0.08	1	0.05
<i>Ev. costalimai</i>	1	0.13	0	0.00	1	0.05
<i>Ps. davisi</i>	18	2.32	294	24.16	312	15.65
<i>Ev. edwardsi</i>	0	0.00	4	0.33	4	0.20
<i>Pi. fischeri</i>	3	0.39	41	3.37	44	2.21
<i>Pa. lanei</i>	0	0.00	7	0.58	7	0.35
<i>Ny. intermedia</i>	141	18.17	85	6.98	226	11.34
<i>Ty. longispina</i>	139	17.91	67	5.51	206	10.34
<i>Pa. lutziana</i>	0	0.00	7	0.58	7	0.35
<i>Mg. migonei</i>	16	2.06	48	3.94	64	3.21
<i>Pi. misionensis</i>	0	0.00	5	0.41	5	0.25
<i>Ml. oswaldoi</i>	0	0.00	3	0.25	3	0.15
<i>Pi. pessoi</i>	0	0.00	3	0.25	3	0.15
<i>Pa. pascalei</i>	97	12.50	59	4.85	156	7.83
<i>Ml. quinquefer</i>	1	0.13	16	1.31	17	0.85
<i>Ev. sallesi</i>	0	0.00	3	0.25	3	0.15
<i>Pa. shannoni</i>	0	0.00	2	0.16	2	0.10
<i>Sc. sordellii</i>	2	0.26	20	1.64	22	1.10
<i>Ev. termitophila</i>	1	0.13	4	0.33	5	0.25
<i>Ev. tupyambai</i>	1	0.13	46	3.78	47	2.36
<i>Ny. whitmani</i>	16	2.06	75	6.16	91	4.57
Total (%) ^a	776(38.94)	100.00	1217(61.06)	100.00	1993	100.00

^aComparison between the proportions of captured phlebotomine sand flies according to sex: $z = 13.97$; $p < 0.0001$

The perimeter of the area of high occurrence of vectors, the first 300 m of the Juquita trail, generates concern because it is an area that receives intense visitation by researchers, students, teachers, ecotourists, workers and so on, and therefore puts the health of many people at risk. The correlation data also suggest the possibility that other vector species are participating in the transmission cycle of leishmaniasis inside the forest, since the number of known vector species decreases further into the forest, by *Leishmania* transmission does not. These

findings emphasize the importance for further study of natural infection among the phlebotomines at PERD.

A seasonal pattern (Table 3) of occurrence of phlebotomine sand flies was not found, as reported by other studies [4, 24]. Contrary to the findings of the present study, seasonal behavior patterns have been documented previously [4, 15, 25], which may indicate, in this case, punctual transmission of *Leishmania* in determined moments of the year. It is interesting to note that the sampling sites in an area of rain forest may be located

Table 2 Spearman correlation between captured phlebotomine sand flies and distance inside forest from the forest border, Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil, from September 2012 to February 2014

Collect Place (m) ^{ab}	Consecrated phlebotomine sand flies vectors ^b	Percent	Other phlebotomine sand flies species	Percent	Total	Percent
0	137	36.15	65	4.03	202	10.14
300	69	18.21	56	3.47	125	6.27
600	15	3.96	94	5.82	109	5.47
900	25	6.60	158	9.79	183	9.18
1200	26	6.86	270	16.73	296	14.85
1500	23	6.07	120	7.43	143	7.18
1800	21	5.54	257	15.92	278	13.95
2100	6	1.58	106	6.57	112	5.62
2400	7	1.85	145	8.98	152	7.63
2700	37	9.76	205	12.70	242	12.14
3000	3	0.79	35	2.17	38	1.91
3300	10	2.64	103	6.38	113	5.67
Total (%)	379(19.02)	100.00	1.614(80.98)	100.00	1993	100.00

^aplaces where the traps were installed, distance from the beginning of the Juquita trail (forest boarder) into the forest. ^bCorrelation between the collect location and the number of phlebotomines considered, according to the literature. leishmaniasis vectors: $n = 12$; $\rho = -0.6643$. $P > 0.0185$. Documented phlebotomine sand flies vectors = *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*

Table 3 Correlation between the number of captured phlebotomine sand flies and the mean and median of climatic variables during the period of collection in the Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil, from September 2012 to February 2014

Period	n	Mean (%)	Rainfall (mm)				Humidity (%)				Temperature (°C)			
			μ (%)	Med	SD	CV(%)	μ (%)	Med	SD	CV(%)	μ (%)	Med	SD	CV(%)
September/2012	19	0.95	0.0	0.0	0.0	0.0	60.1	60.0	15.1	25.12	20.4	19.6	3.3	16.18
October /2012	71	3.56	0.0	0.0	0.0	0.0	50.6	48.0	14.8	29.25	21.7	21.7	3.3	15.21
November /2012	51	2.56	0.0	0.0	0.1	0.0	78.7	79.0	9.1	11.56	24.4	24.3	2.4	9.84
December /2012	180	9.03	0.0	0.0	0.0	0.0	66.3	67.0	12.7	19.16	24.6	24.1	2.5	10.16
January /2012 ^a	267	13.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
February /2012	163	8.18	0.1	0.0	0.3	300.00	64.5	66.0	12.4	19.22	25.2	24.7	2.7	10.71
March/2012	238	11.94	0.0	0.0	0.0	0.0	75.8	76.0	9.0	11.87	25.3	25.2	2.6	10.28
April/2012	208	10.44	1.4	0.0	3.8	271.42	89.3	91.0	5.6	6.27	22.1	22.0	1.5	6.79
May /2012	169	8.48	0.0	0.0	0.0	0.0	78.0	82.0	11.4	14.62	21.0	20.0	2.7	12.86
June/2012	74	3.71	0.0	0.0	0.0	0.0	79.2	82.0	12.1	15.28	19.3	18.7	2.7	13.99
July /2012	133	6.67	0.0	0.0	0.0	0.0	76.4	80.0	11.2	14.66	21.0	20.2	2.8	13.33
August /2012	68	3.41	0.0	0.0	0.0	0.0	61.6	60.0	14.7	23.86	21.6	20.5	3.5	16.20
September /2012	49	2.46	0.0	0.0	0.0	0.0	62.0	63.0	15.5	25.00	22.1	21.0	3.2	14.48
October /2012	8	0.40	0.8	0.0	1.0	125.00	94.1	95.0	3.6	3.83	15.7	15.5	0.9	5.73
November/2012	71	3.56	1.9	0.0	3.6	189.47	80.3	86.0	16.3	20.30	21.3	20.4	2.9	13.62
December/2012	173	8.68	0.7	0.0	2.2	314.28	74.0	73.0	16.1	21.76	25.7	24.6	4.0	15.56
Janeiro/2012	32	1.61	0.0	0.0	0.0	0.0	64.0	61.0	12.1	18.91	25.9	25.7	3.5	13.51
February/2012	19	0.95	0.0	0.0	0.0	0.0	60.3	59.0	15.1	25.04	25.3	24.2	3.3	13.04
Total	1.993	100.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note ^aPeriod of deactivation of the meteorological station. μ - Mean; Med - Median; SD - Standard Deviation; CV - Coefficient of variation. Average rainfall: $n = 17$; $\rho = 0.1530$; $P = 0.5577$. Average humidity: $n = 17$; $\rho = 0.2859$; $P = 0.2660$. Average humidity: $n = 17$; $\rho = 0.3163$; $P = 0.2161$. Average temperature: $n = 17$; $\rho = 0.2551$; $P = 0.3231$. Average temperature: $n = 17$; $\rho = 0.3043$; $P = 0.2350$

22. Ferreira AI, Sessa PA, Varejão IBM, Falqueto A. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:1061–7.
23. Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores, editors. *Flebotomíneos no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 207–56.
24. Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AIF, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Féreir, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45:66–70.
25. Rutledge LC, Ellenwood DA. Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The Species. *Environ Entomol*. 1975;4:71–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

