

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

Avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos de áreas
endêmicas de Minas Gerais, Brasil

por

Agnes Antônia Sampaio Pereira

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

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

Avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos de áreas
endêmicas de Minas Gerais, Brasil

por

Agnes Antônia Sampaio Pereira

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

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Co-orientação: Dr. Eduardo de Castro Ferreira

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P436a Pereira, Agnes Antônia Sampaio.
2015

Avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos de áreas endêmicas de Minas Gerais, Brasil / Agnes Antônia Sampaio Pereira. – Belo Horizonte, 2015.

XX, 106 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 112 - 126

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/transmissão 2. *Leishmania*/parasitologia 3. Reservatórios de Doenças/parasitologia I. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). III. Ferreira, Eduardo de Castro (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

Avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos de áreas
endêmicas de Minas Gerais, Brasil

por

Agnes Antônia Sampaio Pereira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Prof. Dr. Edward José de Oliveira

Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Suplente: Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar

Dissertação defendida e aprovada em: 26/02/2015

Dedico este trabalho aos meus pais por todo o amor
e aos meus orientadores pela infinidade de ensinamentos.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma
gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse
uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

Agradeço aos órgãos de fomento:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da minha bolsa;

Às instituições que financiaram este projeto: FAPEMIG, CNPq e FIOCRUZ.

À Plataforma de PCR em Tempo Real por ceder a infraestrutura necessária para a realização dos experimentos, em especial a Dra. Fernanda Barbosa Nogueira pela atenção e disponibilidade.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sua grandeza e imenso amor. Por me dar forças para seguir e conquistar meus objetivos.

Aos meus pais, Antônio e Hélia, por serem a base da minha vida. Por terem se doado para a realização dos meus sonhos, por todos os conselhos, pelo apoio nas dificuldades e por serem as melhores pessoas que eu conheço. Meu agradecimento a vocês jamais seria traduzido em palavras...

À minha avó, Dona Nega, que viveu comigo a felicidade em ser aprovada na seleção para o Mestrado, mas, infelizmente, não está entre nós para ver a conclusão desta etapa. Vovó, nunca vou esquecer o quanto fez por mim durante toda a minha vida.

Ao Luiz Otávio, pela compreensão diária, pelo carinho, paciência, por sempre trazer humor para as situações mais difíceis, por me amar, me entender, me confortar e por sempre estar ao meu lado! E claro, à toda a sua família que me acolhe com tanto afeto. Em especial ao Sr. Ermelindo e D. Nana, Dodora, Ana, Pedro, à Ana pela ajuda com o inglês (muito obrigada!) e a todos que me consideram parte dessa família tão importante para mim.

A todos os meus familiares e ao Mário, pelo cuidado e dedicação.

À minha orientadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo por me dar a incrível oportunidade e honra de ser sua aluna. Por me ensinar tanto, por não desistir de mim e, principalmente, pela amizade construída com muito carinho e dedicação. De coração, muito obrigada!!!

Ao meu co-orientador, Dr. Eduardo de Castro Ferreira, por ter sido muito mais que um orientador, mas um amigo incomparável que está sempre disposto a ajudar, qualquer que seja a situação. Por achar tantas soluções para tantos problemas e pela total dedicação a mim conferida. De sua grande amiga, muito obrigada!

Aos grandes amigos que tive a felicidade de conhecer no CPqRR: Laura, Tina, Érika, Raquel, Tamara, Mari, Lise, Jucélia, Fabi Lara, Fabi Paixão, Josie, Maiara, Rosana, Jeiza, Gabriel, Aline... Muito obrigada por toda a ajuda e por tornarem meus dias mais felizes!

Às queridas amigas que eu fiz no Mestrado: Sarah, Luiza e Raíssa, por todos os momentos, pelo companheirismo, nos sufocos e nas horas mais tranquilas!

À Lara e ao Je por todo o apoio e por tantas risadas ao longo desses dois anos, à Gabi e à Thaís pela grande ajuda e pelo suporte emocional na maioria dos dias!

À Dra. Patrícia Flávia Quaresma pelo fornecimento das amostras da Terra Indígena Xakriabá e por todo o apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Gustavo Fontes Paz pela oportunidade em participar das coletas dos pequenos mamíferos de Casa Branca no Município de Brumadinho.

Ao Dr. José Dilermando Andrade Filho e Cristiani de Castilho Sanguinette pelo fornecimento das amostras dos pequenos mamíferos de Várzea da Palma.

Novamente ao meu co-orientador, Eduardo de Castro Ferreira, pelo fornecimento das amostras dos animais de Belo Horizonte.

Ao Dr. Adriano Pereira Paglia pelo fornecimento das licenças para a coleta dos pequenos mamíferos e pela identificação da espécie dos mesmos.

À Dra. Taynãna César Simões, pela grande ajuda com as análises estatísticas.

Ao Msc. Felipe Dutra Rêgo pela ajuda na elaboração do mapa e em todas as outras dúvidas de informática.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo incentivo recebido.

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

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado, torceram por mim e me incentivaram durante este período.

Sumário

Lista de figuras	XIII
Lista de tabelas	XVI
Lista de abreviaturas	XVII
Resumo	XIX
Abstract	XX
1 Introdução	21
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses	22
1.2 Leishmanioses no Novo Mundo	23
1.3 Leishmanioses em Minas Gerais	25
1.4 Os ciclos de transmissão das leishmanioses e a urbanização.....	27
1.5 Transmissão vetorial de <i>Leishmania</i> spp.	29
1.6 Hospedeiros e reservatórios	30
1.7 A utilização de técnicas moleculares para a detecção e identificação de <i>Leishmania</i> sp.	33
1.7.1 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	33
1.7.2 <i>Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP)</i> ..	34
1.7.3 <i>Quantificação da carga parasitária pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	36
2 Justificativa	38
3 Objetivos	41
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 Materiais e Métodos	43
4.1 Área de estudo.....	44
4.1.1 <i>Belo Horizonte</i>	45
4.1.2 <i>Divinópolis</i>	45
4.1.3 <i>Brumadinho</i>	47
4.1.4 <i>São João das Missões</i>	47
4.1.5 <i>Várzea da Palma</i>	47
4.2 Captura dos pequenos mamíferos	48
4.2.1 <i>Belo Horizonte (Regional Nordeste)</i>	48
4.2.2 <i>Divinópolis</i>	50

4.2.3	<i>Brumadinho (Casa Branca)</i>	51
4.2.4	<i>São João das Missões (Terra Indígena Xakriabá)</i>	52
4.2.5	<i>Várzea da Palma (Barra do Guaicuí)</i>	53
4.3	Identificação e coleta das amostras biológicas de pequenos mamíferos.....	54
4.4	Extração de DNA das amostras biológicas coletadas.....	55
4.5	Detecção de <i>Leishmania</i> através da PCR convencional.....	55
4.6	Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> através da técnica de RFLP.....	56
4.7	Quantificação da carga parasitária pela qPCR.....	57
4.8	Análises estatísticas.....	58
5	Resultados	59
5.1	Pequenos mamíferos capturados.....	60
5.2	Detecção de <i>Leishmania</i> spp. nos pequenos mamíferos.....	65
5.3	Identificação da espécie de <i>Leishmania</i>	69
5.3.1	Espécie de <i>Leishmania</i> por área estudada e tipo de tecido avaliado.....	75
5.4	Quantificação da carga de <i>Leishmania</i> nos pequenos mamíferos coletados nas áreas de estudo de Minas Gerais.....	78
5.4.1	<i>Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste de Belo Horizonte</i>	79
5.4.2	<i>Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados em Divinópolis</i>	80
5.4.3	<i>Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados na localidade Casa Branca em Brumadinho</i>	81
5.4.4	<i>Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados na Terra Indígena Xakriabá</i>	82
6	Discussão	91
7	Conclusões	104
8	Anexos	106
8.1	LICENÇA PARA CAPTURA DE PEQUENOS MAMÍFEROS EM BELO HORIZONTE– IBAMA.....	107
8.2	AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA.....	108
8.3	LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO.....	109
8.4	LICENÇA PARA O USO DE ANIMAIS - CEUA/FIOCRUZ – VÁRZEA DA PALMA.....	110

9	Referências	111
----------	--------------------------	------------

Lista de figuras

- Figura 1:** Mapa representativo das cinco áreas endêmicas utilizadas no estudo. 44
- Figura 2:** Área peridomiciliar onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG 49
- Figura 3:** Área verde onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG 49
- Figura 4:** Imagens das áreas de mata onde foram montados os transectos para captura a disposição das armadilhas e exemplos de pequenos mamíferos capturados. 50
- Figura 5:** Imagens das áreas onde foram realizadas as capturas dos pequenos mamíferos, na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho. 51
- Figura 6:** Aspectos da Terra Indígena Xakriabá onde foram montadas as estações de captura de pequenos mamíferos 52
- Figura 7:** Armadilhas utilizadas para a coleta de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) no distrito de Barra do Guaicui, MG. 53
- Figura 8:** Gráfico representando o número de pequenos mamíferos capturados segundo a área de estudo e o ambiente de coleta. 63
- Figura 9:** Gráfico representando o número de pequenos mamíferos capturados segundo a ordem e as espécies por área de estudo 64
- Figura 10:** Percentual de positividade da PCR dirigida ao kDNA por área estudo .. 67
- Figura 11:** Gráfico representando a positividade da PCR dirigida ao kDNA por espécie amostrada. 68
- Figura 12:** Gráfico representando o percentual de positividade na PCR kDNA por tecido coletado em pequenos mamíferos. 69
- Figura 13:** Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos da Regional Nordeste de Belo Horizonte. 71
- Figura 14:** Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos da localidade Casa Branca no Município de Brumadinho. 72

Figura 15: Resultado representativo do perfil da digestão com <i>HaeIII</i> do gene <i>hsp70</i> amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos de Barra do Guaiçuí - Várzea da Palma e Divinópolis.	72
Figura 16: Resultado representativo do perfil da digestão com <i>HaeIII</i> do gene <i>hsp70</i> amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos da Terra Indígena Xakriabá.	72
Figura 17: Gráfico representando as espécies de <i>Leishmania</i> identificadas nos pequenos mamíferos nas áreas de estudo.	74
Figura 18: Gráfico representando as espécies de <i>Leishmania</i> identificadas de acordo com as espécies de animais capturados.	74
Figura 19: Espécie de <i>Leishmania</i> identificada pela PCR-RFLP do <i>hsp70</i> de acordo com o tecido.	78
Figura 20: Gráfico representando as medianas dos resultados de qPCR realizada com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos da regional Nordeste de Belo Horizonte.....	79
Figura 21: Gráfico representando as medianas dos resultados de qPCR realizada com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos de Divinópolis.....	80
Figura 22: Gráfico representando as medianas dos resultados de qPCR realizado com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos de Brumadinho.....	81
Figura 23: Gráfico representando a mediana dos resultados de qPCR realizado com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos da Terra Indígena Xakriabá	82
Figura 24: Gráfico representando os resultados de qPCR realizado com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos das áreas de estudo.....	84
Figura 25: Gráfico representando a carga parasitária de <i>Leishmania</i> na espécie <i>Didelphis albiventris</i> com relação à área de captura.	85
Figura 26: Gráfico representando a carga parasitária de <i>Leishmania</i> na espécie <i>Rattus rattus</i> com relação à área de captura.	86
Figura 27: Gráfico representando a carga parasitária de <i>Leishmania</i> na espécie <i>Cerradomys subflavus</i> com relação à área de captura.	86
Figura 28: Gráfico representando a carga parasitária de <i>Leishmania</i> na espécie <i>Rattus rattus</i> com relação ao tipo de tecido.	87
Figura 29: Gráfico representando a carga parasitária de <i>Leishmania</i> na espécie <i>Rhipidomys mastacalis</i> com relação ao tipo de tecido.	88

Figura 30: Gráfico representando a carga parasitária de *Leishmania* na espécie *Thrichomys apereoides* com relação ao tipo de tecido. 88

Figura 31: Gráfico representando a carga parasitária de *Leishmania* na espécie *Didelphis albiventris* com relação ao tipo de tecido. 89

Figura 32: Gráfico representando os resultados de qPCR realizado com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos capturados nas áreas estudadas. 89

Lista de tabelas

Tabela 1: Esforço amostral das capturas dos pequenos mamíferos nas áreas endêmicas estudadas.	54
Tabela 2: Lista dos pequenos mamíferos capturados por espécie e ambiente nas áreas de estudo.	62
Tabela 3: Resultado da PCR dirigida ao kDNA, por espécie, ambiente e área de estudo.	66
Tabela 4: Positividade na PCR kDNA com relação à área de estudo e tecido utilizado.	68
Tabela 5: Amostras positivas na PCR- kDNA que não foram identificadas pela RFLP <i>hsp70</i>	70
Tabela 6: Espécie de <i>Leishmania</i> identificada através da RFLP- <i>hsp70</i> por espécie de pequeno mamífero e por área de estudo.	73
Tabela 7: Espécies de <i>Leishmania</i> detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste de BH.	75
Tabela 8: Espécies de <i>Leishmania</i> detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados em Divinópolis.	76
Tabela 9: Espécies de <i>Leishmania</i> detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados na Localidade Casa Branca.	76
Tabela 10: Espécies de <i>Leishmania</i> detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados na Terra Indígena Xakriabá.	77
Tabela 11: Carga parasitária média (parasitos/mg) por espécie de hospedeiro e por área de estudo.	83
Tabela 12: Carga parasitária média (parasitos/mg) por espécie de hospedeiro e por tipo de tecido.	87

Lista de abreviaturas

BH: Belo Horizonte

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

DNA: Ácido desoxirribonucleotídico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

Hae III: Enzima de restrição produzida por *Haemophilus aegyptius*

hsp 70: Proteína de choque térmico de 70KDa

IBAMA: Instituto Brasileiro para o Meio Ambiente

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KDa: kilodalton

kDNA: DNA do cinetoplasto

Km: Quilômetros

Km²: Quilômetros quadrados

LCD: leishmaniose cutânea difusa

LCL: leishmaniose cutânea localizada

LM: leishmaniose mucosa

LT: Leishmaniose Tegumentar

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu: *Lutzomyia*

LV: Leishmaniose visceral

mg: miligramas

MG: Minas Gerais

MgCl₂: Cloreto de magnésio

min: minutos

mM: Milimolar

MS: Ministério da Saúde

ng: nanograma

°C: graus Celsius

OPAS: Organização Panamericana de Saúde

pb: Pares de bases

PBH: Prefeitura de Belo Horizonte

PCR: Polymerase Chain Reaction – (Reação em cadeia da polimerase)

PM: Peso Molecular

pmol: pico mol

qPCR: PCR quantitativa em tempo real

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorfism – (Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição)

RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorfism – (Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição)

seg: segundos

TM: Temperature melting

U: Unidades

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV: ultravioleta

WHO: World Health Organization

UV: Ultravioleta

µL: microlitros

µM: micromolar

Resumo

O conhecimento dos reservatórios de *Leishmania* spp. é crucial para o estabelecimento de medidas eficientes de controle das leishmanioses. A detecção, identificação da espécie de *Leishmania* bem como a quantificação da carga parasitária em diferentes amostras de animais podem ser ferramentas úteis na indicação da participação de um determinado hospedeiro como fonte de infecção para os vetores. Neste trabalho foi realizado um estudo sobre a infecção por *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais em áreas endêmicas para as leishmanioses de Minas Gerais. As amostras utilizadas foram provenientes de pequenos mamíferos capturados em cinco localidades: Regional Nordeste de Belo Horizonte, Município de Divinópolis, Terra Indígena Xakriabá no Município de São João das Missões, Barra do Guaicuí em Várzea da Palma e Casa Branca, localidade pertencente ao Município de Brumadinho. A detecção e quantificação do DNA de *Leishmania* foram realizadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) direcionadas ao alvo kDNA e a identificação da espécie através da PCR-RFLP direcionada ao *hsp70*. Foram capturados animais pertencentes a 14 diferentes espécies, das ordens Rodentia e Didelphimorfia. Os resultados mostraram que, em geral, a maioria dos animais foi capturada em áreas não urbanizadas e a maioria dos espécimes pertencem a ordem Rodentia. Dos 346 animais examinados, 78 (22%) foram positivos em pelo menos um tecido. A maior positividade foi observada na Terra Indígena Xakriabá (35%), seguido pela Regional Nordeste de Belo Horizonte (27%), Casa Branca (24%), Divinópolis (9%) e Barra do Guaicuí (8%). Quanto às espécies de animais, *Thrichomys apereoides* e *Didelphis albiventris* tiveram um número expressivo de exemplares capturados (76 e 113 respectivamente) e uma positividade considerada alta (28% e 19%). Com relação aos tecidos, o fígado apresentou maior positividade (14%), seguido por medula (9%), baço (6%), pele de orelha (5%) e pele de cauda (4%). Nas amostras dos animais foram identificadas as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) guyanensis*, sendo que a primeira foi encontrada infectando um maior número e uma maior diversidade de espécies de animais. Os animais capturados na Terra Indígena Xakriabá apresentaram a carga parasitária mais elevada, e, com relação às espécies dos hospedeiros, *T. apereoides* foi o que apresentou a maior carga parasitária. Quanto aos tecidos, houve uma alta positividade em amostras de fígado enquanto as amostras de baço apresentaram uma alta carga parasitária, o que aponta para a importância desses órgãos na infecção dos pequenos mamíferos por *Leishmania* spp.. A pele de orelha se mostrou eficiente na detecção das três espécies de *Leishmania* encontradas. Os resultados obtidos, aliados ao conhecimento epidemiológico da área, mostraram a importância da participação deste animais no ciclo de transmissão de *Leishmania* nas áreas endêmicas estudadas. Esses dados ressaltam a necessidade de mais estudos a respeito destas diferentes espécies de mamíferos, possíveis reservatórios de *Leishmania* spp., visando a implementação de novas estratégias de vigilância epidemiológica e aplicação de medidas de controle específicas, tanto para leishmaniose tegumentar como para leishmaniose visceral.

Abstract

The knowledge about the reservoir of *Leishmania* spp. is crucial to establish the efficient leishmaniasis control measures. The detection, identification of the *Leishmania* species and the parasite burden quantification in different clinical animal samples can be useful tools to indicate the participation of a certain host as a source of infection to the vectors. In this work it was done a study about the infection by *Leishmania* spp. in rodents and marsupials in leishmaniasis endemic areas in Minas Gerais. The used samples were from small mammals captured in five localities: the Northeast Region of Belo Horizonte, the municipality of Divinópolis, the Xakriabá Indian Reservation in the municipality of São João das Missões, Barra do Guaiçuí in the municipality of Várzea da Palma and Casa Branca, placed in the municipality of Brumadinho. The detection and quantification of the *Leishmania* DNA was done through the Polimerase Chain Reaction (PCR) targeted to the kDNA and the identification of the species through the PCR-RFLP targeted to the *hsp70*. Animals from 14 different species of the orders Rodentia and Didelphimorfia were captured. The results showed that, in general, most of the animals were captured in non urbanized areas and most of the specimens belong to the Rodentia order. From the 346 tested animals, 78 (22%) were positive in at least one tissue. The higher positivity was observed in the Xakriabá Indian Reservation (35%), followed by the Northeast Region of Belo Horizonte (27%), Casa Branca (24%), Divinópolis (9%) and Barra do Guaiçuí (8%). Related to the animal species, *Thrichomys apereoides* and *Didelphis albiventris* had an expressive number of captured specimens (76 and 113 respectively) and a high positivity (28% and 19%). About the tissues, the liver had the higher positivity (14%), followed by bone marrow (9%), spleen (6%), ear skin (5%) and tail skin (4%). In the animals samples were identified the species *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* and *L.(V.) guyanensis*, wherein the first was found infecting a higher number and a higher diversity of animals species. The captured animals in the Xakriabá Indian Reservation showed a more elevated parasite burden and, related to the host species, *T. apereoides* showed the higher parasite burden. About the tissues, there was a high positivity in liver samples as the spleen samples showed a high parasite burden, which points to the importance of these organs for the infection of small mammals by *Leishmania* spp. The ear skin was efficient in the detection of the three *Leishmania* species found. The obtained results, allied to the area epidemiologic knowledge, showed important participation of these animals in the *Leishmania* cycle transmission in the studied endemic areas. These data show the need of more researches about these different mammals species, possible *Leishmania* reservoirs, seeking the implementation of new epidemiological surveillance strategies and the application of specific control measures to the cutaneous leishmaniasis as well to the visceral leishmaniasis.

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças que exibem diferentes manifestações clínicas em humanos e são causadas por protozoários flagelados pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). A principal forma de transmissão é vetorial por intermédio da picada de fêmeas de flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) infectadas. O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros de acordo com o desenvolvimento no trato digestório do vetor, entre outros aspectos: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*) (Lainson & Shaw, 1987). Estes parasitos possuem reprodução clonal e ciclo digenético (heteroxênico), que acontece, parte no inseto vetor e parte em diferentes espécies de mamíferos hospedeiros. No tubo digestório do vetor, o parasito pode ser encontrado sob duas formas: promastigotas e paramastigotas, flageladas e móveis, e no vertebrado, o parasito encontra-se sob a forma amastigota, imóvel e sem flagelo aparente, intracelular e é encontrada em células fagocíticas do sistema mononuclear (Chang, 1985).

As diferentes formas clínicas humanas das leishmanioses dependem fundamentalmente da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro frente à infecção (Saravia et al., 1989). As duas formas clínicas básicas que as leishmanioses humanas podem se apresentar são: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A LV é uma doença sistêmica, sendo que os órgãos mais acometidos são baço, fígado, linfonodos, medula óssea, ou seja, órgãos ricos em fagócitos. É uma doença grave, crônica, de alta letalidade, cuja mortalidade pode chegar a 90% nos casos não tratados (Melo et al., 2004). A LT é de evolução crônica e possui um espectro de manifestações clínicas: lesões cutâneas ulceradas desenvolvidas no local da picada do flebotomíneo (leishmaniose cutânea localizada [LCL]); nódulos múltiplos não ulcerados (leishmaniose cutânea difusa [LCD]) e inflamação mucosa destrutiva (leishmaniose mucosa [LM]) (Reithinger & Dujardin, 2007). Estas manifestações podem apresentar graus variados de morbidade, desde simples lesões a formas graves e desfigurantes, que podem ser fatais devido a complicações secundárias. O espectro clínico observado nos pacientes indica a

complexidade epidemiológica da LTA, que está associada à diversidade de espécies do parasito, de seus vetores e hospedeiros vertebrados.

As leishmanioses são um grave problema de saúde pública, sendo que o número de casos vem aumentando anualmente (Alvar et al., 2012). Essas doenças estão amplamente distribuídas por 98 países (WHO, 2014) e sua área de abrangência coincide com o mapa socioeconômico da pobreza pelo mundo (Alvar et al., 2006). Estima-se que mais de 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, 2 milhões de casos ocorram anualmente (500.000 relacionados à LV e 1.500.000 à LT) e 350 milhões de pessoas estejam em risco de infecção. Embora estes dados sejam repetidamente citados na literatura, muito provavelmente são subestimados visto que muitas nações endêmicas não possuem um sistema de notificação compulsória. Além disso, a complexidade epidemiológica, a ocorrência de casos em regiões remotas e as dificuldades para o diagnóstico correto são obstáculos para um controle efetivo das leishmanioses (Alvar et al., 2012).

1.2 Leishmanioses no Novo Mundo

No Novo Mundo as leishmanioses são consideradas doenças primariamente zoonóticas, de mamíferos silvestres; neste ambiente o parasito circula naturalmente entre os mesmos. A infecção do homem acontece quando este entra em contato com as áreas de transmissão, sendo considerada uma antroponose (Shaw, 1988; Ashford, 1996).

A principal espécie causal da forma visceral da leishmaniose (LV) nas Américas é a *Leishmania (L.) infantum*, e várias espécies do gênero *Leishmania* foram identificadas como causadoras de leishmaniose tegumentar americana (LTA), dentre elas, quatro do subgênero *Leishmania*: *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) venezuelensis*, e nove do subgênero *Viannia*: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (Lainson & Shaw, 1987; Lainson, 2010).

A LV ou calazar é uma grave doença, sendo comumente fatal nos casos não tratados. Apresenta desenvolvimento crônico e sistêmico em que os parasitos têm

tropismo pelas células do sistema fagocitário mononuclear do fígado, baço, medula óssea e outros tecidos linfóides (Murray et al., 2005; WHO, 2014).

Com a expansão da área de abrangência da doença e o aumento significativo no número de casos, a LV passou a ser considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das prioridades dentre as doenças tropicais (Gontijo e Melo, 2004).

São estimados mais de 300.000 casos de LV e cerca de 20.000 mortes por ano (WHO, 2014), sendo que nas Américas, 12 países já reportaram casos autóctones, e destes, cinco notificaram em 2012 o total de 3.231 casos distribuídos em 781 municípios, sendo Brasil o país que concentra 96,5% (3.118) dos casos, seguido do Paraguai 2,4% (76), Argentina 0,7% (24), Colômbia 0,3% (9) e México 0,1% (4) (OPAS 2014).

A maioria dos casos no Brasil ocorre na região Nordeste do país. A partir dos anos 90, os estados Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (Brasil, 2001).

Nas Américas, a LTA está presente em 18 países. No ano de 2012 foram registrados 52.919 casos, distribuídos em 16 países da região, sendo que, do total de casos, 82,6% (43.798) estão concentrados no Brasil e nos países da sub-região Andina. No Brasil a LTA é encontrada em todos os estados e a análise de sua evolução mostra uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 unidades federadas, e em 2003 todos os estados registraram autoctonia (OPAS, 2014). A transmissão da LTA no novo mundo ainda está muito associada aos ambientes de matas e florestas. Contudo, com a ocorrência de ocupações humanas de forma desordenada, a transmissão vem ocorrendo também em áreas periurbanas, e, segundo Rouquayrol e Almeida Filho (2003), a ocorrência da LTA, assim como de outras doenças parasitárias endêmicas, tem sido relacionada à áreas de pobreza e escassos recursos humanos e econômicos para o seu controle e profilaxia, o que a caracteriza como uma doença negligenciada.

1.3 Leishmanioses em Minas Gerais

Nos municípios mineiros, os principais fatores ligados à expansão da LV devem-se às transformações no ambiente, provocadas pelo crescente processo de urbanização, pelo esvaziamento rural e pelas secas periódicas, que podem acarretar o aparecimento de novos focos e levar à redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias (Barata et al., 2005). A LV ocorre em Minas Gerais desde 1940, quando foram detectados os primeiros casos humanos na região Norte do Estado. Nessa época, a doença era tipicamente rural, diferentemente do que se observa atualmente, em que mais de 80% dos casos confirmados são de pacientes residentes em zonas urbanas (Resende, 2007). A leishmaniose visceral (LV) tem aumentado significativamente sua importância no contexto da saúde pública devido ao processo de urbanização e em decorrência das alterações no ambiente natural (Aguilar et al., 1998; Silva et al., 2001).

Tem sido registrados casos de LTA desde a metade do século XX, quando a doença foi descrita em Minas Gerais. O surgimento de surtos da doença, desde então, são relacionados principalmente com atividades de desmatamento (Martins et al., 1956; Dias et al., 1977; Gontijo et al., 2002). A epidemiologia da doença vem sofrendo alterações ao longo dos anos, sendo descritos casos autóctones em áreas periurbanas de cidades de médio e grande porte (Passos et al., 1993; Carvalho et al., 2006; Silva et al., 2006) além das áreas de colonização antiga (Gontijo et al., 1995).

Dando destaque aos municípios que foram abordados no presente estudo, em Belo Horizonte, a LTA começou a ser estudada em 1940 a partir da detecção de 13 casos humanos por Orsini (1945). Furtado et al. (1966) estudaram a origem desses casos e sugeriram que a transmissão poderia ter ocorrido em áreas periurbanas da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) ou poderiam ser casos importados de outros municípios.

Desde a década de 90 o município de Belo Horizonte permanece como área endêmica, onde são registrados casos humanos de leishmaniose visceral e tegumentar. Belo Horizonte é hoje o município mineiro com alta densidade populacional que mais sofre com a ocorrência da leishmaniose visceral (LV) e

também o que mais investe em ações de controle e prevenção da doença. Esta área apresentou, entre 2001 e 2013, número significativo de casos humanos de leishmaniose visceral (1.611 casos acumulados com média de 123 casos/ano), bem como vários casos de leishmaniose tegumentar (média anual estimada de cerca de 30 casos) (PBH, 2014).

O município de Divinópolis é considerado uma região endêmica para LT com 22 casos humanos notificados nos últimos cinco anos. No ano de 2007 foi confirmado o primeiro caso de LV humana e outros 15 casos no período de 2008 a 2012, sendo o município classificado como de transmissão moderada (Secretaria Municipal de Saúde de Divinópolis, 2014). Esta classificação indica a necessidade de medidas de vigilância epidemiológica com relação a LV, uma vez que outras cidades do estado de Minas Gerais tiveram o mesmo perfil histórico e atualmente são áreas de transmissão intensa de LV, por exemplo, Belo Horizonte e o município de Santa Luzia (PBH, 2014).

No município de Brumadinho tem sido verificada uma expansão do número de casos de leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) nos últimos cinco anos. No período de 2007 a 2012, foram notificados 15 casos de LT e 11 casos de LV, e sob o ponto de vista geral, o município é classificado como de transmissão esporádica para LV e não possui classificação pré-definida para LT, uma vez que esta classificação depende de diversos indicadores epidemiológicos, que ainda não foram estudados no município (BRASIL, 2010).

O crescimento expressivo de Várzea da Palma nos últimos anos, associado à falta de informação sobre a fauna flebotomínica e consequente ausência de vigilância entomológica, são fatores importantes para o surgimento e disseminação das leishmanioses no município (Sanguinette, 2011). O primeiro caso de leishmaniose no município foi registrado em 2001 no distrito de Barra do Guaicui. Desde então já foram notificados, de 2004 a 2013, 202 casos humanos autóctones de LT e 37 casos de LV. O aumento do número de casos de leishmanioses registrados nos anos recentes no município de Várzea da Palma aponta para a necessidade de estudos sobre a epidemiologia das leishmanioses na região, incluindo aspectos relacionados aos possíveis vetores e reservatórios dessas doenças.

As condições sanitárias, de saúde e habitação da comunidade indígena Xakriabá, pertencente ao município de São João das Missões, localizado no norte de Minas Gerais, não são satisfatórias. É comum observar na região uma elevada prevalência de doenças endêmicas como verminoses, altas taxas de incidência de diarreia, doenças infecciosas de pele e acentuadas taxas de mortalidade infantil. O estilo de vida dos povos indígenas e as condições sociais a que estão submetidos (má nutrição, falta de higiene e saneamento, convívio estreito com animais no ambiente doméstico e peridomiciliar) favorecem a transmissão de parasitoses, entre elas, as leishmanioses. Desde 2001 têm sido registrados casos autóctones de leishmaniose tegumentar americana na Terra Indígena Xakriabá, e houve um grande número de casos registrados nos últimos anos. Somente no período de 2010 a 2012 foram registrados 145 casos (FUNASA, 2010).

1.4 Os ciclos de transmissão das leishmanioses e a urbanização

Os ciclos das leishmanioses são primariamente silvestres e rurais, mas já ocorrem em grandes cidades devido à adaptação de vetores e reservatórios ao ambiente urbano. A epidemiologia das leishmanioses no novo mundo é bastante complexa devido a participação de várias espécies do agente etiológico, de vetores e de hospedeiros (Silva et al., 2005).

As leishmanioses são doenças dinâmicas, sendo as circunstâncias da sua transmissão continuamente alteradas por influência de fatores ambientais e do comportamento humano. Modificações no habitat dos hospedeiros naturais e dos vetores e as migrações humanas decorrentes de conflitos ou condições socioeconômicas precárias têm contribuído para a mudança no panorama eco epidemiológico destas doenças (Gramiccia & Gradoni, 2005; Dujardin, 2006). Podem ser consideradas as mais complexas e diversas de todas as doenças transmitidas por vetores, em sua ecologia e epidemiologia, que engloba 21 espécies de parasitos, diversas espécies de reservatórios e cerca de 30 espécies de flebotomíneos comprovadamente vetores de *Leishmania* spp. (Ashford, 2000; Lainson & Shaw, 1987).

A LTA foi inicialmente associada à áreas de mata primária e zonas rurais, estando a maior diversidade de espécies destes parasitos na região amazônica. A transmissão do agente causal de LTA envolve diferentes espécies de flebotomíneos em associações estreitas com parasitos e reservatórios, compondo os elos de diversos ciclos de transmissão que ocorrem no território nacional. Além disso, a transmissão das leishmanioses esteve associada a algumas espécies de flebotomíneos que até então apresentavam comportamento silvestre. Nas últimas décadas têm ocorrido mudanças no padrão de transmissão da LTA. Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, só acometia o homem que ocasionalmente adentrava as florestas. Hoje, a doença já ocorre em zonas rurais, matas remanescentes modificadas e regiões periurbanas, onde a adaptação dos reservatórios silvestres e dos flebotomíneos é evidente, propiciando a formação do ciclo do parasito nesses ambientes (Lima et al., 2002; Marzochi, 1989). A manutenção da LTA nessas áreas ecologicamente alteradas, na sua maioria áreas rurais na periferia de grandes cidades, indicam claramente a evolução de um ciclo de transmissão secundário ocorrendo no ambiente peridoméstico (Lainson & Shaw, 1998).

O Brasil apresenta expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães com sorologia positiva em várias localidades, incluindo cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria apenas no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos. Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais, ilustra claramente o processo de urbanização da LV nas cidades brasileiras (Araújo et al., 2013).

As relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas do que no cenário rural (Gontijo & Melo, 2004). Alterações do meio ambiente, em várias regiões do Brasil, vêm modificando o perfil epidemiológico das leishmanioses, permitindo a invasão de áreas peridomiciliares por mamíferos silvestres reservatórios de *Leishmania* spp., onde podem ocorrer espécies de flebotomíneos adaptadas ao ambiente modificado pelo homem. A epidemiologia das leishmanioses somente pode ser compreendida através do conhecimento de todos os elos que compõem seu ciclo de transmissão, como reservatórios e vetores envolvidos e suas relações ecológicas.

1.5 Transmissão vetorial de *Leishmania* spp.

A transmissão de *Leishmania* spp. para o hospedeiro vertebrado acontece através da picada de fêmeas hematófagas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente como flebotomíneos (Gontijo & Melo, 2004). Os flebotomíneos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientes (silvestres, rurais e urbanos) (Miranda e Dias, 2011).

A infecção dos flebotomíneos ocorre no momento em que a fêmea, ao fazer o repasto sanguíneo essencial para maturação dos ovos, ingere macrófagos parasitados. No intestino, as células se rompem liberando os parasitos que, imediatamente, iniciam o processo de transformação em formas flageladas. Estas se multiplicam e colonizam o intestino. Ao final de seu processo evolutivo neste hospedeiro, atingem a probóscida, podendo, a seguir, serem transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo (Bates & Rogers, 2004). Estes insetos são extremamente eficientes na transmissão do parasito e isto é creditado, principalmente, aos componentes de sua saliva que contém substâncias vasodilatadoras e imunossupressoras (Andrade et al., 2007).

Aproximadamente 400 espécies e subespécies de *Lutzomyia*, foram descritas nas Américas e destas, aproximadamente 30, são prováveis vetoras das muitas espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e da leishmaniose visceral (LV). A ecologia dos vetores é determinante para a eco-epidemiologia da doença. A infecção do homem será diretamente proporcional ao grau de antropofilia do vetor. Assim, algumas espécies de *Leishmania* cujos vetores são pouco antropofílicos, não causarão doença humana ou, causarão numa incidência muito baixa (Ready, 2013).

A principal espécie relacionada com a transmissão de *L. (L.) infantum* nas Américas é a *Lu. longipalpis*. Esta espécie está bem adaptada ao ambiente antropizado, alimentando-se tanto em animais silvestres e sinantrópicos como em domésticos. A *Lu. intermedia* possui um comportamento muito parecido com *Lu. longipalpis* em relação aos hábitos alimentares, frequentemente alimenta-se de sangue humano e de animais domésticos no peridomicílio e, esta espécie é

incriminada como vetora de *L.(V.) braziliensis* (De Souza et al. 2006; Margonari et al. 2006).

Outra espécie que apresenta ampla distribuição é a *Lu. whitmani*, capturada em praticamente todos os estados brasileiros e em vários outros países latinoamericanos. É associada com a transmissão de *L. shawi*, *L. braziliensis* e hipoteticamente, poderia também transmitir *L. guyanensis*, de forma ocasional. Como vetora de *L. braziliensis*, pode ser associada tanto com o ciclo de transmissão silvestre quanto peridoméstico. Vários estudos têm demonstrado que, esta espécie vem se adaptando à áreas urbanas, pois tem sido coletada no peridomicílio e em áreas verdes contidas dentro de perímetros urbanos (Barreto et al., 2014).

1.6 Hospedeiros e reservatórios

A detecção de DNA de *Leishmania* spp. em determinada espécie de mamífero não é suficiente para considerar esta espécie como reservatório (Roque & Jansen, 2014). Um animal infectado é um hospedeiro do parasito, e o termo reservatório é melhor definido como um sistema em que um agente infeccioso sobrevive persistentemente (Ashford, 1996). Então, pode-se considerar como reservatório não apenas uma única espécie de mamífero infectado, mas um sistema que pode incluir uma ou mais espécies de animais responsáveis pela manutenção do parasito na natureza (Ashford, 1997; Haydon et al., 2002).

Nos sistemas reservatórios, cada espécie de mamífero desempenha um papel na manutenção do parasito, o que significa que estes sistemas devem ser sempre considerados em uma escala espaço-temporal restrita, específica para cada local e cada momento (Roque et al., 2010).

A importância desses conceitos no controle das leishmanioses reside no fato de que a maioria das leishmanioses são zoonoses que acometem outros mamíferos, sendo que o homem participa do ciclo como hospedeiro acidental (Ashford, 1996).

Existem vários relatos do encontro de animais domésticos infectados por alguma espécie de *Leishmania*, como equinos (Rolão et al., 2005; Soares et al.,

2013), suínos (Brazil et al., 1987) e felinos (Pennisi et al., 2004; Savani et al., 2004; Souza et al., 2005). O cão ainda é considerado o mais importante reservatório doméstico do agente etiológico da LV e tem sido responsabilizado pelo surgimento e manutenção de focos endêmicos e epidêmicos da doença nos grandes centros urbanos (Silva et al., 2001). Os cães, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem, preenchem as condições necessárias para serem reservatórios de *L. (L.) infantum* (Dantas-Torres et al., 2006). São frequentes as observações de cães infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* em áreas endêmicas para LT e LV, respectivamente (Silva et al., 2001; Gontijo et al., 2002; Madeira et al., 2003). Apesar de aventada a possibilidade de animais domésticos e peridomésticos, em especial o cão, estarem atuando como reservatórios, pouco se conhece sobre os aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos do curso da infecção pela *L.(V). braziliensis* em cães. Vários questionamentos ainda permanecem quanto ao verdadeiro papel do cão na urbanização do ciclo de transmissão da *L.(V). braziliensis* (Reithinger & Davies, 1999; Madeira et al., 2003).

Desde as primeiras décadas do século XX, pesquisadores têm como objetivo a busca pelos reservatórios silvestres naturais dos agentes etiológicos das leishmanioses tegumentar e visceral, com ênfase aos roedores a partir do momento que algumas espécies dos mesmos foram incriminadas como reservatórios de *Leishmania* spp. (Nery Guimarães et al., 1968). Os roedores são reconhecidos como hospedeiros de mais de 60 doenças zoonóticas, que representam uma séria ameaça à saúde humana (Meerburg et al., 2009; Luis et al., 2013). A grande invasão e expansão dos roedores é considerada um desafio. O rato preto (*Rattus rattus*), a ratazana ou rato marrom (*Rattus norvegicus*) e o camundongo ou rato doméstico (*Mus musculus*), por exemplo, expandiram dramaticamente a sua distribuição geográfica como uma consequência das atividades humanas (Aplin et al., 2011).

O primeiro achado de infecção natural por *L. (L.) infantum* em animais silvestres foi registrado por Deane & Deane (1954) em raposa capturada no estado do Ceará, identificada na época como *Lycalopex vetulus*. Posteriormente, estudos mostraram que a espécie que ocorre na região é, na verdade, *Cerdocyon thous*,

também encontrada infectada no Pará e em Minas Gerais (Lainson & Shaw, 1969; Silva et al., 2000).

Em 1957, no Panamá, Hertig e colaboradores realizaram hemocultura em roedores e marsupiais, encontrando resultados positivos para *Leishmania* sp. em alguns exemplares de espécies de ratos de espinho (*Proechimys semispinosus* e *Haplomys gymnurus*). A associação dos parasitos isolados em cultura à leishmaniose tegumentar foi comprovada pela inoculação em voluntário e subsequente produção de lesão leishmaniótica (Forattini, 1960).

A participação de roedores na epidemiologia das leishmanioses já foi descrita por vários autores no Brasil. Em 1970, Lainson & Shaw detectaram pela primeira vez no estado do Mato Grosso, *Leishmania* sp. em roedores do gênero *Oryzomys*. Duas cepas distintas do parasito foram observadas nos isolados: uma de crescimento rápido e outra de crescimento lento. Estas observações levaram os autores a suspeitar de se tratar de um complexo de espécies, até aquele momento, denominadas como uma única espécie: *Leishmania braziliensis* (Lainson & Shaw, 1970). Os mesmos autores, no norte do estado do Pará, encontraram o roedor *Proechimys guyannensis* frequentemente parasitado (15 de 57 espécimes capturados) pela espécie *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972). Eles concluíram que esta deveria ser a principal espécie hospedeira do parasito (Shaw, 1988).

Com a utilização de técnicas moleculares, roedores silvestres e sinantrópicos (*Rattus rattus*) foram encontrados infectados por *L. (V.) braziliensis* no Ceará (Vasconcelos et al., 1994). Brandão-Filho et al. (2003) no estado de Pernambuco, capturaram 460 animais e conseguiram isolar *L. braziliensis* em 6 espécimes, dos quais 5 eram pertencentes à espécie *Bolomys lasiurus* (atualmente *Necromys lasiurus*) e um *Rattus rattus*.

Oliveira e colaboradores (2005) encontraram espécimes de *Trichomys apereoides*, *Cerradomys subflavus* e *Rattus rattus* infectados por espécies dos complexos *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani*. Em vários exemplares de *R. rattus* foi detectado o DNA de espécies pertencentes aos três complexos de

Leishmania, indicando que ela possa participar do ciclo peridoméstico das leishmanioses, devido aos seus hábitos sinantrópicos.

Algumas espécies de marsupiais, que são animais sinantrópicos, já foram encontradas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, como o gênero *Didelphis* pela *L. (L.) infantum* (Sherlock et al., 1984, Sherlock, 1996; Schallig et al., 2007; Carreira et al., 2012), *L. (V.) braziliensis* (Quaresma et al., 2011) *L. (L.) amazonensis* (Grimaldi et al., 1991) e *L. (V.) guyanensis* (Arias et al., 1981). Espécies pertencentes a outros gêneros também já foram encontradas naturalmente infectadas por *L. (V.) braziliensis* (Quintal et al., 2011; Quaresma et al., 2011), *L. (L.) amazonensis* (Arias et al., 1981; Lainson & Shaw 1998; Quintal et al., 2011) e *L. (V.) guyanensis* (Quaresma et al., 2011). Estes animais costumam ser encontrados em florestas alteradas pela ação antrópica. São vistos com frequência nos quintais das residências situadas nas bordas das matas visitando galinheiros e latas de lixo em busca de alimento. Apresentam hábitos crepusculares e noturnos. Escondem-se em ocos de árvores onde passam o dia dormindo (Nowak, 1991).

Nos últimos anos, cresceu o interesse da comunidade científica pelos animais com hábitos sinantrópicos, ou seja, aqueles que de alguma maneira se utilizam do ambiente modificado pelo homem para sobreviver. Este interesse se deu especialmente porque as leishmanioses cada vez mais são observadas em áreas peridomiciliares. É muito importante a identificação dos reservatórios primários da infecção por *Leishmania* spp. para o desenvolvimento e avaliação de medidas mais efetivas de controle da transmissão.

1.7 A utilização de técnicas moleculares para a detecção e identificação de *Leishmania* sp.

1.7.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Saiki et al. (1985) para a amplificação sequencial de determinado fragmento de um DNA alvo, através da utilização de uma DNA polimerase termoestável. O fragmento a ser

amplificado é flanqueado por um par de iniciadores que delimitam o início e o fim da amplificação. O DNA molde e os precursores para a síntese de uma nova molécula são submetidos a ciclos repetidos nos quais, a temperatura varia para garantir desnaturação, anelamento dos iniciadores e extensão da fita. Cada ciclo sucessivo essencialmente duplica o DNA sintetizado no ciclo anterior. O resultado é um acúmulo exponencial do fragmento alvo de aproximadamente 2^n onde n é o número de ciclos.

A amplificação do DNA de *Leishmania* através da PCR pode ser específica para o gênero (Rodgers et al., 1990), como pode ser específica para os complexos, *L. braziliensis* (De Bruijn & Barker, 1992), *L. mexicana* (Eresh et al., 1994) e *L. donovani* (Cortes et al., 2004). Podem ser usados como alvos o DNA nuclear e o DNA do cinetoplasto (kDNA), cujo minicírculo representa o alvo molecular ideal, pois apresenta um grande número de cópias por célula e sua sequência já é conhecida para a maioria das espécies de *Leishmania* (Aransay et al., 2000). Esta elevada sensibilidade é muito útil nos inquéritos epidemiológicos, nos quais se pretende detectar o maior número possível de portadores ou hospedeiros.

A PCR possui vantagens como alta sensibilidade e especificidade, habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e de poder ser aplicada em amostras clínicas após extração do DNA das mesmas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas (Ikonomopoulos et al., 2003). Mas como a PCR é um método extremamente sensível, seu maior inconveniente seria o risco de resultados falso-positivos ou contaminação por produtos previamente amplificados.

A detecção do DNA e a identificação de diferentes espécies de *Leishmania* através de métodos moleculares, como a PCR, vêm sendo aplicadas ao estudo das leishmanioses para fins epidemiológicos, de diagnóstico e tratamento.

1.7.2 Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

Considerando os resultados descritos por vários autores, é possível discriminar as espécies de *Leishmania* através da análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados após digestão com endonucleases

(análise de esquizodemas) (Lopes et al., 1984; Spanakos et al., 2007). Endonucleases são enzimas capazes de reconhecer e cortar pequenas sequências no DNA molde, de quatro a seis pares de bases, chamados sítios de restrição. As enzimas de restrição são muito específicas, então, diferentes sequências de bases nitrogenadas podem ou não, ser reconhecidas por uma endonuclease. Assim, a digestão diferenciada de DNAs de fontes diversas por uma enzima de restrição ou por uma combinação delas pode ser utilizada para distinguir entre duas ou mais espécies de parasito.

1.7.3 *Quantificação da carga parasitária pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR)*

A quantificação parasitária em diferentes amostras clínicas pode ser útil na indicação da participação de um determinado hospedeiro como fonte de infecção para o inseto vetor.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma inovação tecnológica que permitiu a quantificação de sequências de DNA de forma rápida, acurada, reprodutível e sensível (Paiva-Cavalcanti et al., 2010; Galletti et al., 2011; Martínez et al., 2011). Desta forma, tornou-se possível mensurar a carga parasitária a partir de tecidos infectados de maneira mais precisa.

Esta técnica é baseada na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR. Os sinais de fluorescência necessários para detecção podem ser obtidos pela marcação dos produtos amplificados com corante fluorescente. Esta marcação pode ser realizada utilizando uma sonda que se liga à sequência alvo (sistema Taq-Man) ou então uma molécula fluorescente que se intercala na dupla-fita de DNA (sistema SYBR-Green). Ambos os sistemas permitem o monitoramento contínuo do acúmulo de produto de PCR gerado, pela combinação de um termociclador e um fluorímetro (Espy et al., 2006). A análise da emissão de fluorescência é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (Kubista et al., 2006).

A qPCR apresenta vantagens em relação a PCR convencional, pois não necessita realizar os vários passos de manipulação pós-amplificação requeridos pela técnica convencional. Além disso, minimiza os riscos de contaminação do material e permite de forma simultânea a detecção, medida e comparação do número de parasitos em diferentes amostras (Vitale et al., 2004; Nicolas et al., 2002), combinando rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (Sundsford et al., 2004; Yang & Rothman, 2004).

A qPCR apresenta-se como uma metodologia promissora para estudos de quantificação da carga de DNA de *Leishmania*, visto que as técnicas até então

utilizadas são laboriosas e pouco sensíveis, principalmente, para detecção de cargas parasitárias baixas (Quaresma et al., 2009).

2 Justificativa

No Novo Mundo, as leishmanioses são zoonoses, sendo o homem um hospedeiro acidental (Ashford, 1996). Os fatores eco epidemiológicos envolvidos na gênese das diferentes formas clínicas da doença são muito complexos. O ciclo epidemiológico de transmissão de *L. (V.) braziliensis*, agente etiológico mais frequente de LTA, por exemplo, não é completamente conhecido (Ashford, 1996; Oliveira et al., 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005).

A diversidade de agentes etiológicos, reservatórios e vetores aliada ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários aspectos da LTA tornam difícil e complexo o controle da doença (Reithinger & Dujardin, 2007).

As estratégias de controle devem ser específicas conforme a situação epidemiológica de cada local. A identificação do agente etiológico circulante nas áreas endêmicas, o conhecimento dessas áreas, bem como do papel dos hospedeiros-reservatórios, são fatores importantes para definição de medidas profiláticas adequadas para a redução da incidência da doença.

O processo de expansão geográfica e urbanização da LV conduzem à necessidade de se estabelecer medidas mais eficazes de controle. Na maior parte dos estudos sobre epidemias urbanas tem sido relatado o encontro de cães infectados e, em algumas áreas, foi possível observar que a LV canina precedeu o aparecimento da doença humana. Vários artigos tem mostrado a associação entre a presença de cães infectados e a ocorrência da doença humana (Araújo et al., 2013; Teixeira-Neto et al., 2014). Entretanto, as medidas de controle adotadas nos centros urbanos não têm sido eficazes e os casos humanos e caninos continuam ocorrendo. Portanto, o estudo de outros possíveis reservatórios nas áreas urbanas é importante para que se possa conhecer todos os elos da cadeia de transmissão e o papel de cada um deles.

A epidemiologia das leishmanioses apresenta um quadro mais complexo do que o classicamente descrito, com possível ocorrência de uma transmissão secundária, Peri doméstica, envolvendo outros reservatórios (Paranhos-Silva, 1998).

Sabe-se que o papel que determinado reservatório desempenha na transmissão é um evento espacial e temporal. Assim, é preciso definir a importância desses animais no ciclo epidemiológico de transmissão da doença na área. Esta

condição é primordial para que se possa estabelecer medidas de controle e vigilância epidemiológica mais eficazes.

Minas Gerais se destaca como o estado da região sudeste com o maior número registrado de casos humanos de leishmaniose visceral e tegumentar. As estratégias de controle implementadas não tem conseguido barrar a expansão geográfica e o aumento no número de casos. Estudos epidemiológicos sobre os ciclos de transmissão das leishmanioses nas diferentes regiões endêmicas do estado são cruciais para subsidiar os serviços de saúde no combate a estas enfermidades.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos provenientes de diferentes áreas endêmicas para leishmanioses em Minas Gerais.

3.2 Objetivos Específicos

- Detectar a infecção por *Leishmania* spp. em hospedeiros silvestres e sinantrópicos provenientes de focos de transmissão das leishmanioses em Minas Gerais.
- Identificar a espécie de *Leishmania* em hospedeiros silvestres e sinantrópicos provenientes de focos de transmissão das leishmanioses em Minas Gerais.
- Quantificar a carga parasitária em hospedeiros silvestres e sinantrópicos de *Leishmania* sp.
- Avaliar a importância das diferentes espécies de pequenos mamíferos nos ciclos de transmissão de *Leishmania* spp. em Minas Gerais.

4 Materiais e Métodos

4.1 Área de estudo

O estudo dos hospedeiros de *Leishmania* spp. foi realizado a partir de amostras coletadas em cinco áreas endêmicas para as leishmanioses em Minas Gerais. Nestas áreas estão sendo realizados projetos sobre a epidemiologia das leishmanioses e pertencem aos municípios de: Belo Horizonte, Divinópolis, Brumadinho, Várzea da Palma e São João das Missões (Figura 1).

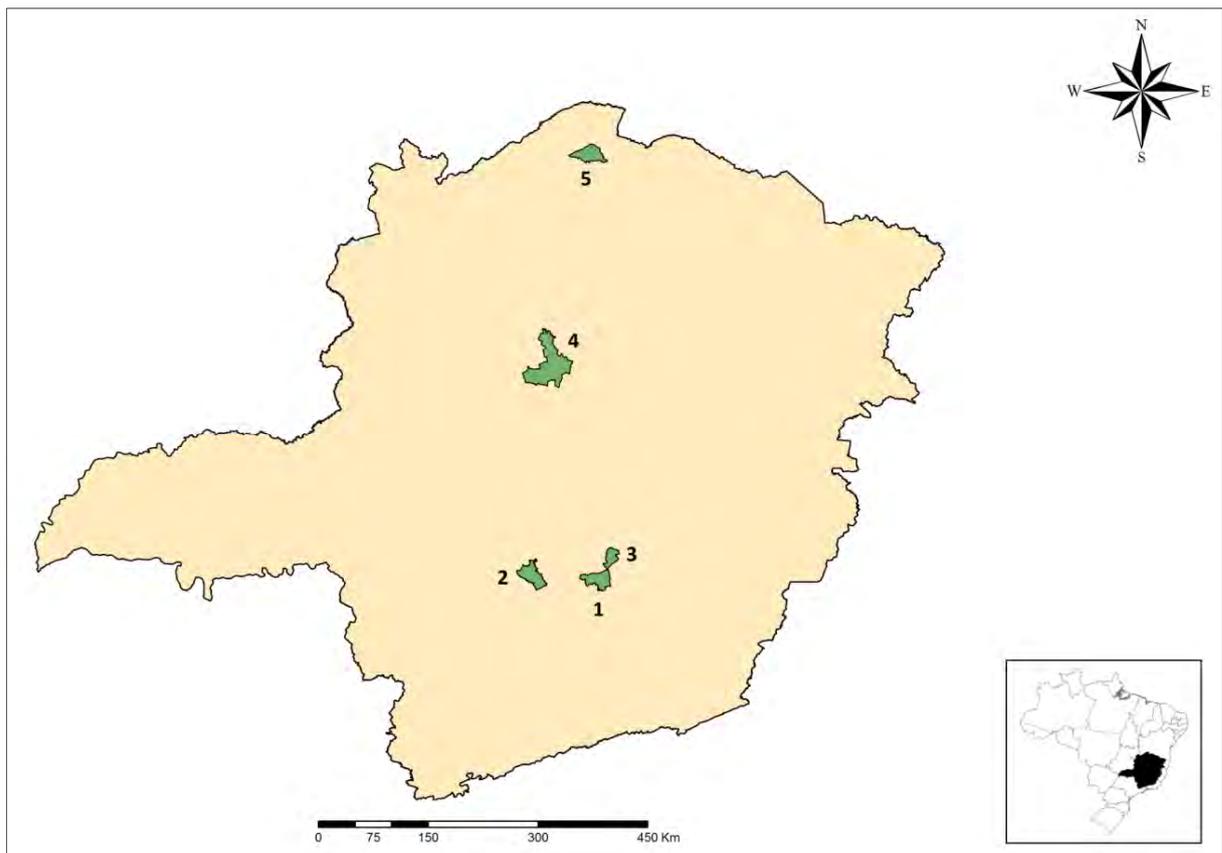


Figura 1: Mapa representativo das cinco áreas endêmicas utilizadas no estudo. **1** - Belo Horizonte, **2** – Divinópolis, **3** – Brumadinho, **4** - Várzea da Palma, **5** - São João das Missões.

As coletas dos pequenos mamíferos cujas amostras foram utilizadas neste estudo foram realizadas em diferentes projetos de mestrado e doutorado desenvolvidos pelo Grupo de Estudos em Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou / Fiocruz Minas: 1- Belo Horizonte: Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. (Ferreira, 2010); 2- Divinópolis: Análise espacial das Leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil (Teixeira-Neto -

dados não publicados); 3- Brumadinho: Estudo eco epidemiológico das leishmanioses no Município de Brumadinho, Minas Gerais, Brasil, para adequação das ações de prevenção e controle (dados não publicados); 4- Várzea da Palma: Epidemiologia das leishmanioses em Barra do Guaicui, Minas Gerais (Sanguinette – dados não publicados); 5- Terra Indígena Xakriabá: Estudo da leishmaniose tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores (Quaresma, 2011).

4.1.1 *Belo Horizonte*

O município de Belo Horizonte (19°46'35" e 20°03'34" sul; 43°51'27" e 44°03'47" oeste), capital do estado de Minas Gerais, está localizado a 852 m acima do nível do mar. Possui clima tropical de altitude, temperatura média em torno de 21°C, índice pluviométrico médio de 1450 mm/ano. A população estimada é de 2,475 milhões de habitantes (IBGE, 2010). Belo Horizonte é uma região intensamente urbanizada cuja economia é baseada na atividade industrial de transformação e no comércio/serviços.

Belo Horizonte é dividida em nove áreas político-administrativas: Barreiro, Centro- Sul, Leste, Nordeste, Noroeste, Norte, Oeste, Pampulha e Venda Nova. A área escolhida para estudo foi a Regional Nordeste que contém 39,60 Km² (cerca de 10% da área total do município). A metade desta área, ou seja, 19,46 Km² está ocupada por áreas verdes compostas por parques, sítios e pastos. A área urbanizada é composta por 68 sub-regiões entre bairros, vilas e aglomerados subnormais. Possui uma população de 290.353 habitantes (IBGE, 2010).

4.1.2 *Divinópolis*

O município de Divinópolis (20° 8' 22" latitude sul, 44° 53' 14" longitude oeste) está localizado na zona metalúrgica, a 121 quilômetros da capital, Belo Horizonte. Com 724 metros de altitude, o clima é quente e semiúmido, a temperatura média é 21.5 °C e a média anual de pluviosidade é de 1313 mm/ano. A população estimada é de 216 mil habitantes (IBGE, 2010). Polo da região centro-oeste de seu estado,

caracteriza-se principalmente pela indústria confeccionista e metalurgia/siderurgia. As capturas foram realizadas na zona urbana do município de Divinópolis e em áreas de mata preservada espalhadas pelo município.

4.1.3 *Brumadinho*

O município de Brumadinho (20°08'36" de latitude Sul e 44°11'59" de longitude Oeste) pertence à Região Metropolitana de Belo Horizonte e está localizado a 749 metros acima do nível do mar. Possui clima subtropical úmido, temperatura média em torno de 21°C e índice pluviométrico médio de 1300mm/ano. Possui uma população total de 33.973 habitantes. O estudo foi conduzido na localidade de Casa Branca, pertencente ao município. A população de Casa Branca é de 2.591 habitantes, correspondendo a 7,6% da população total do município (IBGE, 2010). Esta localidade se tornou alvo de especulações imobiliárias especialmente após a década de 80 quando se concretizou a construção de condomínios fechados na região. Na cobertura vegetal característica do município predominam os campos de montanha e a vegetação configura-se como mata de transição.

4.1.4 *São João das Missões*

O município de São João das Missões (14°53'01" de latitude Sul e 44°05'26" de longitude Oeste) está localizado na região norte do estado de Minas Gerais, a 687 quilômetros da capital. Situado a 480 metros acima do nível do mar, possui clima semiárido, com índice pluviométrico de 947 mm/ano. Possui uma população de 11.715 habitantes (IBGE, 2010) e a principal atividade econômica desenvolvida no município é agricultura e a agropecuária. O estudo foi conduzido na Terra Indígena Xakriabá, pertencente ao município e demarcada pela FUNAI em 1979, que possui uma população de 9.196 habitantes, o que equivale a mais de 70% da população do município (FUNASA, 2010).

4.1.5 *Várzea da Palma*

A cidade de Várzea da Palma está inserida na região do Alto São Francisco, no norte de Minas Gerais, a uma distância de 351 quilômetros da capital, com a sede localizada a 515 metros acima do nível do mar. Possui clima semiárido,

temperatura média anual de 23°C e índice pluviométrico de 1078,6 mm/ano. Atualmente a população do município é de 35.809 habitantes (IBGE, 2010). Barra do Guaicuí, onde foi conduzido o estudo, é um distrito de Várzea da Palma que está localizado a 67 km do município, a 22 km de Pirapora e a 360 km de Belo Horizonte. Possui uma característica peculiar que é o encontro das águas do Rio das Velhas com o Rio São Francisco, uma importante bacia hidrográfica do Brasil. Esta zona caracteriza-se pela presença de mata preservada e intenso processo de urbanização nos últimos anos.

4.2 Captura dos pequenos mamíferos

4.2.1 Belo Horizonte (Regional Nordeste)

Para a captura viva dos animais, foram montadas, na área verde e nos arredores dos domicílios selecionados, armadilhas Tomahawk de arame galvanizado “tipo gaiola” com isca suspensa de abacaxi e bacon. Os pontos de coleta na área peridomiciliar (Figura 2), foram escolhidos por conveniência, condicionados à presença no domicílio, ou próximo a ele, de casos humanos de LV e/ou LTA nos três anos anteriores ao início da pesquisa (2003, 2004 e 2005). Preenchida esta condição, foram escolhidas 20 residências espalhadas pela área, porém, mais concentradas na porção central e norte desta. A distribuição dos pontos de captura na área verde (Figura 3) foi feita em três trilhas, cada uma contendo 15 armadilhas, separadas entre si por uma distância de cerca de 20 metros. Foram realizadas cinco campanhas de captura nos meses de Junho, Setembro, Dezembro/2006 e Março, Junho/2007. Foi utilizado por campanha o total de 85 armadilhas/noite, sendo 40 expostas no peridomicílio e 45 na área verde. As armadilhas ficaram expostas por quatro dias e quatro noites consecutivas. O esforço amostral previsto, ao final das cinco campanhas, foi de 1000 armadilhas no peridomicílio e 1125 armadilhas na área verde, somando um total de 2125 armadilhas (Tabela 1).



Figura 2: Área peridomiciliar onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG (Melo, 2008).



Figura 3: Área verde onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG (Melo, 2008).

4.2.2 *Divinópolis*

Foram montados transectos para a disposição das armadilhas de coleta, seguindo a metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos (Lacher et al., 1989; Paglia et al., 1995). Em cada transecto foram definidas estações de coleta distanciadas aproximadamente 20m uma da outra, sendo dispostas um total de 20 armadilhas em cada uma das cinco trilhas totalizando 100 armadilhas. Foram utilizadas armadilhas do tipo Tomahawk com isca suspensa de abacaxi e emulsão Scott. O número de estações de coleta foi estabelecido de modo a amostrar os diferentes ambientes relacionados aos padrões de atividade humana (Figura 4). No peridomicílio das residências com casos positivos de leishmaniose humana foram dispostas duas armadilhas para captura de pequenos mamíferos, totalizando 30 armadilhas que ficaram expostas por quatro dias e quatro noites consecutivas. As capturas foram realizadas a cada 2 meses, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

Foi utilizado por campanha o total de 130 armadilhas/noite, sendo 30 expostas no peridomicílio e 100 na área verde. O esforço amostral previsto, ao final das cinco campanhas, foi de 600 armadilhas no peridomicílio e 2000 armadilhas na área verde, somando um total de 2600 armadilhas (Tabela 1).



Figura 4: Imagens das áreas de mata onde foram montados os transectos para captura a disposição das armadilhas e exemplos de pequenos mamíferos capturados. 1: Mata do Noé; 2:

Armadilha disposta no Parque do Gafanhoto; 3: Mata do Sidil; 4: *Necromys lasiurus*; 5: Morro da Antena; 6: *Micoureus demarerae* (Teixeira-Neto, 2014).

4.2.3 Brumadinho (Casa Branca)

Os pequenos mamíferos foram capturados no peridomicílio de residências (Figura 5) da localidade de Casa Branca, que é uma área de campo rupestre com ocupação antrópica consolidada. O critério de escolha dos pontos de captura foram casas em que foram registrados casos humanos ou casos caninos de leishmaniose. No período de maio de 2013 a maio de 2014 foram realizadas oito campanhas de captura, a cada dois meses, utilizando dezoito armadilhas por campanha, sendo nove do tipo Sherman e nove do tipo Tomahawk. As armadilhas foram abastecidas com iscas atrativas para mamíferos de pequeno porte (abacaxi e emulsão Scott) e ficaram expostas por dois dias consecutivos por coleta. Foram colocadas 18 armadilhas/noite, todas no peridomicílio. O esforço amostral previsto, ao final das oito campanhas, foi de 288 armadilhas (Tabela 1).



Figura 5: Imagens das áreas onde foram realizadas as capturas dos pequenos mamíferos, na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho. 1, 2 e 3: armadilhas expostas no peridomicílio das residências. 4: exemplo de pequeno mamífero capturado (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.4 São João das Missões (Terra Indígena Xakriabá)

Foram montados transectos para a distribuição das armadilhas de coleta, seguindo a metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos (Lacher et al. 1989; Paglia et al. 1995; Fonseca et al. 1996). Foram definidas quatro estações (trilhas) de coleta. Em cada trilha foram dispostas 30 armadilhas, duas em cada ponto de coleta distanciados aproximadamente 20m um do outro. No peridomicílio de cada residência selecionada foram expostas duas armadilhas, totalizando 42 armadilhas nas casas e 120 nas trilhas (Figura 6). As armadilhas do tipo Tomahawk foram abastecidas com iscas atrativas para mamíferos de pequeno porte (abacaxi e emulsão Scott) e ficaram expostas durante quatro dias e noites seguidos. As coletas foram realizadas no período de maio de 2008 a junho de 2009. O esforço amostral ao final das sete campanhas foi de 1.176 armadilhas no peridomicílio e 3.360 armadilhas na área verde, somando um total de 4.536 armadilhas (Tabela 1).



Figura 6: Aspectos da Terra Indígena Xakriabá onde foram montadas as estações de captura de pequenos mamíferos (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.5 Várzea da Palma (Barra do Guaicuí)

Foram realizadas coletas de pequenos mamíferos utilizando armadilhas do tipo Sherman e do tipo Tomahawk durante os meses de março, junho, agosto e outubro de 2012 na área urbana, e em três trilhas, dispostas em área de plantação de cana de açúcar, área de pastagem e uma trilha à margem direita do Rio das Velhas, no Distrito de Barra do Guaicuí. No peridomicílio de cada uma das 24 casas, foram expostas duas armadilhas, uma Sherman e uma do tipo Tomahawk, totalizando 48 armadilhas (Figura 7). Foi utilizado como isca abacaxi e emulsão Scott. Para definição das trilhas foram montados transectos para a disposição das armadilhas de coleta, seguindo a metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos (Lacher et al., 1989; Paglia et al., 1995). Cada trilha foi composta por 15 pontos, distantes aproximadamente 20 metros um do outro, com duas armadilhas diferentes dispostas em cada ponto, totalizando 30 armadilhas por trilha.

No ano de 2013, foram realizadas coletas mensais no período de janeiro a dezembro, com a exposição de 150 armadilhas, 75 armadilhas tipo Sherman e 75 do tipo gaiola, distribuídas em uma trilha montada na área urbana, e quatro em área verde. As armadilhas ficaram expostas durante quatro dias e quatro noites consecutivas. Assim, o esforço amostral ao final das 16 campanhas foi de 2.208 armadilhas no ano de 2012 e 7.200 armadilhas no ano de 2013, somando um total de 9.408 armadilhas (Tabela 1).



Figura 7: Armadilhas utilizadas para a coleta de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) no distrito de Barra do Guaicui, MG. 1: armadilha Sherman; 2: armadilha Tomahalwk (Sanguinete, 2014).

Tabela 1: Esforço amostral das capturas dos pequenos mamíferos nas áreas endêmicas estudadas.

Local de captura (município)	Período de captura	Ambiente	Número de capturas	Número de armadilhas por captura	Duração da campanha(dias)	Esforço amostral
Regional Nordeste (Belo Horizonte)	junho de 2006 a junho de 2007	Área verde e peridomicílio	5	85	5	2125
Divinópolis	setembro de 2010 a agosto de 2011	Área verde e peridomicílio	8	130	4	4.160
Casa Branca (Brumadinho)	maio de 2013 a maio de 2014	Peridomicílio	8	18	2	288
Barra do Guaicuí (Várzea da Palma)	março a outubro de 2012 e janeiro a dezembro de 2013	Área verde e peridomicílio	16	138 (2012) 150 (2013)	4	9408
Terra Indígena Xakriabá (São João das Missões)	maio de 2008 a junho de 2009	Área verde e peridomicílio	7	162	4	4.536

4.3 Identificação e coleta das amostras biológicas de pequenos mamíferos

Todos os pequenos mamíferos capturados, nas diferentes localidades, foram identificados com base na análise de caracteres morfológicos e comparação com exemplares depositados na Coleção de Mastozoologia da UFMG.

Com o intuito de garantir a ausência de dor e desconforto, todos os pequenos mamíferos capturados foram sedados e posteriormente eutanasiados para a obtenção das amostras de medula, pele de cauda, pele de orelha, baço e fígado.

No presente estudo, foram utilizadas amostras de medula, pele de cauda, pele de orelha, baço e fígado dos animais provenientes de Casa Branca, Barra do Guaicuí e da Terra Indígena Xakriabá; amostras de medula, pele de orelha, baço e fígado dos animais da Regional Nordeste e, pele de cauda, pele de orelha, baço e fígado dos animais de Divinópolis.

4.4 Extração de DNA das amostras biológicas coletadas

Os fragmentos de pele de orelha, pele de cauda, fígado, baço e medula coletados dos animais capturados e acondicionados em álcool etílico absoluto a -20°C foram submetidos à extração do DNA. A metodologia de extração seguindo as instruções do fabricante do Puregene Cell and Tissue kit – QIAGEN.

Fragmentos de 20 mg do tecido foram submetidos à lise enzimática a 55°C por 15 horas para digestão das proteínas e em seguida a digestão pela RNase a 37°C por meia hora. As proteínas desnaturadas foram então precipitadas pelo acréscimo de Solução de Precipitação de Proteínas. Após centrifugação, o DNA foi recuperado no sobrenadante, precipitado com solução isopropanol, centrifugado, foi realizada uma lavagem do pellet de DNA com etanol 70%, centrifugado, reidratado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.5 Detecção de *Leishmania* através da PCR convencional

Nas amostras de DNA extraídas dos pequenos mamíferos foram realizadas PCRs direcionadas a dois alvos.

- kDNA (DNA do cinetoplasto de *Leishmania*) utilizando os iniciadores A: 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', gerando um fragmento de 120pb (Degraive et al., 1994). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 5µl do DNA molde, 0,75 µl de MgCl₂ a 50 mM, 1 µl de dNTP mix a 10 mM (Promega), 0,14 µl de Taq DNA polimerase platinum® a 5U/µl (Invitrogen), 1µl do iniciador kDNA A a 15 pmol e 1µl do iniciador kDNA B a 15 pmol (Eurofins mwg/operon). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por quatro minutos, seguindo de 35 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. A extensão final foi a 72°C por 10 min.
- *hsp70* (proteína de choque térmico de 70 kilodáltons) utilizando os iniciadores HSP70 senso: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e HSP70 anti senso: 5'

CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3', gerando um fragmento de 1300pb (Garcia et al., 2004). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 5µL do DNA molde, 0,75 µl de MgCl₂ a 50 mM, 0,5 µl de dNTP mix a 10 mM (Promega), 1,5 µl de DMSO 5,0% (Invitrogen), 0,25 µl de Taq DNA polimerase platinum® a 5U/µl (Invitrogen), 1µl do iniciador HSP70 for a 10 pmol e 1µl do iniciador HSP70 rev a 10 pmol (IDT, prodimol). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 min, seguidos por um passo de extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos amplificados nas PCRs dirigidas a ambos os alvos foram visualizados em exposição à luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel de agarose 2.0% corado com brometo de etídeo. A visualização e a captura das imagens foram obtidas através do Translluminador L Pix – Loccus Biotecnologia.

4.6 Identificação das espécies de *Leishmania* através da técnica de RFLP

As amostras que apresentaram a banda específica de 1300 pb na PCR dirigida ao gene *hsp70* foram submetidas à digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) (Garcia et al., 2004). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de *HaeIII* (New England) (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima e 12,5 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.7 Quantificação da carga parasitária pela qPCR

Para a quantificação absoluta dos parasitos, o sistema de detecção com “intercaladores” não específicos SYBR Green foi empregado nos experimentos. Curvas padrão foram construídas a partir da utilização de diluições seriadas ao décimo de DNA de culturas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), considerando que 200 fg de DNA equivalem a um parasito (Deborggraeve et al., 2008), e partindo da concentração equivalente a 2×10^3 parasitos/ μL até uma concentração equivalente a 2×10^{-1} parasitos/ μL . A qPCR foi utilizada para determinar a quantidade de DNA de *Leishmania* presente nas diferentes amostras processadas. A amplificação foi realizada pelo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados foram os mesmos da PCR convencional dirigidos a região conservada do kDNA de *Leishmania*. As reações foram preparadas adicionando 1,0 μL de cada iniciador a uma concentração 5 pmoles por μL , 12,5 μL de GoTaq® *qPCR Master Mix* (Promega), 5,0 μL de DNA, 5,5 μL de água deionizada para completar o volume final da reação de 25 μL . Após aplicação das amostras, a placa é vedada com um selante e colocada no equipamento. A amplificação foi realizada com as seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos; seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação, 65°C por um minuto com aquisição da fluorescência neste momento. Após a amplificação a análise de dissociação foi realizada em um ciclo adicional cuja temperatura aumentava de 60°C a 95°C a uma taxa de 0,3°C por segundo, com aquisição de fluorescência contínua. Os resultados foram analisados utilizando o programa 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e a quantificação do número de cópias conforme a curva padrão. A quantidade de DNA detectada foi convertida em número de parasitos/ μL , pelo fator citado anteriormente. Em seguida este número de parasitos/ μL foi normalizado pela quantidade de tecido utilizado na extração de DNA, juntamente com o volume no qual este DNA foi diluído para seu uso nas reações, sendo o resultado final reportado em parasitos/mg de tecido (Tupperwar et al., 2008).

Como controle endógeno da qPCR foi utilizado o gene IRBP que apresenta uma sequência bem conservada entre as diferentes espécies de mamíferos contempladas no estudo. A qPCR foi realizada utilizando os iniciadores IRBPfwd: 5'TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3' e IRBPrev: 5' GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3', que flanqueiam uma região de 227 pb (Ferreira et al., 2010). A reação ocorreu nas mesmas condições e mesma ciclagem da qPCR citada anteriormente.

4.8 Análises estatísticas

As diferenças de positividade em cada comparação entre tecidos, entre espécies, entre microambientes e entre áreas de estudo foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). O nível de significância utilizado para todas as análises foi de 5%.

Na comparação das cargas parasitárias foram utilizados testes não-paramétricos devido ao número de amostras, a fim de comparar a carga parasitária mediana entre as categorias de algumas variáveis (Teste de Kruskal-Wallis, Teste de Mann-Whitney).

O teste Kruskal-Wallis é utilizado para detectar se há diferença na carga parasitária quando se considera mais de dois grupos. O nível de significância utilizado nos testes Kruskal-Wallis foi de 5%, e conseqüentemente, os pvalores menores que o nível de significância indicam uma diferença estatística significativa entre os grupos. Quando o teste de Kurskal-Wallis detecta diferenças entre os grupos, utiliza-se o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon-Mann-Whitney) para duas amostras independentes dois a dois para verificar entre quais grupos está essa diferença.

Foram realizados todos os ajustes nos diferentes grupos para a realização dos testes estatísticos.

Para a realização destas análises e construção dos gráficos foi utilizado o programa Graph Pad Prism 6.

5 Resultados

5.1 Pequenos mamíferos capturados

No presente estudo foram utilizadas amostras de 348 espécimes de pequenos mamíferos de 14 espécies, sendo oito espécies de roedores (*Cerradomys subflavus*, *Mus musculus*, *Necomys lasiurus*, *Oligoryzomys* sp., *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, *Rhipidomys mastacalis* e *Thrichomys apereoides*) e seis espécies de marsupiais (*Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita*, *Gracilinanus agilis*, *Gracilinanus microtarsus*, *Marmosops incanus* e *Micoureus demarerae*) que foram capturados em projetos anteriores realizados por colaboradores pertencentes ao nosso grupo de pesquisa, com exceção do município de Brumadinho, onde as coletas foram realizadas durante a execução deste estudo.

A maioria dos pequenos mamíferos foi capturada em áreas não urbanizadas (áreas de mata e pastos) das diferentes localidades amostradas (Figura 8) e a maioria dos espécimes coletados foram da ordem Rodentia (Figura 9).

Na Regional Nordeste de Belo Horizonte foram capturados 97 espécimes, sendo 42 em área urbanizada (peridomicílio) e 55 em área não urbanizada (área verde e área de pasto), pertencentes a sete espécies, sendo cinco de roedores (*Cerradomys subflavus*, *Mus musculus*, *Necomys lasiurus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*) e duas de marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) (Tabela 2)(Figura 9). Algumas espécies foram capturadas apenas em área não urbanizada: *Cerradomys subflavus*, um roedor de tamanho médio, *Necomys lasiurus*, um pequeno roedor silvestre e *Didelphis aurita*, uma espécie de gambá. *Didelphis albiventris*, o animal mais amostrado nesta área, é um marsupial importante por sua aproximação comum a habitações humanas, mas ocorreu principalmente na área verde, demonstrando menor sinantropismo que *Mus musculus*, o camundongo de casa. *Rattus rattus*, o rato preto de telhado e *R. norvegicus*, a ratazana de esgoto, todos roedores comensais sinantrópicos que são espécies introduzidas e que foram capturados principalmente em áreas urbanizadas.

No município de Divinópolis foram capturados 102 espécimes, sendo três em área urbanizada e 99 em área não urbanizada, pertencentes a nove espécies: seis de roedores (*Cerradomys subflavus*, *Mus musculus*, *Necomys lasiurus*, *Oligoryzomys* sp., *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*) e três de marsupiais (*Didelphis*

albiventris, *Gracilinanus agilis* e *Micoureus demererae*) (Tabela 2) (Figura 9). O mamífero mais amostrado também foi *Didelphis albiventris*. O segundo pequeno mamífero mais amostrado foi o *Necromys lasiurus* (Figura 9), um roedor terrestre, comum nos cerrados, caatinga e mata atlântica. As outras espécies (*Cerradomys subflavus*, *Oligoryzomys sp.*, *Micoureus demererae*, *Mus musculus*, *Rattus novergicus*, *Rattus rattus* e *Gracilinanus agilis*) tiveram uma menor frequência de exemplares capturados.

Na Localidade Casa Branca pertencente ao município de Brumadinho foram capturados 25 pequenos mamíferos, todos em área não urbanizada, de quatro diferentes espécies, sendo duas espécies de roedores (*Cerradomys subflavus* e *Rattus rattus*) e duas espécies de marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Marmosops incanus*) (Tabela 2). As coletas foram realizadas apenas no peridomicílio de residências situadas em condomínios com presença predominante de área verde. O roedor *Rattus rattus* foi a espécie mais capturada, seguida pelo marsupial *Didelphis albiventris*, pelo roedor *Cerradomys subflavus* e pelo marsupial *Marmosops incanus* (figura 9).

Na Terra Indígena Xakriabá, localizada no município de São João das Missões, foram capturados 97 pequenos mamíferos, sendo 90 em área não urbanizada e sete no peridomicílio, pertencentes a sete espécies, três roedores (*Rattus rattus*, *Rhipidomys mastacalis* e *Thrichomys apereoides*) e quatro marsupiais (*Didelphis albiventris*, *Gracilinanus agilis*, *Gracilinanus microtarsus* e *Marmosops incanus*) (Tabela 2)(Figura 9). O roedor *Thrichomys apereoides* foi a espécie mais amostrada seguida pelo marsupial *Didelphis albiventris*. *Rhipidomys mastacalis* foi o segundo roedor mais amostrado. As outras espécies, *Gracilinanus agilis*, *Marmosops incanus* e *Rattus rattus*, contribuíram com um menor número na fauna de pequenos mamíferos capturada na área no período estudado (Figura 9).

No distrito de Barra do Guaicuí em Várzea da Palma, foram capturados 25 espécimes, sendo nove em área urbanizada e 16 em área não urbanizada, pertencentes a três espécies, sendo dois roedores (*Rattus rattus* e *Thrichomys apereoides*) e uma espécie de marsupial (*Didelphis albiventris*) (Tabela 2) (Sanguinete – dados não publicados). O distrito de Barra do Guaicuí em Várzea da Palma apresentou a menor variedade de espécies capturadas, e o roedor

Thrichomys apereoides foi a espécie mais amostrada, seguida por *Rattus rattus* e pelo marsupial *Didelphis albiventris* (Figura 9).

Tabela 2: Lista dos pequenos mamíferos capturados por espécie e ambiente nas áreas de estudo.

Espécie	Local									TOTAL
	Regional Nordeste		Divinópolis		Casa branca	Xakriabá		Barra do Guaiçuí		
	Peridomicílio	Área não urbanizada	Peridomicílio	Área não urbanizada	Peridomicílio (área verde)	Peridomicílio	Área não urbanizada	Peridomicílio	Área não urbanizada	
<i>Cerradomys subflavus</i>	0	5	0	5	5	0	0	0	0	15
<i>Mus musculus</i>	20	4	2	0	0	0	0	0	0	26
<i>Necomys lasiurus</i>	0	5	0	38	0	0	0	0	0	43
<i>Oligoryzomys sp.</i>	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
<i>Rattus norvegicus</i>	8	1	0	2	0	0	0	0	0	11
<i>Rattus rattus</i>	11	8	1	0	10	1	0	7	0	38
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7
<i>Thrichomys apereoides</i>	0	0	0	0	0	1	63	0	12	76
Total	39	23	3	50	15	2	70	7	12	221
<i>Didelphis albiventris</i>	3	31	0	45	9	5	14	2	4	113
<i>Didelphis aurita</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	1	0	0	3	0	0	4
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Marmosops incanus</i>	0	0	0	0	1	0	2	0	0	3
<i>Micoureus demarerae</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3
Total	3	32	0	49	10	5	20	2	4	125
Total	42	55	3	99	25	7	90	9	16	346

	Roedores
	Marsupiais

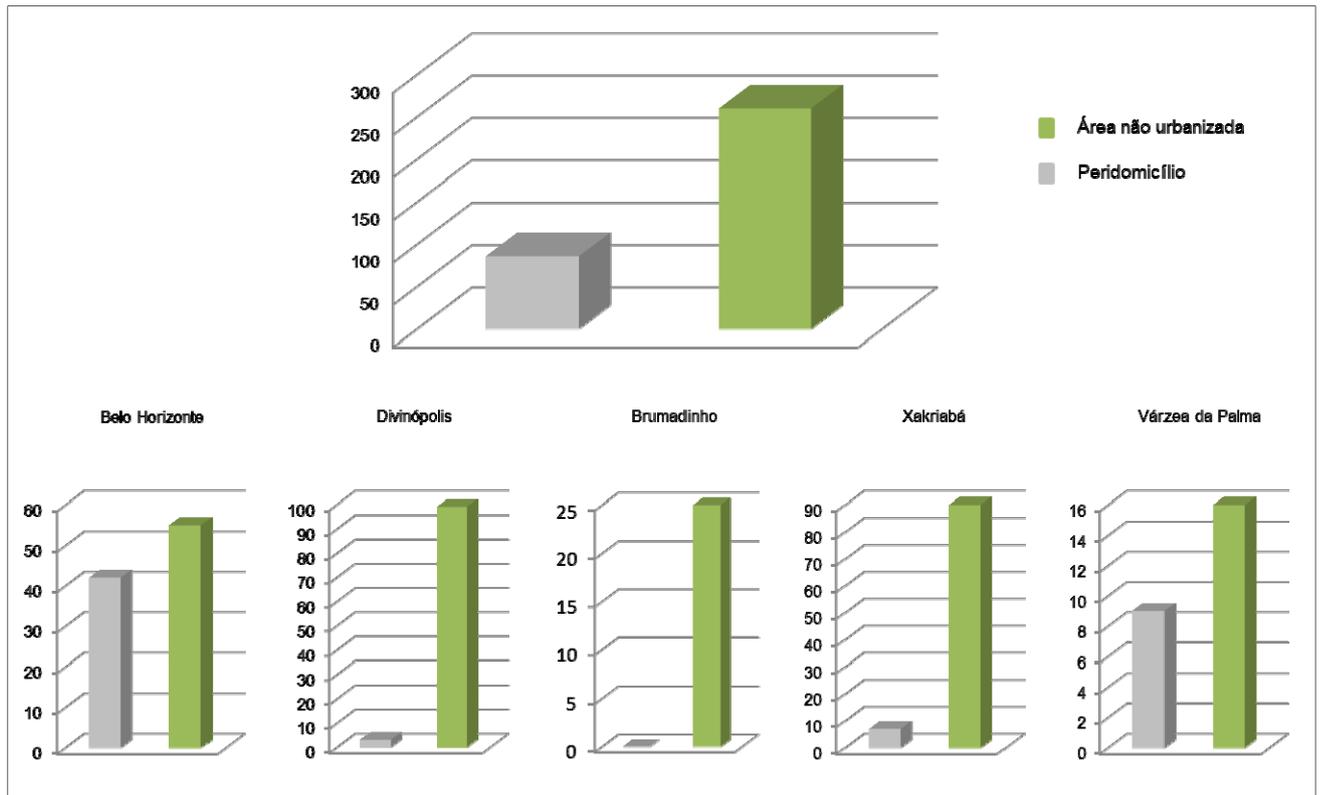


Figura 8: Gráfico representando o número de pequenos mamíferos capturados segundo a área de estudo e o ambiente de coleta.

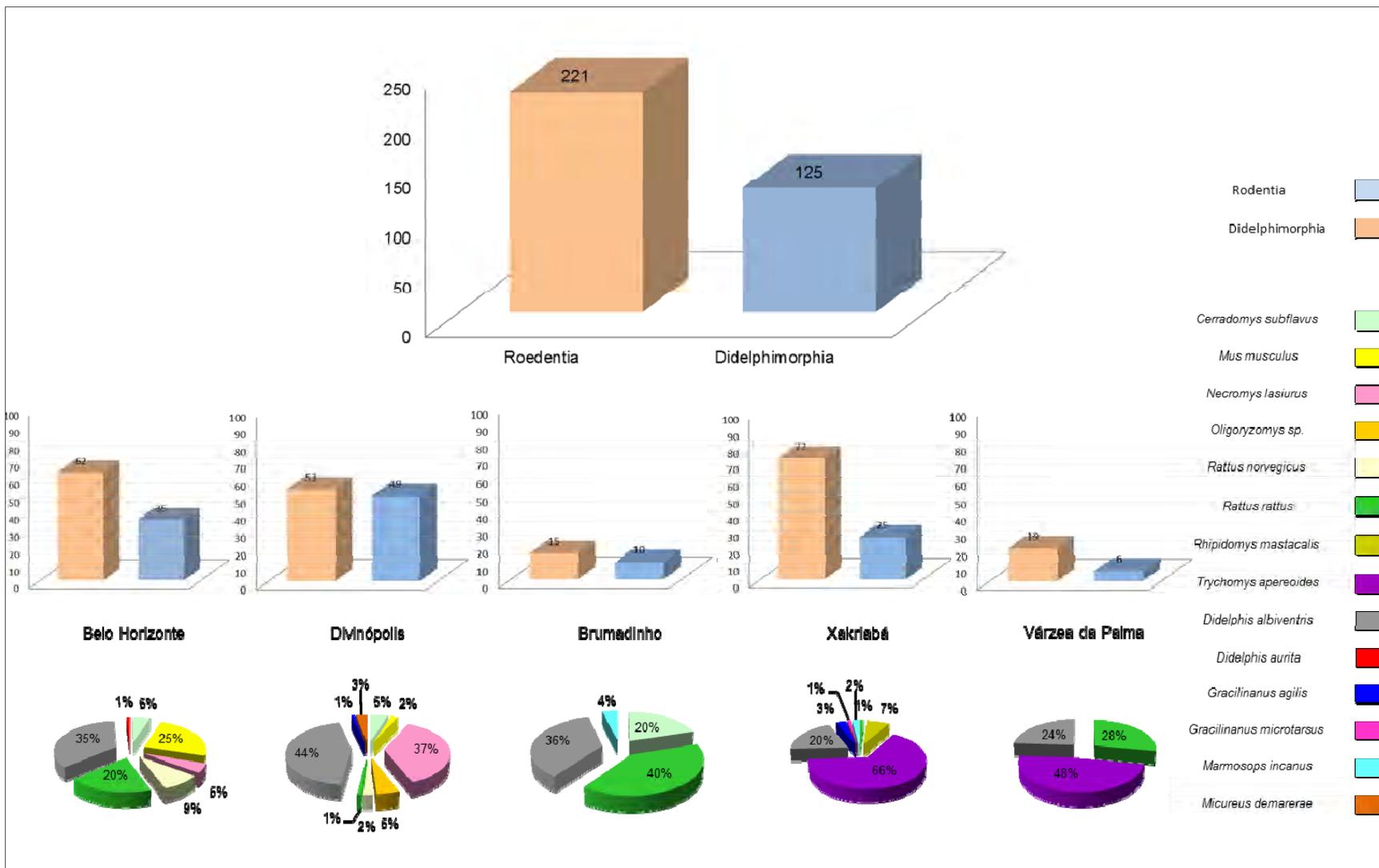


Figura 9: Gráfico representando o número de pequenos mamíferos capturados segundo a ordem e as espécies por área de estudo.

5.2 Detecção de *Leishmania* spp. nos pequenos mamíferos

Foram testadas amostras dos 346 animais utilizando um par de iniciadores que amplifica a região conservada do DNA minicircular do cinetoplasto de todas as espécies de *Leishmania* (Rodgers et al. 1990; Degraeve et al., 1994). Um total de 1519 amostras provenientes de diferentes tecidos (baço, fígado, medula, pele de cauda e pele de orelha) dos animais foi utilizado.

Dos 346 animais testados, 78 (22%) foram positivos em pelo menos um tecido. Apenas quatro espécies não apresentaram nenhum exemplar positivo por PCR dirigida ao kDNA: *Oligoryzomys* sp., *Didelphis aurita*, *Gracilinanus microtarsus* e *Micoureus demarerae*. Porém, essas espécies tiveram um baixo número de exemplares capturados (Tabela 3).

Espécie	Regional Nordeste		Divinópolis		Casa Branca		Xakriabá		Barra do Guaiçuí		TOTAL
	Peridomicílio	Área não urbanizada	Peridomicílio	Área não urbanizada	Peridomicílio (área verde)		Peridomicílio	Área não urbanizada	Peridomicílio	Área não urbanizada	
	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	
<i>Cerradomys subflavus</i>	-	1/5 (20)	-	1/5 (20)	1/5 (20)		-	-	-	-	3/15 (20)
<i>Mus musculus</i>	6/20 (30)	2/4 (50)	1/2 (50)	-	-		-	-	-	-	9/26 (35)
<i>Necomys lasiurus</i>	-	1/5 (20)	-	2/38 (5)	-		-	-	-	-	3/43 (7)
<i>Oligoryzomys sp.</i>	-	-	-	0/5	-		-	-	-	-	0/5
<i>Rattus norvegicus</i>	2/8 (25)	0/1	-	0/2	-		-	-	-	-	2/11 (18)
<i>Rattus rattus</i>	6/11 (55)	1/8 (13)	0/1	-	2/10 (20)	1/1 (100)	-	0/7	-	-	10/38 (26)
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-	-	-	-	-		-	3/7 (43)	-	-	3/7 (43)
<i>Thrichomys apereoides</i>	-	-	-	-	-		1/1 (100)	19/63 (44)	-	1/12 (8)	21/76 (28)
Total	14/39 (36)	5/23 (22)	1/3 (33)	3/50 (6)	3/15 (20)	2/2 (100)	22/70 (31)	0/7	1/12 (8)	51/221(23)	
<i>Didelphis albiventris</i>	1/3 (33)	7/31 (23)	-	5/45 (11)	2/9 (22)	1/5 (20)	5/14 (36)	0/2	1/4 (25)	22/113 (19)	
<i>Didelphis aurita</i>	-	0/1	-	-	-		-	-	-	-	0/1
<i>Gracilinanus agilis</i>	-	-	-	0/1	-		-	3/3 (100)	-	-	3/4 (75)
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	-	-	-	-	-		-	0/1	-	-	0/1
<i>Marmosops incanus</i>	-	-	-	-	1/1 (100)	-	1/2 (50)	-	-	-	2/3 (67)
<i>Micoureus demarerae</i>	-	-	-	0/3	-		-	-	-	-	0/3
Total	1/3 (33)	7/32 (22)	-	5/49 (10)	3/10 (30)	1/5 (20)	9/20 (45)	0/2	1/4 (25)	27/125 (22)	
Total	15/42 (36)	12/57 (21)	1/3 (33)	8/99 (8)	6/25 (24)	3/7 (43)	31/90 (34)	0/9	2/16 (13)	78/346 (23)	

Tabela 3: Resultado da PCR dirigida ao kDNA, por espécie, ambiente e área de estudo.

A porcentagem de animais positivos por área de estudo variou muito, sendo a maior observada na Terra Indígena Xakriabá (35%), seguido pela Regional Nordeste de Belo Horizonte (27%), Casa Branca (24%), Divinópolis (9%) e Barra do Guaicuí (8%) (Figura 10). Houve diferença significativa entre as positivities da Regional Nordeste e Divinópolis, Regional Nordeste e Barra do Guaicuí, Divinópolis e Xakriabá e Xakriabá e Barra do Guaicuí.

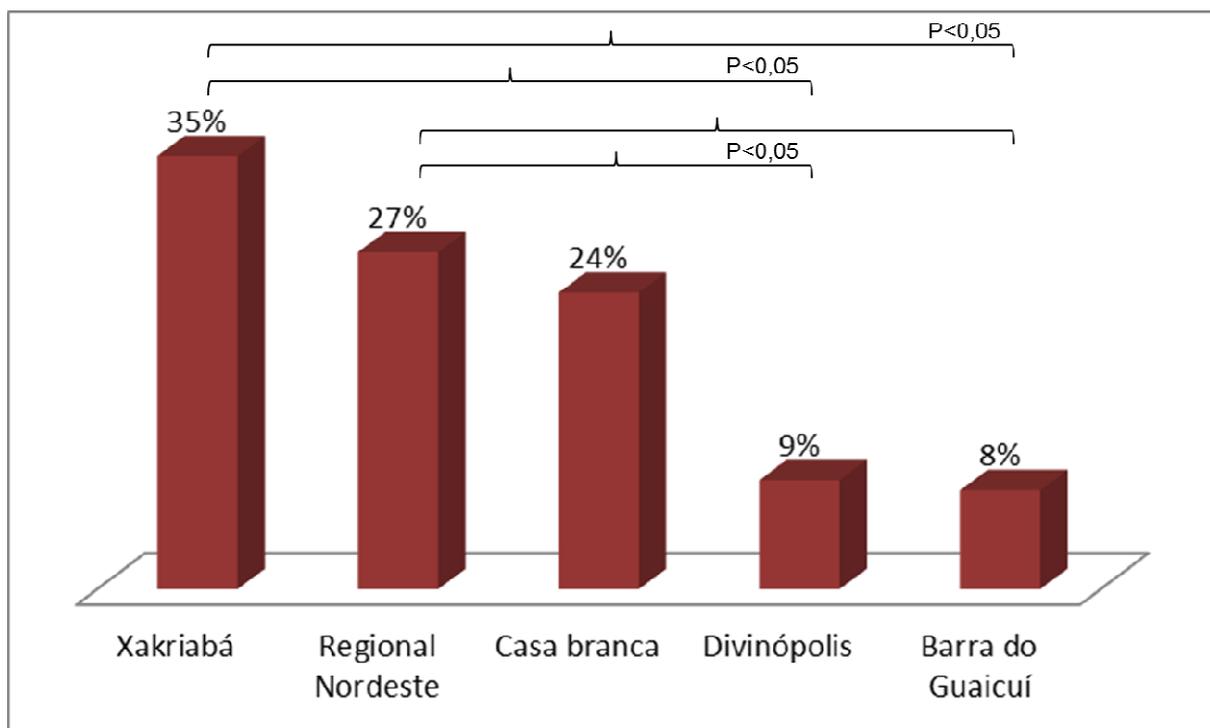


Figura 10: Percentual de positividade da PCR dirigida ao kDNA por área estudo.

Quanto às espécies capturadas, o maior percentual de positividade foi observado nas espécies *Marmosops incanus* (75%) e *Gracilinanus agilis* (67%), porém, essas duas espécies tiveram um número muito baixo de exemplares capturados. *Thrichomys apereoides* e *Didelphis albiventris* que tiveram um número expressivo de exemplares capturados (76 e 113 respectivamente) também tiveram uma positividade considerada alta (28% e 19%) (Figura 11).

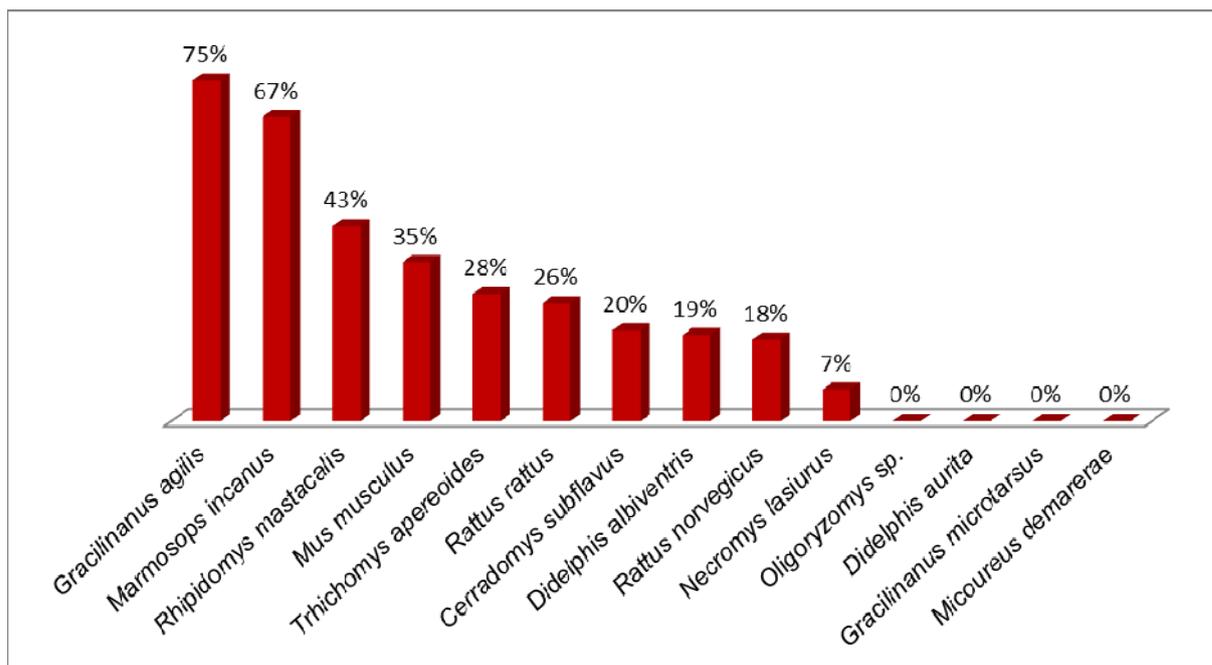


Figura 11: Gráfico representando a positividade da PCR dirigida ao kDNA por espécie amostrada.

Com relação aos tecidos (Tabela 4), o que apresentou maior positividade foi o fígado (14%), seguido por medula (9%), baço (6%), pele de orelha (5%) e pele de cauda (4%). Houve diferença significativa entre as positivities das amostras de medula e fígado, fígado e pele de cauda, fígado e pele de orelha e medula e pele de cauda (Figura 12).

Tabela 4: Positividade na PCR kDNA com relação à área de estudo e tecido utilizado.

Município	Tecidos					Total
	Fígado	Baço	Pele de orelha	Pele de cauda	Medula	
	+/total	+/total	+/total	+/total	+/total	
Regional Nordeste	12/99	5/99	4/99	-	7/99	28/396
Casa Branca	5/25	3/25	1/25	2/25	0/25	11/125
Divinópolis	2/102	3/102	5/102	1/102	-	11/408
Xakriabá	19/89	9/97	6/91	9/91	15/97	58/465
Barra do Guaicuí	1/25	0/25	1/25	0/25	0/25	2/125
Total	49/340	20/348	17/342	9/243	22/246	110/1519

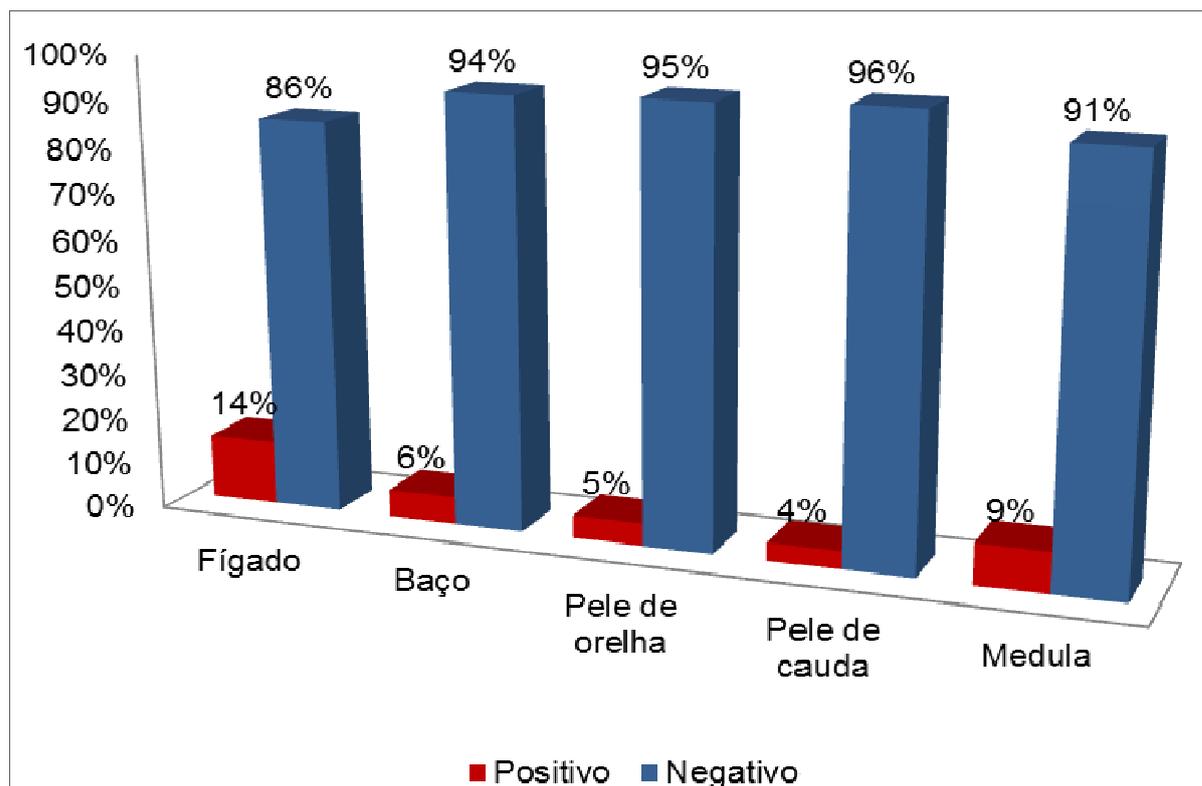


Figura 12: Gráfico representando o percentual de positividade na PCR kDNA por tecido coletado em pequenos mamíferos.

5.3 Identificação da espécie de *Leishmania*

Para a identificação da espécie de *Leishmania* todas as amostras foram submetidas à PCR dirigida ao *hsp70*, e dos 346 pequenos mamíferos, 58 (17%) foram positivos. 20 amostras que foram positivas na PCR kDNA não foram positivas na PCR *hsp70* e portanto não tiveram as espécies identificadas (Tabela 5). Vale ressaltar que todas as amostras positivas para o *hsp70* também foram positivas para o kDNA e que não foi observada diferença significativa quando comparados os dois alvos utilizados (kDNA e *hsp70*) ($p < 0,05$).

As amostras positivas para o *hsp70* foram submetidas à digestão pela enzima *Hae* III, e dentre estas, 41 (70,7%) apresentaram perfil condizente com *Leishmania braziliensis*, 12 (20,7%) com *Leishmania infantum* e 5 (8,6%) com *Leishmania guyanensis* (Figuras: 13, 14, 15, 16 e 17 e Tabela 6).

Tabela 5: Amostras positivas na PCR- kDNA que não foram identificadas pela RFLP *hsp70*

Espécie	Local				TOTAL
	Regional Nordeste	Divinópolis	Casa Branca	Xakriabá	
<i>Mus musculus</i>	4				4
<i>Rattus norvegicus</i>	1				1
<i>Rattus rattus</i>	4				4
<i>Rhipidomys mastacalis</i>				2	2
<i>Thrichomys apereoides</i>				4	4
<i>Didelphis albiventris</i>		2		2	4
<i>Marmosops incanus</i>			1		1
Total	9	2	1	8	20

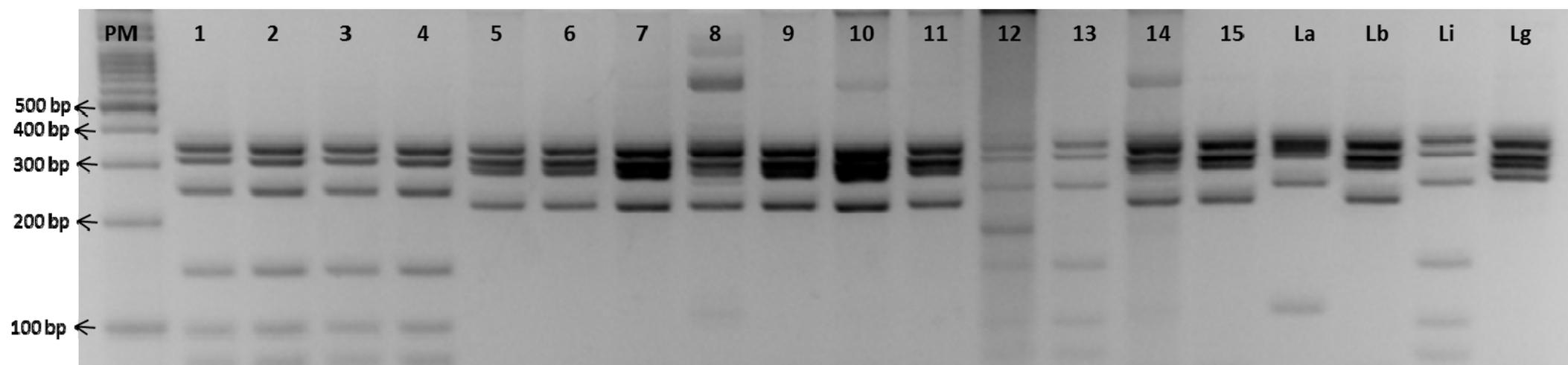


Figura 13: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos. PM – 100pb, La – cepa padrão *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 1 a 15 – amostras de DNA provenientes de tecidos dos pequenos mamíferos da Regional Nordeste de Belo Horizonte.

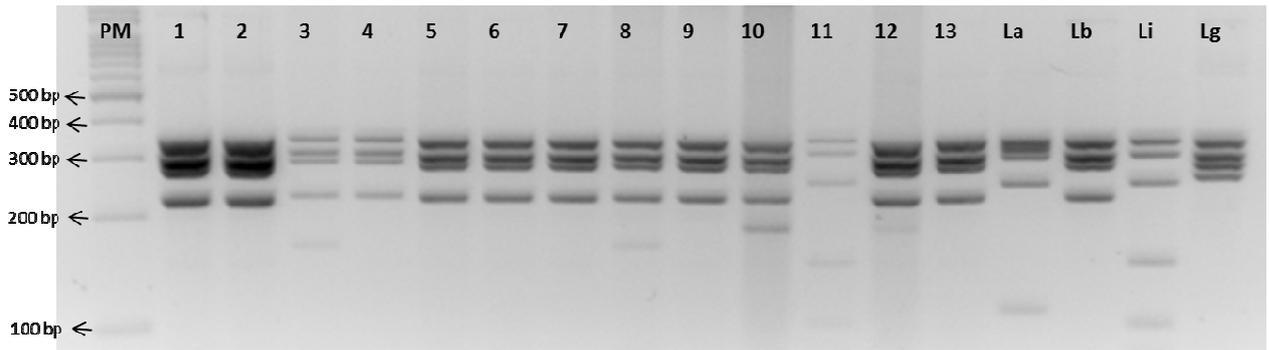


Figura 14: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaellI* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos. PM – 100pb, La – cepa padrão *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 1 a 13 – amostras de DNA provenientes de tecidos dos pequenos mamíferos da localidade Casa Branca no Município de Brumadinho.

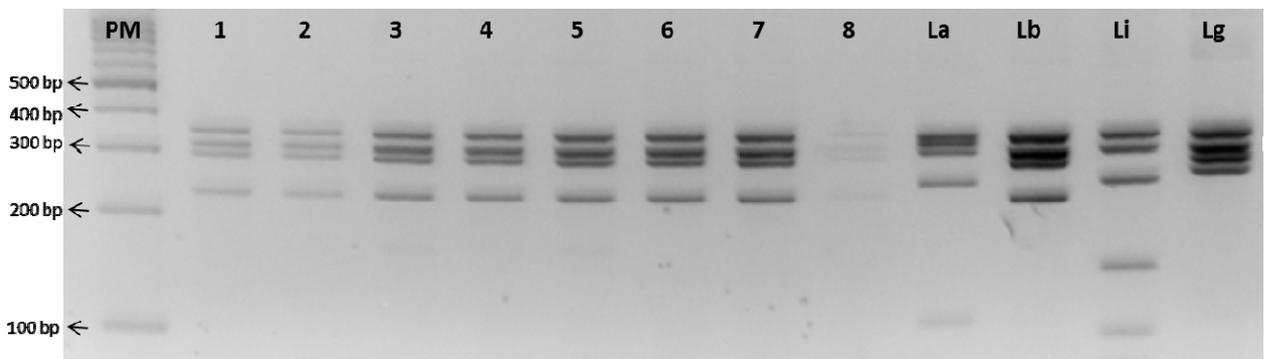


Figura 15: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaellI* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos. PM – 100pb, La – cepa padrão *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 1 e 2 - amostras de DNA provenientes de tecidos dos pequenos mamíferos de Barra do Guaicuí - Várzea da Palma. 3 a 8 - amostras de DNA provenientes de tecidos dos pequenos mamíferos de Divinópolis.

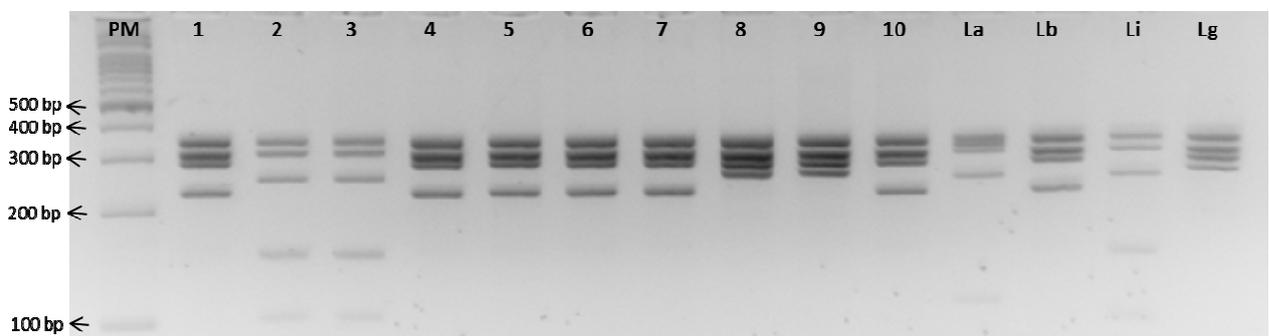


Figura 16: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaellI* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos. PM – 100pb, La – cepa padrão *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 1 a 8 – amostras de DNA provenientes de tecidos dos pequenos mamíferos da Terra Indígena Xakriabá.

Tabela 6: Espécie de *Leishmania* identificada através da RFLP-*hsp70* por espécie de pequeno mamífero e por área de estudo.

Pequenos Mamíferos	Espécie de <i>Leishmania</i>				
	Regional Nordeste	Casa Branca	Divinópolis	Xakriabá	Barra do Guaiçuí
<i>Cerradomys subflavus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)		
<i>Mus musculus</i>	<i>L. braziliensis</i> (2), <i>L. infantum</i> (2)		<i>L. infantum</i> (1)		
<i>Necromys lasiurus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)		<i>L. braziliensis</i> (2)		
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)				
<i>Rattus rattus</i>	<i>L. braziliensis</i> (2), <i>L. infantum</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1), <i>L. infantum</i> (1)		<i>L. infantum</i> (1)	
<i>Rhipidomys mastacalis</i>				<i>L. infantum</i> (1)	
<i>Thrichomys apereoides</i>				<i>L. braziliensis</i> (10), <i>L. infantum</i> (2), <i>L. guyanensis</i> (4)	<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. braziliensis</i> (5), <i>L. infantum</i> (3)	<i>L. braziliensis</i> (2)	<i>L. braziliensis</i> (3)	<i>L. braziliensis</i> (4)	<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Gracilinanus agilis</i>				<i>L. braziliensis</i> (3)	
<i>Marmosops incanus</i>				<i>L. guyanensis</i> (1)	

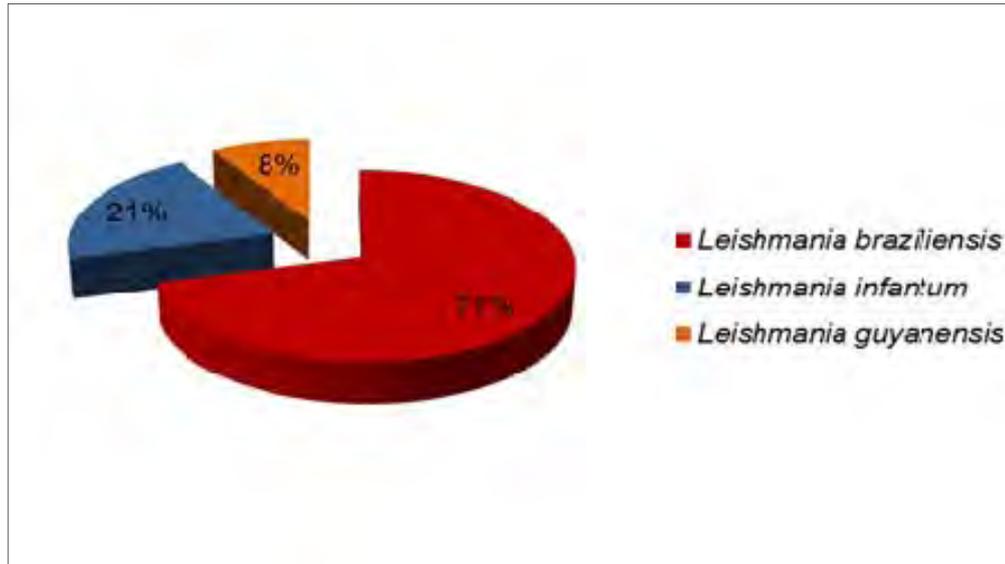


Figura 17: Gráfico representando as espécies de *Leishmania* identificadas nos pequenos mamíferos nas áreas de estudo.

Foi observado que a espécie *L. (V.) braziliensis* foi encontrada infectando uma maior variedade de espécies de pequenos mamíferos. Já *L. (L.) infantum*, foi encontrada infectando, em sua maioria animais introduzidos e sinantrópicos. *L.(V.) guyanensis*, que apresentou um menor número de animais infectados, foi encontrada apenas em espécies silvestres (Figura 18).

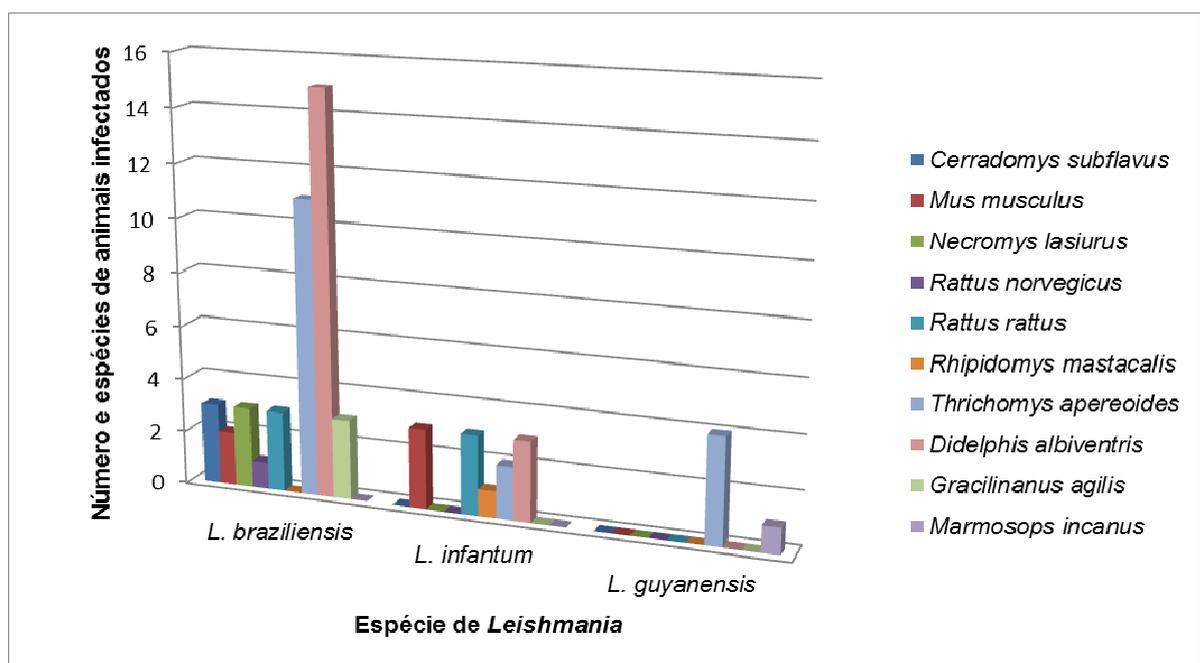


Figura 18: Gráfico representando as espécies de *Leishmania* identificadas de acordo com as espécies de animais capturados.

5.3.1 Espécie de *Leishmania* por área estudada e tipo de tecido avaliado

Serão apresentados os resultados da identificação das espécies de *Leishmania* de cada área estudada de acordo com o tecido analisado.

Nos pequenos mamíferos capturados na regional Nordeste, a maioria das amostras de fígado analisadas estavam infectadas com *L. braziliensis* (89%). Cinquenta por cento das amostras de baço estavam infectadas com *L. braziliensis* e 50% com *L. infantum*. Cem por cento das amostras de pele de orelha estavam infectadas com *L. infantum* e 100% das amostras de medula com *L. braziliensis* (Tabela 7).

Tabela 7: Espécies de *Leishmania* detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste.

Espécie	Regional Nordeste			
	Tecido			
	Fígado	Baço	Pele de orelha	Medula
<i>Cerradomys subflavus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)			
<i>Mus musculus</i>	<i>L. braziliensis</i> (2) <i>L. infantum</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. infantum</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Necomys lasiurus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)			
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)			
<i>Rattus rattus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. infantum</i> (1)		<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. braziliensis</i> (2)	<i>L. braziliensis</i> (1) <i>L. infantum</i> (1)	<i>L. infantum</i> (2)	<i>L. braziliensis</i> (2)

Nos pequenos mamíferos coletados no Município de Divinópolis, apenas uma amostra de pele de cauda de *M. musculus* estava infectada por *L. infantum*. Todas as outras amostras estavam infectadas por *L. braziliensis* (Tabela 8).

Tabela 8: Espécies de *Leishmania* detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados em Divinópolis.

Espécie	Divinópolis			
	Tecido			
	Fígado	Baço	Pele de cauda	Pele de orelha
<i>Cerradomys subflavus</i>				<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Mus musculus</i>			<i>L. infantum</i> (1)	
<i>Necromys lasiurus</i>		<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)		<i>L. braziliensis</i> (1)

Na Localidade Casa Branca, duas amostras de *R. rattus* estava infectadas por *L. infantum*, uma de fígado e uma de baço. Todas as outras amostras estavam infectadas por *L. braziliensis* (Tabela 9).

Tabela 9: Espécies de *Leishmania* detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados na Localidade Casa Branca.

Espécie	Casa Branca			
	Tecido			
	Fígado	Baço	Pele de cauda	Pele de orelha
<i>Cerradomys subflavus</i>	<i>L. braziliensis</i> (1)		<i>L. braziliensis</i> (1)	
<i>Rattus rattus</i>	<i>L. infantum</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1) <i>L. infantum</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)	
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. braziliensis</i> (2)	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)

Na Terra Indígena Xakriabá, 78% das amostras de fígado estavam infectadas por *L. braziliensis*, 11% por *L. infantum* e 11% por *L. guyanensis*. Nas amostras de baço, 57% por *L. braziliensis*, 29 por *L. infantum* e 14 por *L. guyanensis*. Cem por cento das amostras de pele de cauda estavam infectadas por *L. braziliensis*, e das amostras de pele de orelha, 50% por *L. braziliensis* e 50% por *L. guyanensis*. E nas amostras de medula, 63% apresentaram infecção por *L. braziliensis*, 12% por *L. infantum* e 25% por *L. guyanensis* (Tabela 10).

Tabela 10: Espécies de *Leishmania* detectadas nos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados na Terra Indígena Xakriabá.

Espécie	Xakriabá				
	Tecido				
	Fígado	Baço	Pele de cauda	Pele de orelha	Medula
<i>Rattus rattus</i>		<i>L. infantum</i> (1)			
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	<i>L. infantum</i> (1)				
<i>Thrichomys apereoides</i>	<i>L. braziliensis</i> (4) <i>L. guyanensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (3) <i>L. infantum</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (5)	<i>L. braziliensis</i> (1) <i>L. guyanensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (3) <i>L. guyanensis</i> (2) <i>L. infantum</i> (1)
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. braziliensis</i> (3)	<i>L. braziliensis</i> (1)			<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Gracilinanus agilis</i>			<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)
<i>Marmosops incanus</i>		<i>L. guyanensis</i> (1)		<i>L. guyanensis</i> (1)	

Os dois únicos pequenos mamíferos positivos capturados em Várzea da Palma estavam infectados por *L. braziliensis*, sendo um deles em amostra de fígado (*Thrichomys apereoides*) e o outro em amostra de pele de orelha (*Didelphis albiventris*).

L. braziliensis foi encontrada infectando todos os tipos de tecidos analisados, e podemos observar que a pele de orelha se mostrou eficiente na detecção das três espécies de *Leishmania* encontradas nos animais avaliados (Figura 19).

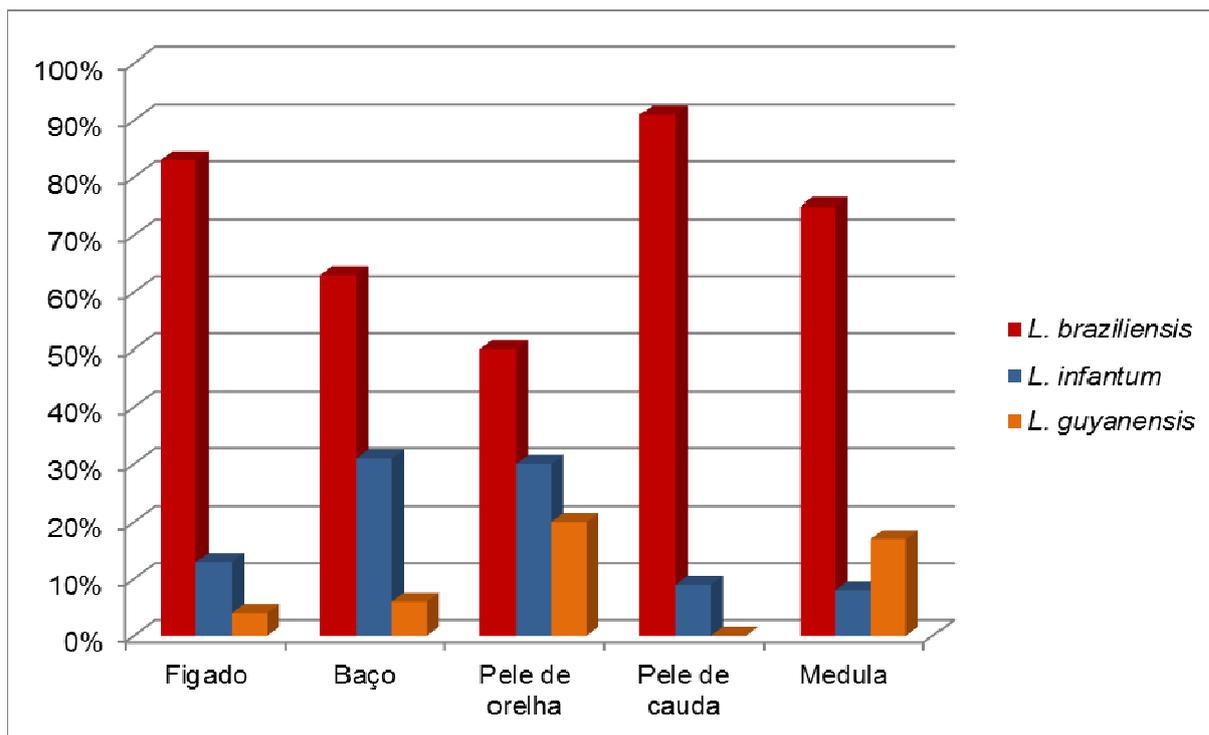


Figura 19: Espécie de *Leishmania* identificada pela PCR-RFLP do hsp70 de acordo com o tecido.

5.4 Quantificação da carga de *Leishmania* nos pequenos mamíferos coletados nas áreas de estudo de Minas Gerais

Os dados obtidos a partir dos diferentes experimentos de qPCR kDNA com DNA extraído dos tecidos dos pequenos mamíferos e as diferenças estatísticas detectadas nas análises estão apresentadas em forma de gráficos e tabelas.

Testes não-paramétricos foram utilizados, devido ao pequeno número de amostras positivas, a fim de comparar a carga parasitária entre as categorias de algumas variáveis (Teste de Kruskal-Wallis, Teste de Mann-Whitney). Foram consideradas variáveis independentes as amostras de diferentes tecidos do mesmo hospedeiro.

Primeiramente serão apresentadas as análises realizadas com os resultados obtidos em cada uma das áreas estudadas seguida da análise conjunta dos dados das áreas por espécie e tipo de tecido avaliado.

5.4.1 Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste de Belo Horizonte

Dos 27 exemplares positivos foram analisadas 28 amostras e a média da carga parasitária (parasitos/mg) observada foi de 0,768 e desvio-padrão de 0,91. A carga teve valores variando de 0,017 a 3,24 parasitos/mg.

Na figura 20 estão mostradas as comparações da carga parasitária nas amostras em relação ao ambiente de coleta dos animais (A), a espécies de mamífero (B), à espécie de *Leishmania* identificada (C) e o tipo de tecido analisado (D).

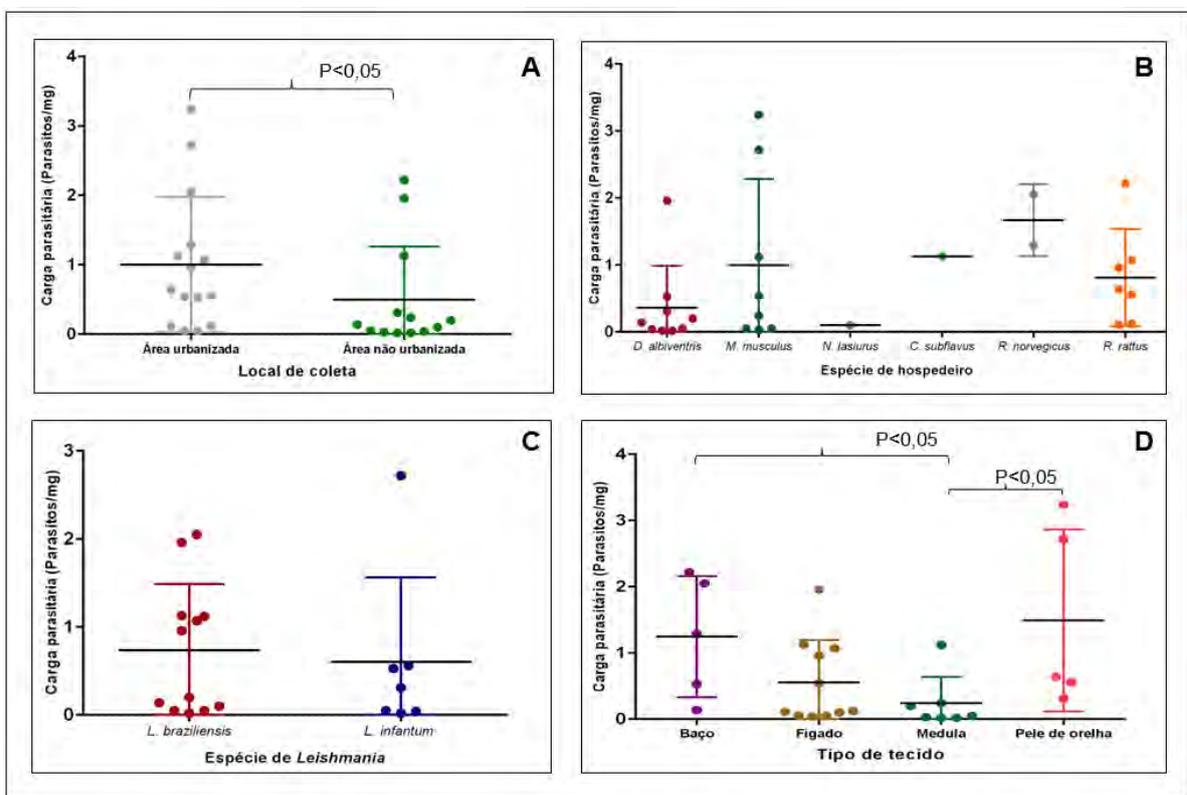


Figura 20: Gráfico representando os resultados de qPCR realizada com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos da regional Nordeste de Belo Horizonte em relação ao local de coleta (A), à espécie do hospedeiro (B), à espécie de *Leishmania* (C) e ao tipo de tecido (D).

Há diferença estatisticamente significativa, entre as distribuições das cargas parasitárias segundo o ambiente de coleta, sendo maior em amostras coletadas no peridomicílio. As medianas das cargas parasitárias também se diferem entre os tipos de tecidos, sendo esta diferença significativa entre baço e medula, e

entre medula e pele de orelha. Não há diferença significativa de carga parasitária segundo espécie de hospedeiro e segundo espécie de *Leishmania* (Figura 20).

5.4.2 Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados em Divinópolis

Das 11 amostras analisadas, a média da carga parasitária (parasitos/mg) observada foi de 18,8 e desvio-padrão de 28,0. A carga teve valores variando de 0,07 a 94,9 parasitos/mg. A figura 21 representa os resultados das análises das quantificações da carga parasitária realizadas com amostras de diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados no peridomicílio e em áreas verdes do município de Divinópolis.

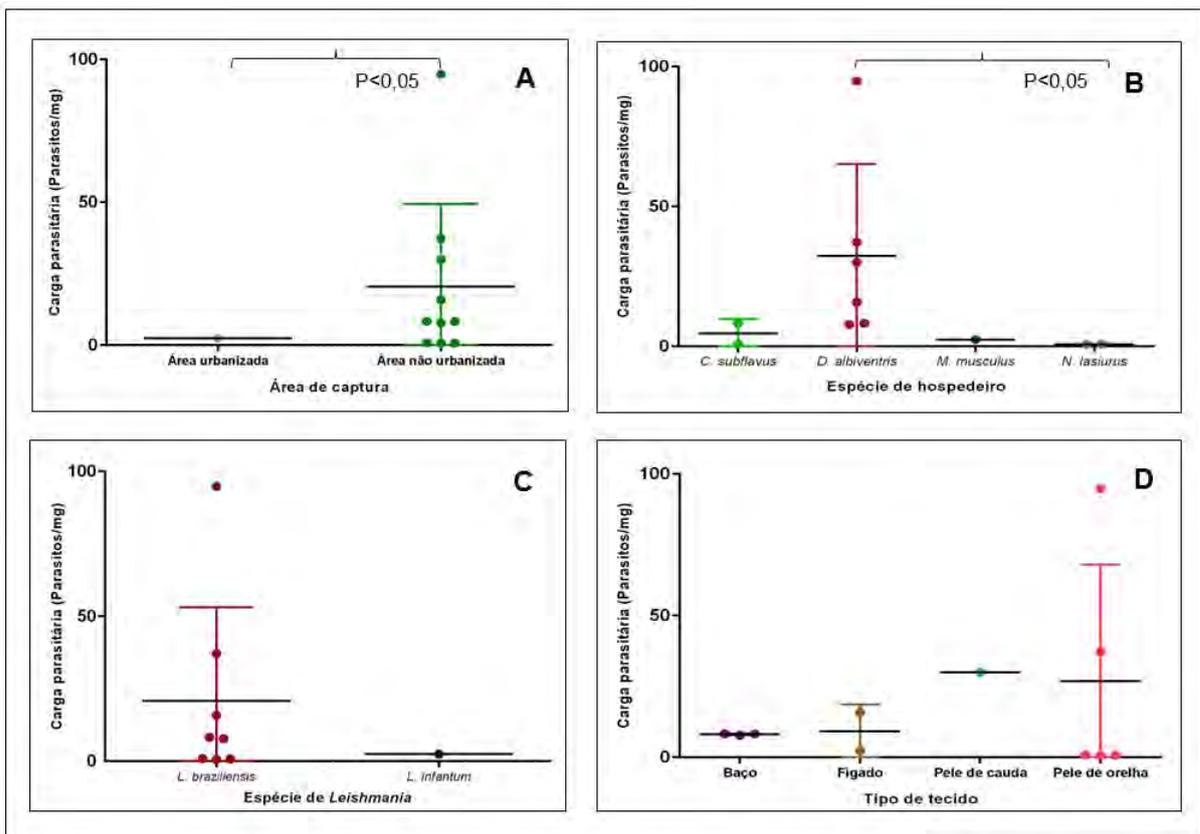


Figura 21: Gráfico representando os resultados de qPCR realizada com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos de Divinópolis em relação ao local de coleta (A), à espécie do hospedeiro (B), à espécie de *Leishmania* (C) e ao tipo de tecido (D).

Há diferença estatisticamente significativa entre as distribuições das cargas parasitárias segundo o local de coleta, sendo maior em amostras coletadas em áreas verdes. As cargas parasitárias também são diferentes entre as espécies de

hospedeiros *Didelphis albiventris* e *Necromys lasiurus*, sendo mais elevada na primeira. Não há diferença significativa de carga parasitária segundo o tipo de tecido e espécie de *Leishmania* (Figura 21).

5.4.3 Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados na localidade Casa Branca em Brumadinho

Das 11 amostras analisadas, a média da carga parasitária (parasitos/mg) observada foi de 12,1 e desvio-padrão de 30,1. A carga teve valores variando de 0,7 a 102,5 parasitos/mg. A figura 22 representa os resultados das análises das quantificações da carga parasitária realizadas com amostras de diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados no peridomicílio localizado em área verde da Localidade Casa Branca, no Município de Brumadinho.

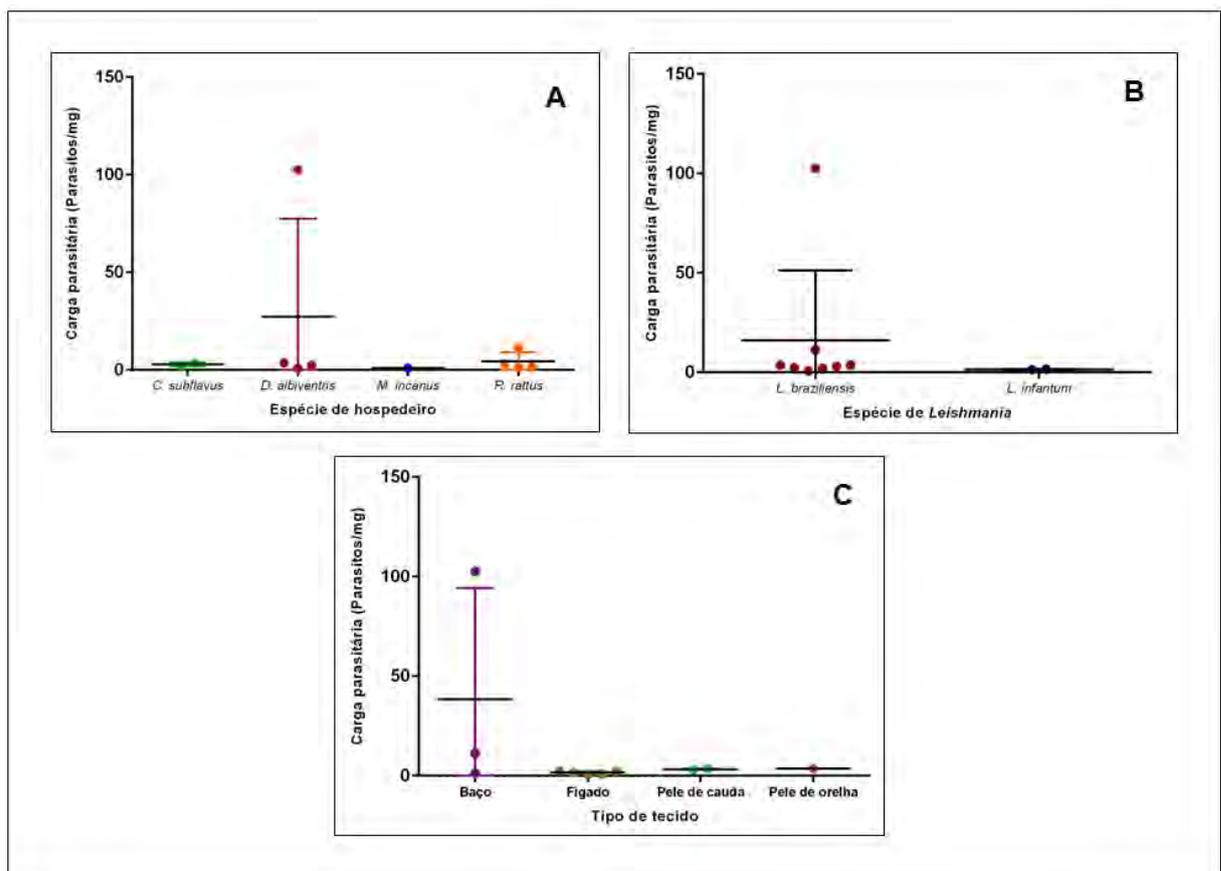


Figura 22: Gráfico representando os resultados de qPCR realizada com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos de Brumadinho em relação à espécie do hospedeiro (A), à espécie de *Leishmania* (B) e ao tipo de tecido (C).

A totalidade de amostras foi coletada em área verde. Não há diferença significativa nas distribuições da carga parasitária segundo espécie de hospedeiro, tipo de tecido e espécie de *Leishmania* (Figura 22).

5.4.4 Análise da carga parasitária dos pequenos mamíferos capturados na Terra Indígena Xakriabá

Das 57 amostras analisadas, a média da carga parasitária (parasitos/mg) observada foi de 103,6 e desvio-padrão de 163,5. A carga teve valores variando de 1,16 a 508,8 parasitos/mg. A figura 23 representa os resultados das análises das quantificações da carga parasitária realizadas com amostras de diferentes tecidos dos pequenos mamíferos capturados no peridomicílio e em área verde na Terra Indígena Xakriabá.

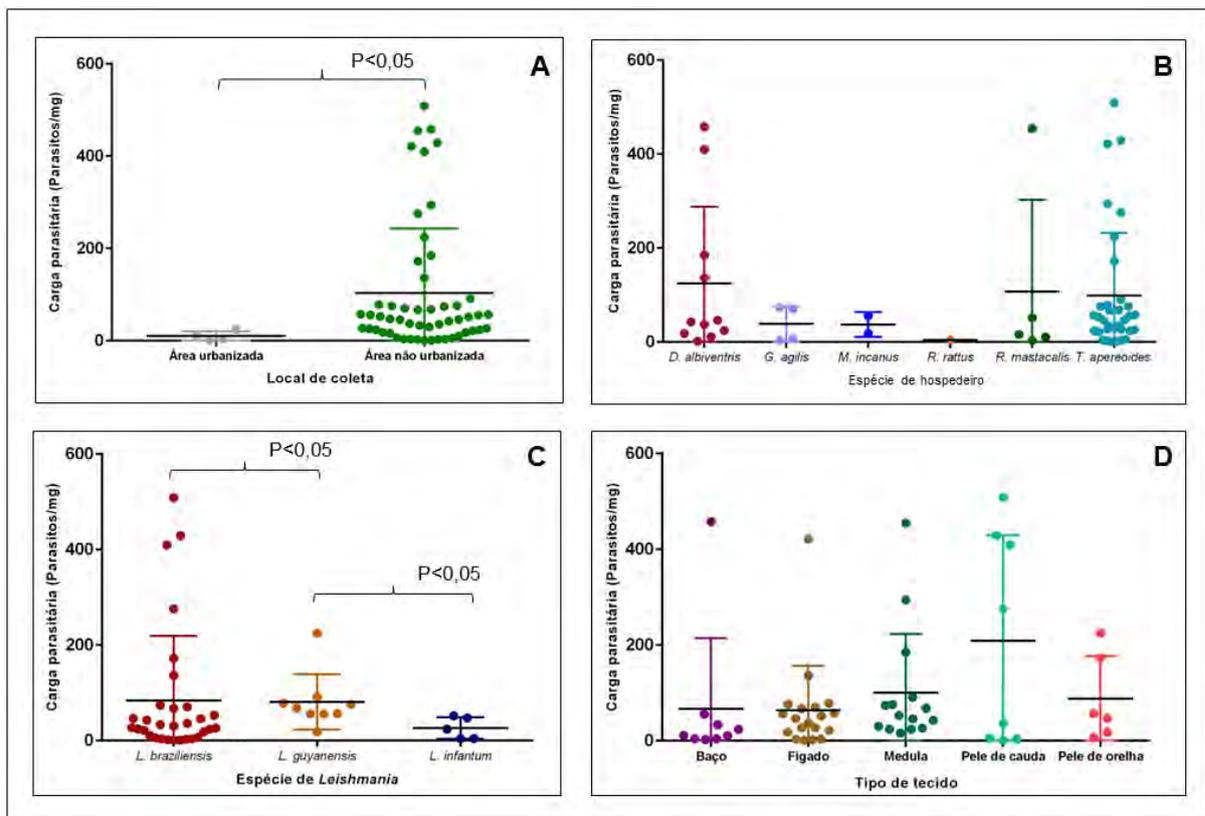


Figura 23: Gráfico representando os resultados de qPCR realizada com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos da Terra Indígena Xakriabá em relação ao local de coleta(A), à espécie do hospedeiro (B), à espécie de *Leishmania* (C) e ao tipo de tecido (D).

Há diferença estatisticamente significativa, entre as distribuições das cargas parasitárias segundo o local de coleta, sendo maior em amostras coletadas em área não urbanizada. As distribuições das cargas parasitárias foram diferentes entre as espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* e entre *L. guyanensis* e *L. infantum*. Não há diferença significativa da carga parasitária segundo o tipo de tecido e espécie de hospedeiro (Figura 23).

5.4.5 Análise conjunta das áreas estudadas

A seguir serão apresentados os resultados numéricos referentes às análises da carga parasitária nos pequenos mamíferos, considerando todas as áreas estudadas. Na tabela 11 estão representadas as médias de parasitos/mg das espécies capturadas.

Tabela 11: Carga parasitária média (parasitos/mg) por espécie de hospedeiro e por área de estudo.

Espécie	Local de captura				
	Belo Horizonte	Divinópolis	Brumadinho	Xakriabá	Várzea da Palma
<i>Cerradomys subflavus</i>	1,13	4,62	2,86	-	-
<i>Mus musculus</i>	1	2,46	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	0,10	0,74	-	-	-
<i>Rattus norvegicus</i>	1,67	-	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	0,81	-	4,31	4,6	-
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-	-	-	107,3	-
<i>Thrichomys apereoides</i>	-	-	-	99,08	13,88
<i>Didelphis albiventris</i>	0,36	32,35	27,33	163,39	1,06
<i>Gracilinanus agilis</i>	-	-	-	38,74	-
<i>Marmosops incanus</i>	-	-	0,95	37,03	-

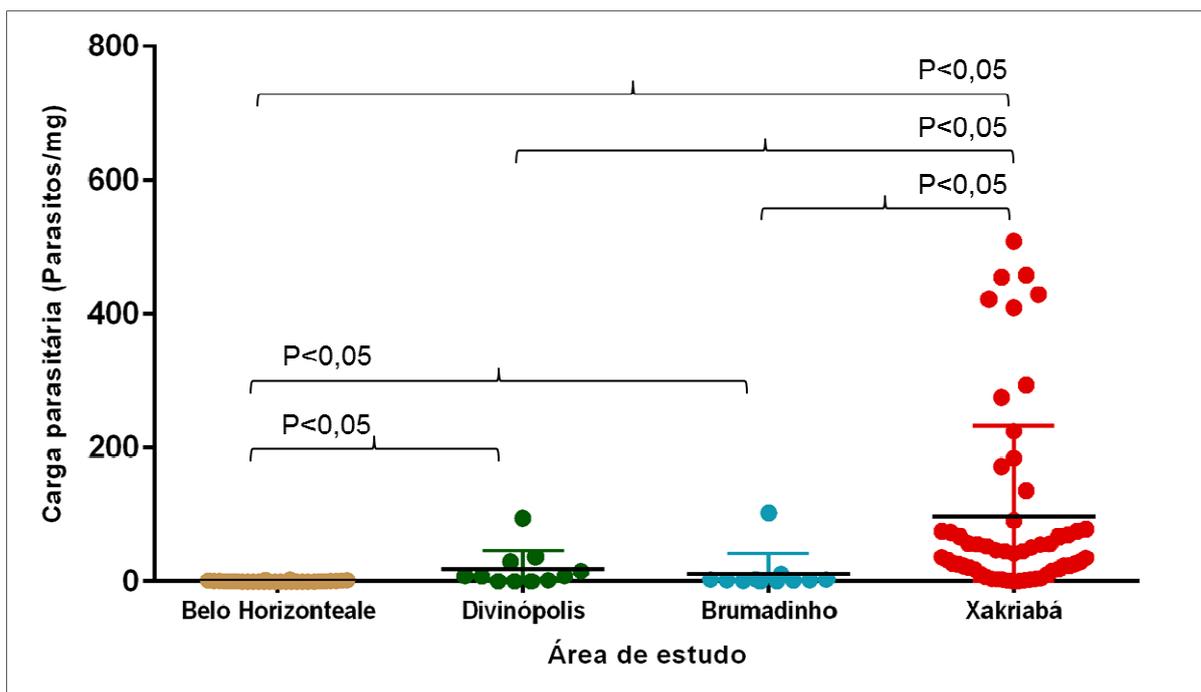


Figura 24: Gráfico representando os resultados de qPCR realizado com amostras de DNA extraído de pequenos mamíferos das áreas de estudo.

Pela análise da figura 24 podemos observar que a carga parasitária nos pequenos mamíferos da Terra Indígena Xakriabá é estatisticamente maior que nas outras áreas. Também foi observada diferença significativa entre Belo Horizonte e Divinópolis e Belo Horizonte e Brumadinho.

As amostras dos pequenos mamíferos de Várzea da Palma não foram utilizadas para a realização das análises devido ao pequeno número de exemplares positivos (2).

Considerando que nem todas as espécies foram capturadas em todas as áreas de estudo, e mesmo capturadas algumas espécies não apresentaram nenhuma amostra positiva em determinada área, serão feitas as seguintes comparações:

Com relação à carga parasitária por espécie de animal capturado nas áreas de estudo, serão apresentadas as análises dos pequenos mamíferos que tiveram um número de exemplares com a carga parasitária quantificada suficiente para a realização de testes estatísticos.

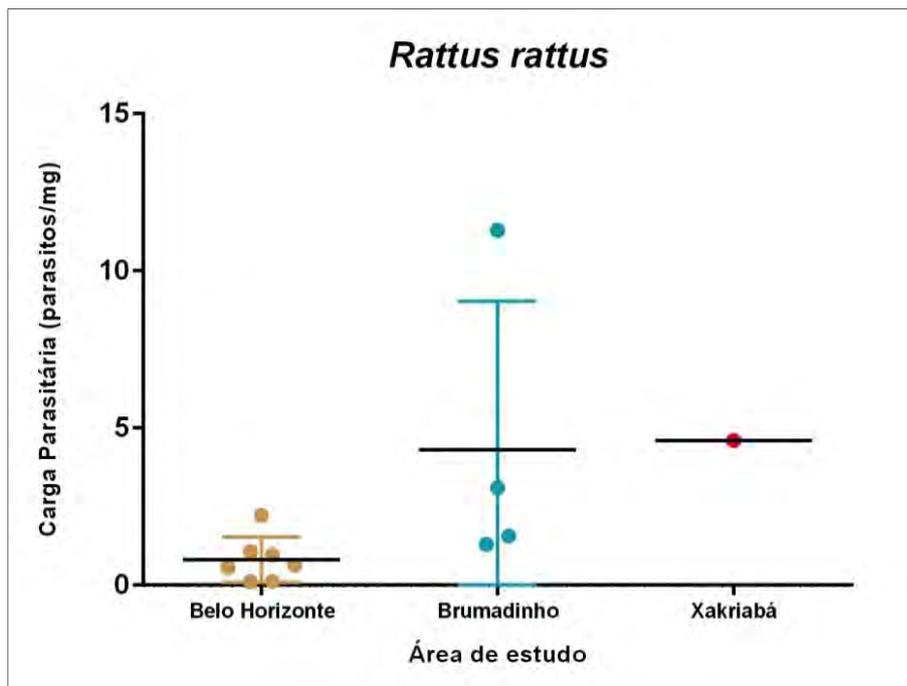


Figura 26: Gráfico representando a carga parasitária de *Leishmania* na espécie *Rattus rattus* com relação à área de captura.

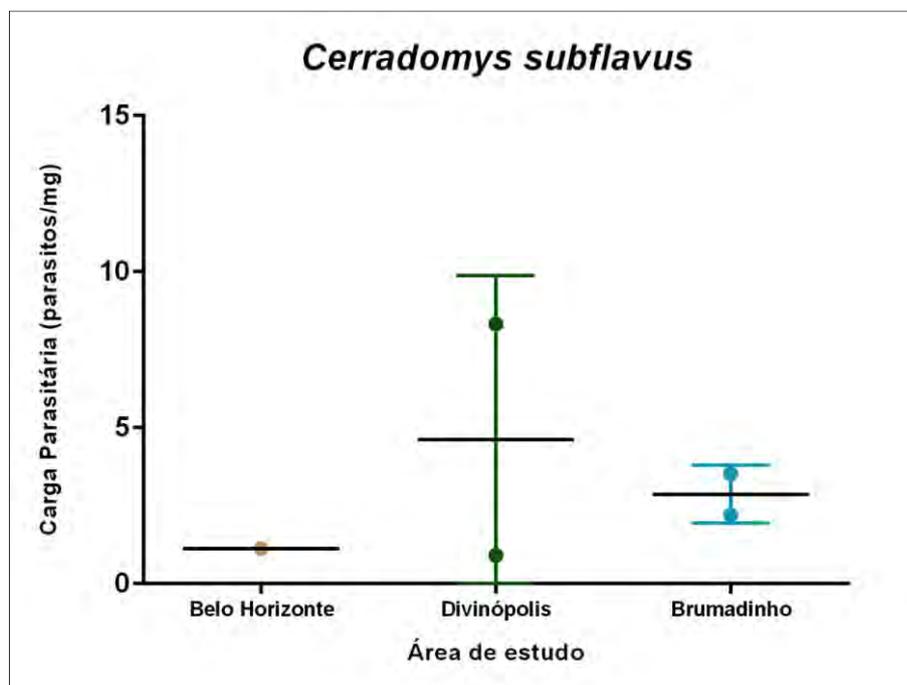


Figura 27: Gráfico representando a carga parasitária de *Leishmania* na espécie *Cerradomys subflavus* com relação à área de captura.

Com relação ao tipo de tecido, na tabela 12 estão representados os valores médios da carga parasitária de *Leishmania* por espécie de animal.

Tabela 12: Carga parasitária média (parasitos/mg) por espécie de hospedeiro e por tipo de tecido.

Espécie	Tipo de tecido				
	Fígado	Baço	Pele de cauda	Pele de orelha	Medula
<i>Cerradomys subflavus</i>	1,67	8,33	3,52	0,91	-
<i>Mus musculus</i>	0,77	-	-	2,98	0,46
<i>Necromys lasiurus</i>	0,10	-	-	0,74	-
<i>Rattus norvegicus</i>	-	1,67	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	0,77	4,85	3,1	0,6	-
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	27,5	10,58	-	-	235,46
<i>Thrichomys apereoides</i>	71,01	15,96	209,42	125,42	78,73
<i>Didelphis albiventris</i>	26,05	141,23	219,7	23,13	36,35
<i>Gracilinanus agilis</i>	70,61	-	3,54	6,82	74,01
<i>Marmosops incanus</i>	0,95	55,74	-	18,32	-

Com relação às espécies que tiveram um número suficiente de amostras quantificadas para a realização de testes estatísticos, o roedor *Rattus rattus* apresentou uma carga parasitária maior em amostras de baço em relação a amostras de fígado, pele de cauda e pele de orelha (Figura 28).

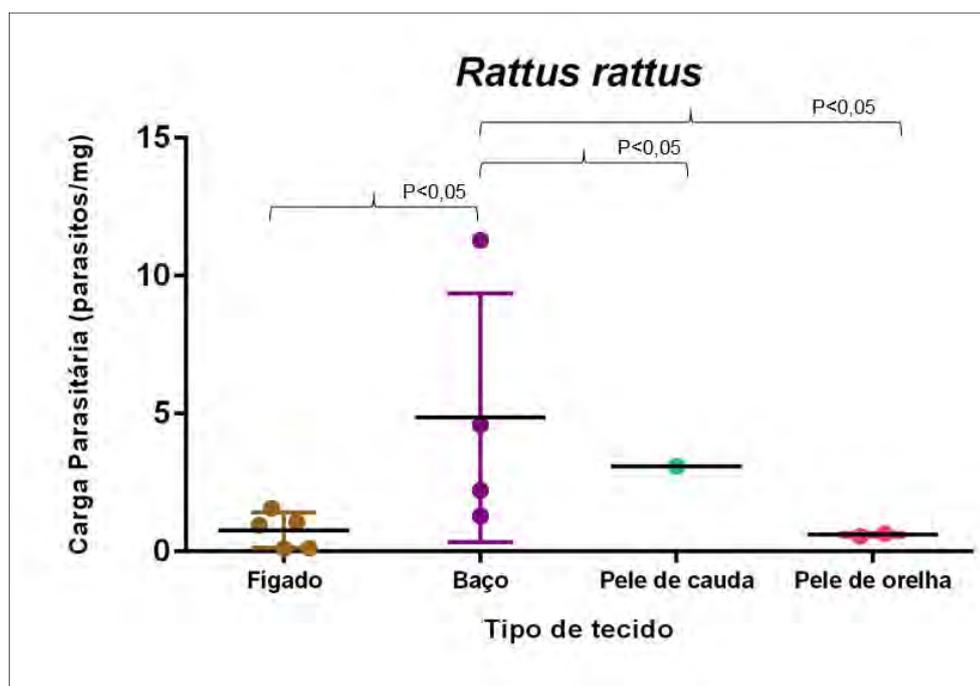


Figura 28: Gráfico representando a carga parasitária de *Leishmania* na espécie *Rattus rattus* com relação ao tipo de tecido.

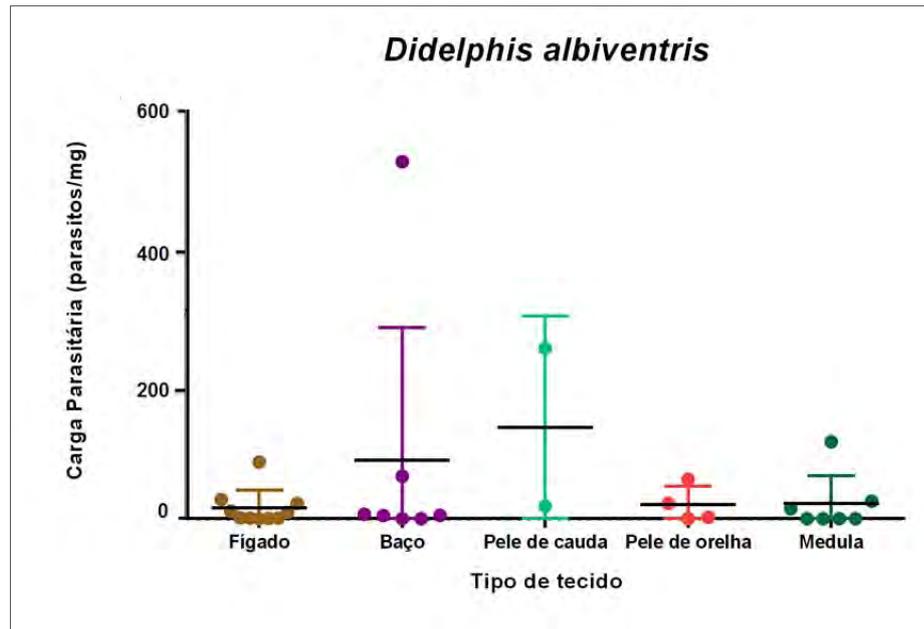


Figura 31: Gráfico representando a carga parasitária de *Leishmania* na espécie *Didelphis albiventris* com relação ao tipo de tecido.

Com relação às espécies dos animais, independente da área de estudo, foram realizadas análises comparando as cargas parasitárias nas peles. Este tecido foi escolhido por sua importância na transmissão da doença por ser o primeiro a ter contato com o parasito durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo infectado.

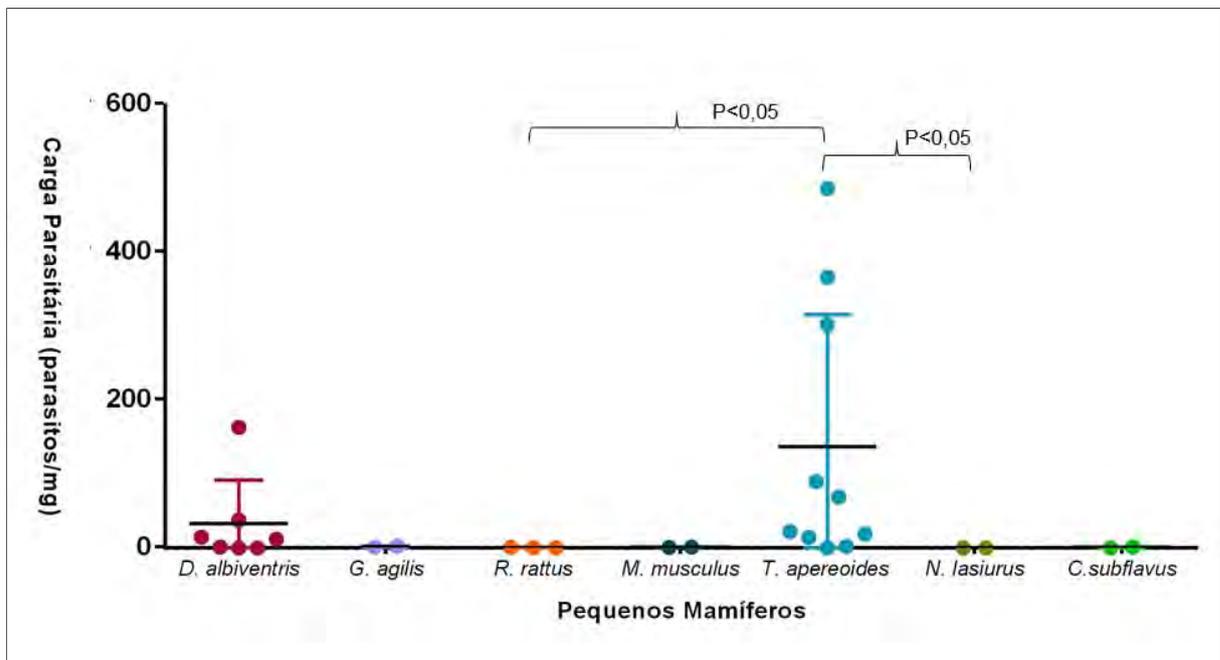


Figura 32: Gráfico representando os resultados de qPCR realizado com amostras de DNA extraído das peles dos pequenos mamíferos capturados nas áreas estudadas.

Foi observada diferença estatisticamente significativa apenas entre *Thrichomys apereoides* e *Rattus rattus*, e *Thrichomys apereoides* e *Necromys lasiurus*.

6 Discussão

O papel desempenhado pelos diferentes hospedeiros mamíferos da maioria das espécies de *Leishmania* ainda é pouco compreendido, o que reforça a necessidade de estudos que verificam a distribuição destes parasitos em outros mamíferos além daqueles classicamente descritos como reservatórios (Cássia-Pires et al., 2014).

Os cães são historicamente apontados como reservatórios de *L. (L.) infantum*. A Leishmaniose visceral canina, assim como a doença humana está bastante disseminada no país. A importância da infecção canina é destacada por várias razões, como o convívio do cão e sua aproximação com o homem, o fato de servir de fonte de repasto para o flebotomíneo, atraindo o vetor para perto do homem, alta densidade populacional canina, a susceptibilidade que o cão apresenta à *L. (L.) infantum* e a existência de um grande número de cães assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo (Killick-Kendrick et al., 1997).

A discussão do papel do cão na epidemiologia da LTA é ainda controversa. Alguns autores consideram o cão apenas um hospedeiro acidental, assim como o homem (Laison & Shaw, 1970). Outros, entendem o papel do cão como elo de ligação dos animais silvestres para o homem, no ciclo epidemiológico da doença (Coutinho et al., 1985; Pirmez et al., 1988).

As medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil para a leishmaniose visceral são a eliminação de cães soropositivos, combate ao inseto vetor e tratamento dos casos humanos. Porém essas medidas não estão se mostrando eficientes para conter o ciclo de transmissão nas áreas endêmicas e o que está sendo observado é o aumento do número de casos humanos e caninos. Este fato sugere que a epidemiologia das leishmanioses, especialmente em relação à leishmaniose visceral, apresenta um quadro mais complexo do que o classicamente descrito. A persistência das leishmanioses em áreas alteradas indica a ocorrência de uma transmissão secundária, peridoméstica destes parasitos, o que aponta a necessidade de estudos mais aprofundados sobre outros possíveis reservatórios de *Leishmania* spp.

É dito que o parasito e seus hospedeiros coadaptam-se de maneira a conviverem em certa harmonia. Que quanto menores forem os danos causados pelo

parasito ao hospedeiro e quanto mais constante for a incidência da infecção em dada população, mais antiga e equilibrada deve ser a relação entre eles (Ashford, 1996; Ávila-Pires, 2005). Entretanto, sabe-se que essa relação antiga entre parasito-hospedeiro não evolui necessariamente para uma relação harmônica, mas para uma que favoreça a maior transmissibilidade do parasito, sendo esta dependente de sua estratégia reprodutiva (Giorgio, 1995; Woolhouse, Taylor & Haydon, 2001). Existem várias discussões sobre os conceitos acerca de hospedeiros e reservatórios (Shaw, 1988; Ashford, 1996; Haydon et al., 2002; Chaves et al., 2007; Roque & Jansen, 2014). O termo hospedeiro está relacionado a uma espécie que abriga um parasito oportunista que pode ou não comprometer sua sobrevivência (Ávila-Pires, 2005). Para ser empregado o termo reservatório, necessita que o hospedeiro preencha alguns critérios, como: (a) superposição espaço/tempo com os vetores; (b) sobreviver o suficiente para garantir a transmissão; (c) apresentar uma prevalência de infecção de pelo menos 20%; (d) manter o parasito na pele ou no sangue em quantidade suficiente para infectar facilmente o vetor; e (e) apresentar a mesma espécie de parasito encontrada no homem (Silva et al., 2005).

Neste estudo, utilizando ferramentas moleculares, foi possível identificar roedores e marsupiais com infecções naturais por *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) guyanensis* em amostras de pele, fígado, baço e medula óssea nas localidades estudadas.

As técnicas moleculares vêm trazendo melhorias para diagnóstico das leishmanioses, em particular a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que desempenha um papel importante na detecção de *Leishmania* e quantificação do número de parasitos em seres humanos e animais (Manna et al., 2008, Sudarshan et al., 2011).

Uma característica singular da ordem Kinetoplastida é o DNA mitocondrial organizado em 20-50 maxicírculos e 10.000-20.000 minicírculos (Simpson & da Silva, 1971; Simpson, 1987). No que diz respeito ao gênero *Leishmania*, são estimados cerca de 10.000 minicírculos por parasita (Degraeve et al. 1994). A região conservada do DNA cinetoplástico de *Leishmania* spp. (kDNA) tem sido utilizada como alvo para PCR desde a década de 90 (Rodgers et al. 1990), e no presente estudo, foi utilizada como triagem nos pequenos mamíferos por mostrar uma maior

sensibilidade na detecção de *Leishmania* spp. e como alvo para a quantificação da carga parasitária nos pequenos mamíferos utilizando a qPCR, devido ao tamanho do fragmento gerado na amplificação (120 pb), pois nessa técnica o ideal é não trabalhar com grandes fragmentos, porque quanto maior o fragmento, mais unidades de enzimas e reagentes são necessários e, além disso, mais moléculas de pirofosfato são liberadas (a cada adição de nucleotídeo é liberada uma molécula de pirofosfato). A falta de reagentes e o excesso de pirofosfato podem diminuir a eficiência ou, ainda, inibir a reação. Por este motivo, na qPCR geralmente são utilizados fragmentos de 60 a 200pb (de Carvalho et al., 2010).

As diferentes espécies de *Leishmania* são indistinguíveis morfologicamente, mas têm sido identificadas por diferentes métodos moleculares, como a discriminação das espécies de *Leishmania* através da análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados após digestão de amplicons com enzimas de restrição (PCR-RFLP) (Lopes et al., 1984; Spanakos et al., 2007).

Em regiões onde várias espécies de *Leishmania* coexistem em simpatria é importante o uso de técnicas que possibilitem a identificação da espécie envolvida, uma vez que tal informação é muito valiosa em estudos epidemiológicos, onde a distribuição das espécies de *Leishmania* entre humanos e diferentes hospedeiros e vetores é um pré-requisito para o delineamento e aplicação de medidas de controle apropriadas (Ferreira, 2010).

A PCR-RFLP utilizando a amplificação de um fragmento do gene que codifica para a proteína de choque térmico de 70kDa (*hsp70*) seguido de corte com a enzima de restrição *HaeIII*, tem sido apresentada como uma ferramenta simples e eficiente na discriminação de espécies de *Leishmania* tanto no Novo quanto no Velho Mundo (Montalvo et al., 2010). Esta ferramenta tem sido utilizada com sucesso para distinguir as espécies de *Leishmania* patogênicas que circulam no Brasil (Garcia et al., 2004; da Silva et al., 2010; Graça et al., 2012).

As proteínas de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*) são altamente conservadas entre procariontes e eucariontes em sequência e função, e protegem as células dos efeitos do calor e outras formas de stress (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Os genes que codificam *hsp70s* citoplasmáticos estavam entre os primeiros genes dos

kinetoplastidas a serem clonados e caracterizados em razão de sua natureza conservada (Folgueira et al., 2007). A digestão (*HaeIII*) dos fragmentos gerados através da PCR utilizando *hsp70* como alvo foi utilizada no presente estudo para identificar a espécie de *Leishmania* presente nos pequenos mamíferos infectados.

A diversidade de espécies de *Leishmania* e de flebotomíneos vetores leva a uma grande variedade de hospedeiros vertebrados infectados, originando diferentes padrões epidemiológicos no Brasil.

Em nosso estudo a espécie de mamífero mais amostrada foi *D. albiventris*, que foi capturada nas cinco áreas avaliadas e apresentou uma alta positividade (19%), sendo encontrada infectada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. No Brasil, esta espécie tem ampla distribuição, principalmente nas porções leste e centro-oeste. É um animal de porte médio, e a espécie é classificada como frugívora-onívora (Fonseca et al., 1996). Pode se alimentar de roedores e aves de pequeno porte, rãs, lagartos, insetos, caranguejos e frutos (Lange e Jablonski 1998; Eisenberg e Redford 1999; Nowak 1999). Possui hábitos crepusculares e noturnos e é frequentemente relacionada à predação de aves domésticas, especialmente galinhas (Cabrera e Yepes, 1960), o que ressalta o sinantropismo desta espécie, caracterizando a importância da mesma no ciclo de transmissão das leishmanioses. Este marsupial tem assumido grande importância nos focos de transmissão de leishmaniose por ter sido o primeiro animal silvestre, não-canídeo, que foi descrito naturalmente infectado por *L. (L.) donovani* (Que atualmente sabe-se que se trata de *L. (L.) infantum*) no novo mundo (Sherlock et al., 1984) e por já ter sido encontrado infectado, no Brasil, por *L. (V.) braziliensis* (Alexander et al., 1998; Brandão-Filho et al., 2003; Schallig et al., 2007, Quaresma et al., 2011; Ferreira, 2010) *L. (L.) infantum* (Sherlock, 1996; Corredor et al., 1989; Travi et al., 1998; Cabrera et al., 2003; Schallig et al., 2007) e por *L. (V.) guyanensis* (Arias et al., 1981).

O encontro de espécimes de *D. albiventris* infectados por *L. (L.) infantum* é importante pois os gambás, depois dos canídeos, são os principais candidatos a reservatórios, em função de já haverem sido encontrados infectados por este parasito por diversas vezes e por servirem de fonte de infecção para *Lu. longipalpis* (Travi et al., 1998) que se alimenta nesta espécie com certa frequência (Sherlock et al., 1984).

A segunda espécie mais amostrada foi *T. apereoides*, um roedor conhecido popularmente no norte de Minas como rato rabudo. Tem porte médio, é terrestre e semi-arborícola, possui hábito diurno e noturno, mas preferencialmente crepuscular (Streilen, 1982). Habita áreas abertas e florestais da Caatinga, do Cerrado e do Pantanal. Esta espécie foi capturada apenas na Terra Indígena Xakriabá (município de São João das Missões) e em Barra do Guaicuí (município de Várzea da Palma), ambas localizadas no norte de Minas Gerais. No presente estudo esta espécie apresentou 28% de positividade e foi encontrada infectada por *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) guyanensis*. Os mesmos animais foram encontrados infectados por essas três espécies de *Leishmania* por Quaresma et al. (2011) e houveram outros achados de infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* no município de Araçuaí, também no norte de Minas Gerais (Oliveira et al., 2005).

N. lasiurus é um animal silvestre, de pequeno porte, de hábito terrestre. Habita formações abertas e florestais do Cerrado e ao longo do ecótono Mata Atlântica-Cerrado, além de áreas de vegetação aberta no estado do Pará. No presente estudo, esta espécie foi capturada apenas em ambiente não urbanizado na regional Nordeste de Belo Horizonte e no Município de Divinópolis, teve 7% de positividade e foi encontrada infectada por *L. (V.) braziliensis*. Brandão-Filho e colaboradores em 2003 e de Freitas e colaboradores em 2012 também encontraram esta espécie infectada por *L. (V.) braziliensis* em estudo realizado em Pernambuco e no Mato Grosso, respectivamente.

R. rattus, o rato de telhado, tem hábito terrestre, mas apresenta grande habilidade para escalar, frequentando forros de casas e escalando paredes facilmente (Bonvicino et al., 2008). É comumente encontrado nas propriedades rurais e pequenas e médias cidades do interior de grande parte do Brasil. São roedores originalmente do Velho Mundo, introduzidos pela colonização europeia. Seu hábito intradomiciliar permite um contato mais estreito com o homem e isso tem sido um importante fator que associa a sua presença com o estabelecimento de diversos agravos à saúde, porém, seu possível papel como reservatório de *Leishmania* ainda é pouco estudado. Este animal foi capturado em todas as áreas de estudo, principalmente nas áreas urbanizadas. Apresentou 26% de positividade e encontramos espécimes infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Esta

espécie também foi encontrada infectada por *L. (V.) braziliensis* (Vasconcelos et al., 1994) e por *L. (L.) infantum* (Alencar et al., 1974, Oliveira et al., 2005). É interessante notar que desta última espécie já foi isolada amostra identificada como *L. (V.) braziliensis* em área endêmica para LTA no nordeste brasileiro (Brandão-Filho et al., 2003).

M. musculus, um roedor pequeno que possui hábitos sinantrópicos, vive essencialmente em habitações humanas, frequentando despensas, quartos e bibliotecas. Também é um animal introduzido pela colonização europeia e possui distribuição em todos os estados do Brasil (Bonvicino et al., 2008). No nosso estudo, foi capturado principalmente nas áreas urbanizadas e apresentou espécimes infectados por *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, sendo que esta última já foi encontrada infectando essa espécie de roedor por de Freitas e colaboradores (2012) e foi relatada infecção mista por estas duas espécies de *Leishmania* neste roedor por Ferreira em 2010.

As outras espécies registradas no estudo tiveram um número menos expressivo de exemplares capturados, mas algumas delas, apesar do baixo número de captura, apresentaram uma alta positividade, como *C. subflavus* (20%), *R. novergicus* (18%), *R. mastacalis* (43%), *G. agilis* (75%) e *M. incanus* (67%).

Quanto às áreas estudadas, a Terra Indígena Xakriabá apresentou a maior positividade geral (35%). É uma área endêmica que apresenta números elevados de casos clínicos e assintomáticos principalmente de LTA. Nossos resultados sugerem que *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) guyanensis* estão circulando entre diferentes mamíferos silvestres e sinantrópicos presentes na região. Em estudo realizado por nossos colaboradores, a fauna flebotomínica da Terra Indígena Xakriabá mostrou-se bastante diversificada, com um total de vinte e oito espécies coletadas pertencentes a onze gêneros, com predominância das espécies *Lu. longipalpis* e *Lu. intermedia*. *Lu. longipalpis* é apontada como espécie predominante na região (Rêgo et al., 2014). Desde a década de 30, quando o ciclo da LV começou a ser elucidado, diversos autores têm comprovado a adaptabilidade de *Lu. longipalpis* a ambientes modificados (Lainson & Rangel, 2005) o que torna seu papel essencial na transmissão de *L. (L.) infantum*. A espécie *Lu. intermedia* está intimamente relacionada a humanos, animais domésticos e sinantrópicos, em uma

variedade de habitats, incluindo peridomicílio e regiões de mata (Forattini 1953, 1960; Rangel et al., 1999). Evidências epidemiológicas acumuladas ao longo dos anos têm sugerido que *Lu. intermedia* é o principal transmissor da *L. (V.) braziliensis* em áreas endêmicas no sudeste do Brasil (Forattini & Santos, 1952; Forattini et al., 1972; Casanova et al., 1995; Marcondes et al., 1997; Córdoba-Lanus et al., 2006; Saraiva et al., 2009; Rangel & Lainson, 2009).

A positividade dos pequenos mamíferos capturados na regional Nordeste de Belo Horizonte foi bastante significativa (27%). Belo Horizonte é um município onde a transmissão das leishmanioses ocorre em praticamente todos os bairros da cidade inclusive nos centrais, caracterizando um perfil urbano de transmissão que vem sendo ressaltado por vários autores (Passos et al., 1993; Profeta da Luz et al., 2001; Silva et al., 2001; Margonari et al., 2006).

A fauna de pequenos mamíferos da Regional Nordeste foi composta principalmente por animais introduzidos e sinantrópicos (*M. musculus*, *R. norvegicus*, *R. rattus*, *D. albiventris* e *D. aurita*) e alguns animais silvestres (*C. subflavus* e *N. lasiurus*) e as espécies de *Leishmania* circulantes nestes animais foram *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Um levantamento em paralelo, visando investigar a fauna e a infecção flebotomínica na mesma área e período de estudo, coletou principalmente *Lu. whitmani* (74% do total de flebotomíneos coletados) (Saraiva et al. 2011). Esta espécie de flebotomíneo é apontada como vetora de *L. (V.) braziliensis* em várias áreas no Brasil, especialmente na Região Sudeste (Costa et al., 2007).

Diante destes dados, estas espécies de roedores sinantrópicos devem desempenhar nesta área, onde no período de coleta (junho/2006 a junho/2007) o número de casos humanos notificados de LTA foi 33, um papel importante como fonte de infecção para espécies de flebotomíneos bem adaptados ao peridomicílio como *Lu. whitmani*.

A localidade Casa Branca do município de Brumadinho teve um pequeno número de exemplares capturados (25) com positividade de 24%. A fauna da localidade foi composta por apenas quatro espécies de animais, destes, dois deles possuem hábitos sinantrópicos (*D. albiventris* e *R. rattus*) e dois silvestres (*C.*

subflavus e *M. incanus*), o que é explicado por haver muitas áreas de mata próximas às casas onde foram realizadas as coletas. Quando comparada com as outras áreas estudadas (com exceção de Barra do Guaiçuí) o número de animais e a diversidade de espécies foi menor. Entretanto, vale ressaltar que o esforço amostral nesta localidade também foi menor. Por outro lado em Barra do Guaiçuí (Várzea da Palma) onde também foram capturados 25 exemplares de três espécies diferentes foi realizado o maior esforço amostral (9408 armadilhas). As espécies de *Leishmania* circulantes nesses animais foram *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*, que poderiam estar relacionadas com os casos de LV e LTA humana que foram identificados na localidade. Um estudo sobre a fauna flebotomínica na região está sendo realizado por nosso grupo de pesquisa e os resultados preliminares apontam *Lu. whitmani* e *Lu. Longipalpis* como as espécies predominantes na área.

Divinópolis, que teve um número considerável de animais capturados (102), apresentou 9% de positividade e foi a área de estudo que apresentou a maior diversidade de espécies de pequenos mamíferos (9 espécies). A região apresentou um número expressivo de capturas de animais tanto silvestres, quanto sinantrópicos e introduzidos, e as espécies de *Leishmania* circulantes na área foram *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Um estudo dos flebotomíneos do município foi conduzido na mesma época das coletas dos pequenos mamíferos por nosso grupo de estudos, e foram capturados flebotomíneos de 18 espécies. A espécie mais abundante foi a *Lu. longipalpis*, considerada a principal vetora de *L. (L.) infantum*, e a maioria dos espécimes foram coletados muito próximo às residências (Nascimento et al., 2013). A segunda espécie mais abundante neste estudo foi *Lu. lenti*, sendo que a mesma já foi encontrada infectada por *L. (V.) braziliensis* em Campo Grande, MS (Paiva et al., 2010) e também no município de Divinópolis (Margonari et al., 2010).

O Distrito de Barra do Guaiçuí em Várzea da Palma apresentou um pequeno número de animais capturados (25) e uma positividade relativamente baixa (8%). Apesar do grande esforço amostral, foi coletado um pequeno número de pequenos mamíferos durante as campanhas de captura. Os dois únicos animais encontrados positivos estavam infectados por *L. (V.) braziliensis*. É importante ressaltar que nessa região foi reportado um alto número de casos humanos autóctones de LT

(202) nos últimos anos e foram encontrados flebotomíneos infectados por *L. (V.) braziliensis*.

A fauna de flebotomíneos encontrada no município de Várzea da Palma mostrou-se diversificada e com predomínio de importantes espécies vetoras, como *Lu. longipalpis* e *Lu. intermedia* (Sanguinette, 2011), espécies envolvidas na veiculação dos agentes etiológicos da LV e LT respectivamente (Rangel & Lainson, 2003; Andrade Filho et al., 2007).

Os altos índices de positividade das PCRs tanto dirigidas ao kDNA quanto dirigidas ao *hsp70* de *Leishmania* nos pequenos mamíferos nas áreas estudadas confirmam a susceptibilidade destes à infecção por *Leishmania* spp. e ressaltam a importância de mais estudos envolvendo estes animais, para esclarecer seu papel na cadeia de transmissão.

Existem poucos estudos a cerca da quantificação de *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos. O grau de parasitismo durante a infecção por *Leishmania* spp. pode diferir nos órgãos, por isso é relevante a identificação dos tecidos que apresentam maiores níveis de parasitos, com o objetivo de melhorar a sensibilidade do diagnóstico das leishmanioses (Reis et al., 2006). Além disso, o conhecimento a respeito da carga de parasitos presentes na pele e no sangue, de diferentes hospedeiros, pode auxiliar na indicação do papel destes como fonte de infecção para os vetores (Silva et al., 2005).

Não houve relatos de sinais clínicos nos animais capturados nas áreas estudadas. Sabe-se que nos animais silvestres são frequentes as infecções inaparentes sem lesões ou com lesões pouco graves o que é muito importante para que uma espécie seja considerada um bom reservatório (Nery-Guimarães et al., 1968).

Em estudo realizado na regional Nordeste de Belo Horizonte foi observado que a carga de parasitos encontrada em pele de cães é muito mais elevada que em pequenos mamíferos (Ferreira, 2010). A maioria das amostras de cães testadas apresentaram uma carga acima de 103 parasito/mg de tecido, comparada à carga presente nos pequenos mamíferos que apresentaram uma carga abaixo de 102 parasito/mg. Este fato pode estar relacionado, entre outros aspectos, à diferença da

espécie de *Leishmania* envolvida, que nas amostras caninas foi *L. (L.) infantum* e nas amostras dos pequenos mamíferos foi *L. (V.) braziliensis* (Ferreira, 2010).

Outra questão a ser apontada é a própria diferença entre as espécies de hospedeiros que poderia favorecer uma maior proliferação dos parasitos em um grupo em relação ao outro. Nosso estudo mostrou que houve diferença apenas no roedor *Thrichomys apereoides* que apresentou carga parasitária mais elevada em relação a outras duas espécies, o que pode explicar, inclusive, a maior carga parasitária por área de estudo que foi encontrada na Terra Indígena Xakriabá, local onde este roedor foi mais frequentemente capturado. Roque e colaboradores (2010) realizaram infecção experimental em roedores da espécie *Thrichomys laurentius* e observou que esses animais conseguiram manter a infecção por ambas as espécies de *Leishmania* testadas, no caso *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*, por longo tempo sem apresentarem alterações clínicas. Juntamente com nossos resultados que observaram maior carga parasitária em roedores do mesmo gênero (*Thrichomys*) e a alta positividade do mesmo em área endêmica, podemos sugerir que espécies do gênero *Thrichomys* assumem um papel importante nos ciclos silvestres de transmissão de *Leishmania* spp.

Ainda em relação à carga parasitária em determinada espécie de hospedeiro, esta apresentou variações inclusive dentro da mesma espécie. *D. albiventris* apresentou uma carga parasitária maior na Terra Indígena Xakriabá do que nas outras áreas em que foi capturado. Este fato pode estar relacionado com a alta taxa de positividade apresentada por esta espécie na área (32%), que, associado ao sinantropismo deste animal e a alta prevalência de casos humanos mostra que nesta região esta espécie pode ser mais susceptível à infecção em relação às outras áreas abordadas.

A carga em relação ao ambiente de coleta foi maior nos animais coletados na região peridomiciliar apenas no município de Belo Horizonte, enquanto nas outras áreas a maior carga parasitária foi encontrada em animais coletados em áreas de mata. Esse fato pode ser explicado por Belo Horizonte apresentar um perfil melhor estabelecido de urbanização das leishmanioses em relação às outras áreas de estudo. Estes dados alertam mais uma vez para a importância de estudar estes pequenos mamíferos que habitam áreas urbanas ou seu entorno, como uma

tentativa de elaboração de medidas de controle mais eficientes em conter a expansão das diferentes doenças que contam com a participação destes animais na manutenção do seu ciclo de transmissão.

Com relação ao tipo de tecido, foi observado que apenas em Belo Horizonte houve uma diferença da carga parasitária nos tecidos, que foi maior em amostras de baço e pele de orelha. Ferreira (2010) observou que os pequenos mamíferos apresentaram carga parasitária maior na pele de cauda em relação à pele de orelha.

O encontro de alta positividade em amostras de fígado e de elevada carga parasitária em amostras de baço em animais infectados por espécies de *Leishmania* dermatrópicas associadas à forma cutânea da doença humana, mostra que essas espécies podem visceralizar com facilidade em roedores e marsupiais. O isolamento em meio de cultura de *L. (V.) braziliensis* a partir de amostras de fígado e baço de um espécime de roedor da espécie *R. rattus* proveniente de área endêmica por Pereira e colaboradores (dados não publicados) reforça estas observações.

Com relação às três diferentes espécies de *Leishmania* que foram encontradas infectando os pequenos mamíferos, foi observada maior diversidade de espécies de animais e um maior número de exemplares infectados por *L. (V.) braziliensis*, o que aponta para uma complexidade do ciclo desta espécie. A *L. (L.) infantum* foi encontrada infectando, em sua maioria, animais introduzidos e sinantrópicos (*R. rattus*, *M. musculus* e *D. albiventris*) o que ressalta a participação desses animais no ciclo peridomiciliar de LV, indicando o caráter urbano da transmissão. Já a *L. (V.) guyanensis*, tem sido reportada nas regiões norte e nordeste do Brasil e foi registrada apenas uma vez em pequenos mamíferos de Minas Gerais (Quaresma et al. 2011). Esta espécie foi encontrada infectando duas espécies de animais silvestres (*T. apereoides* e *M. incanus*) apenas na Terra Indígena Xakriabá, sugerindo que ela está restrita ao ambiente silvestre e que ainda não pode ser considerada uma espécie endêmica no Estado de Minas Gerais. Não existem relatos de casos humanos causados por esta espécie em Minas Gerais. Estas observações reforçam a necessidade e importância dos estudos que visam a caracterização das amostras de *Leishmania* isoladas dos mais diversos hospedeiros, incluindo o homem.

Entre as espécies de *Leishmania*, houve diferença na carga parasitária apenas em amostras provenientes de pequenos mamíferos capturados na Terra Indígena Xakriabá, onde os animais infectados por *L. (V.) braziliensis* apresentaram um número maior de parasitos em relação aos animais infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) infantum*. Por outro lado os animais infectados por *L. guyanensis* apresentaram carga parasitária mais elevada do que os infectados por *L. (L.) infantum*, o que mostra um grau de parasitismo em roedores e marsupiais maior por *Leishmanias* dermatrópicas.

Com a potencialidade de algumas espécies de roedores e marsupiais participarem na transmissão de espécies de *Leishmania* que causam a doença humana, fica evidente um fator que não é levado em consideração nos programas de vigilância: outras espécies de mamíferos podem estar servindo de fonte de infecção para os flebotomíneos. A realização de nosso estudo possibilitou verificar que nas áreas estudadas de Minas Gerais a infecção de pequenos mamíferos, capturados tanto no ambiente de peridomicílio quanto de mata, por espécies de *Leishmania* está presente em todas elas indicando que os ciclos de transmissão ocorrem nestes diferentes ambientes com a participação destes animais. Isso aponta para a necessidade de mais estudos envolvendo hospedeiros/reservatórios de espécies de *Leishmania*. A correta identificação das espécies de *Leishmania* circulantes nos hospedeiros vertebrados e invertebrados em uma área endêmica é fundamental para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença contribuindo para a escolha de medidas mais adequadas de prevenção e controle.

7 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, associados aos conhecimentos sobre a epidemiologia das leishmanioses nas áreas estudadas pode-se concluir que:

- A detecção da infecção por diferentes espécies de *Leishmania* em pequenos mamíferos comprova a participação destes animais nos ciclos de transmissão ativos e simultâneos em focos de Minas Gerais.
- Os roedores das espécies *C. subflavus*, *M. musculus*, *N. lasiurus*, *R. norvegicus*, *R. rattus* e *T. apereoides* e os marsupiais *D. albiventris* e *G. agilis* são hospedeiros de *L. (V.) braziliensis*.
- Os roedores das espécies *M. musculus*, *R. rattus*, *R. mastacalis* e *T. apereoides* e o marsupial *D. albiventris* são hospedeiros de *L. (L.) infantum*.
- O roedor da espécie *T. apereoides* e o marsupial da espécie *M. incanus* são hospedeiros de *L. (V.) guyanensis*.
- A espécie *L. (V.) braziliensis* foi a mais prevalente entre os pequenos mamíferos.
- A presença do parasitismo cutâneo por *L. infantum* em espécies domésticas e sinantrópicas no ambiente peridomiciliar de cidades como Belo Horizonte e Divinópolis aponta para a importância destes animais no ciclo urbano deste parasito.
- O marsupial *D. albiventris* tem importância epidemiológica em Minas Gerais por ter sido capturado em todas as áreas de estudo e ter apresentado alta positividade para diferentes espécies de *Leishmania*.
- O roedor silvestre *T. apereoides* apresentou elevada positividade para *L.(V.) braziliensis* com altas cargas parasitárias em diferentes tecidos, incluindo a pele, indicando sua participação na manutenção deste parasito na Terra Indígena Xakriabá.

8 Anexos

8.1 LICENÇA PARA CAPTURA DE PEQUENOS MAMÍFEROS EM BELO HORIZONTE- IBAMA



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E DA AMAZÔNIA LEGAL
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA
 DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS
LICENÇA PARA CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE/ EXPOSIÇÃO

NÚMERO DA LICENÇA 425/05-NUFAS/MG	Nº DE REGISTRO NO IBAMA XXXXXXXXXX	PERÍODO DE VALIDADE 02/12/05 A 02/12/06	PROCESSO IBAMA Nº 02015.015670/05-18
--------------------------------------	---------------------------------------	--	---

OBJETO:

- CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
 TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
 COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)
 TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUB-PRODUTOS DA FAUNA
 EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES
 OUTROS (ESPECIFICAR): PROJETO "DETECÇÃO DE LEISHMANIA EM MAMÍFEROS DOMÉSTICOS E SINANTRÓPICOS NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS"

FAVORECIDO:

- ZOOLOGICO
 INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
 PESQUISADOR
 EXPOSITOR/CONCURSO
 CRIADOURO COMERCIAL
 CRIADOURO CIENTÍFICO
 OUTROS (ESPECIFICAR): UFMG, SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE/ZOONOSES REG. NORDESTE

FAVORECIDO - ESPECIFICAÇÃO:

NOME: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/ LABORATÓRIO DE LEISHMANIOSES/CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
 ENDEREÇO: AV. AUGUSTO DE LIMA, 1715 - 30190-002 - BH - MG
 RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA): CÉLIA MARIA FERREIRA GONTIJO, ADRIANO PEREIRA PAGLIA, ARISTOBOLO MENDES DA SILVA, HEITOR MORAIS CUNHA, MARIA NORMA MELO, PEDRO MARCOS LINARD, SOFIA ALVES NOGUEIRA VALÉRIO, EDUARDO DE CASTRO FERREIRA, PATRÍCIA QUARESMA.

TRANSPORTADOR: OS MESMOS

MEIO DE TRANSPORTE: RODOVIÁRIO

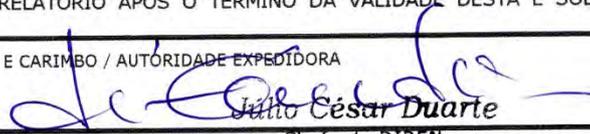
PROCEDÊNCIA /LOCAL DE PESQUISA: MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MAIS ESPECIFICAMENTE REGIONAL NORDESTE, MG.

DESTINO: *UFMG/ICB/DEPTO. DE ZOOLOGIA E PARASITOLOGIA, BH, MG.

LISTA DAS ESPÉCIES QUANT.	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
*COLETA DE 100 ESPÉCIMES NO TOTAL	MAMMALIA	PEQUENOS ROEDORES, GAMBÁS E CUÍCAS

OBS.: 1) Esta Licença não autoriza o uso de material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal: em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial. (de acordo com Medida Provisória nº 2.052/00 - 2)

2) O RESPONSÁVEL TÉCNICO DEVERÁ ENVIAR RELATÓRIO APÓS O TÉRMINO DA VALIDADE DESTA E SOLICITAR RENOVAÇÃO COMO PREVISTO NO PROJETO.

DATA DE EMISSÃO BH, 02/12/2005 CDE/	ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA  Julio César Duarte
--	--

- VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO NACIONAL, SEM EMENDAS OU RASURAS. AS INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICO PÚBLICOS SÃO ISENTOS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE MG).
- ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:
- CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO SALVO QUANDO ESPECIFICADO
- CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº. 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO.
- CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL

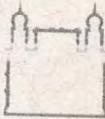
8.2 AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA

 MINISTÉRIO DA JUSTIÇA FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO		
AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA		Nº: 149/ICGEP/08
IDENTIFICAÇÃO		
Nome: Célia Maria Ferreira Gontijo		Processo: n.º.2098/08
Nacionalidade: brasileira	Identidade: RG n.º.M-663908 SSP MG	
Instituição/Entidade: Laboratório de Leishmanioses – Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ		
Patrocinador:		
OBJETIVO DO INGRESSO		
Desenvolver o projeto de pesquisa científica intitulada “Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil”.		
EQUIPE DE TRABALHO		
Nome	Nacionalidade	Identidade
Elizabeth Castro Moreno*****	brasileira*****	RG 867963 SSP MG
Patrícia Flávia Quaresma*****	brasileira*****	RG 11616996 SSP MG
Filipe Augusto Maximiano Madeira*****	brasileiro*****	RG 11030749 SSP MG
Heitor Moraes Cunha*****	brasileiro*****	CRBio 44441/04-D MG
Lutiana Amaral de Melo*****	brasileira*****	RG 9117142 SSP MG
Edelberto Santos Dias*****	brasileiro*****	CRBio 13446/4-D MG
Ricardo Andrade Barata*****	brasileiro*****	CRBio 160154 MG
Adriano Pereira Paglia*****	brasileiro*****	RG 2099566 SSP MG
Terra Indígena: Xakriabá		Etnia: Xakriabá
Administração Regional: Governador Valadares		Posto Indígena: Xakriabá
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO		
Início: 12 de outubro de 2008		Término: 12 de outubro de 2009
OBSERVAÇÕES		
* Remeter à Funai/Coordenação Geral de Estudos e Pesquisas - CGEP, duas cópias da monografia, relatórios, artigos, livros, gravações, imagens e outras produções oriundas do trabalho realizado.		
* Esta autorização não inclui cessão de uso de imagem e som de voz dos índios, nem acesso a conhecimentos tradicionais associados a biodiversidade.		
Autorizo:		
Brasília, 17 de setembro de 2008.  Ricardo Augusto Maranhão Presidente da Funai		

8.3 LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO

		Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO	
Licença permanente para coleta de material zoológico			
Número: 12989-1		Data da Emissão: 21/11/2007 17:46	
Dados do titular			
Registro no Ibama: 2055205	Nome: Adriano Pereira Paglia	CPF: 893.843.266-15	
Nome da Instituição: CONSERVATION INTERNACIONAL DO BRASIL		CNPJ: 38.737.938/0001-61	
Observações, ressalvas e condicionantes			
1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);		
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro, c) recebimento 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 da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;		
4	Esta licença permanente não exime o seu titular 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.		
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.		
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.		
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos 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 Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.		
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar 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 viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.		
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 aniversário de emissão da licença permanente.		
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da 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 da solicitação.		
13	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.		
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.		
Táxons autorizados			
#	Nível taxonômico	Táxon(s)	
1	ORDEM	Didelphimorphia, Rodentia, Lagomorpha	
2			
Destino do material biológico coletado			
#	Nome local destino	Tipo Destino	
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção	
Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).			
Código de autenticação: 31875873		Página 1/2	
			

8.4 LICENÇA PARA O USO DE ANIMAIS - CEUA/FIOCRUZ – VÁRZEA DA PALMA.

 - Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência


Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-7/14

Certificamos que o protocolo (P-32/13-1), intitulado "Epidemiologia das leishmanioses em Barra do Guaiçuí, Minas Gerais.", sob a responsabilidade de JOSE DILERMANDO ANDRADE FILHO, atende ao disposto na Lei 11794/08, 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 exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

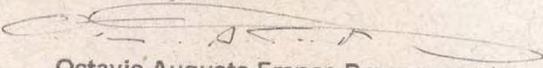
Esta licença tem validade até 16/12/2015 e inclui o uso total de :

Mesocricetus auratus
- 71 Fêmeas de Golden, Peso: 0,0100 Grama(s).

Didelphimorphia
- 15 Machos.
- 15 fêmeas.

Rodentia
- 30 Machos.
- 30 fêmeas.

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2015


Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04625550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil 4036 - Prédio da Exposição - sala 200 - Maracanã - Rio de Janeiro, RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

9 Referências

- Aguilar CM, Fernandez E, Fernandez R. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(1): 15-16.
- Alencar JE, Almeida YM, Silva ZF, Paiva AS, Da Fonseca MF. Current aspects of kala-azar in Ceara. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 1974; 26: 27–53.
- Alexander B, Lozano C, Barker DC, Mccann SHE, Adler GH. Detections of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Trop 1998; 69: 41-50.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012; 7: e35671.
- Alvar J, Yactyo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitology 2006; 22(12): 552-557.
- Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão A L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2007; 102: 481–487.
- Aplin K, Suzuki H, Chinen AA, Chesser RT et al. Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of Black Rats. PLoS ONE 2011; 6: e26357.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66(5): 1933-8.
- Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75 (4): 537-5
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol 1996; 14: 523-532.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol. 2000; 30: 1269- 81.
- Ashford RW. What it takes to be a reservoir host. Belg. J. Zool, 127 1997; 127: 85–90.
- Avila-Pires, F.D. Ecologia das Zoonoses. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan; 2005 Vol. 1. Cap 5. P. 53-63.

- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotômíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med.Trop. 2005; 38(5): 421-425.
- Barreto MB, Carneiro AL, Torres FA, Sampaio RN. *Lutzomyia whitmani* is the main vector of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Federal District and the most prevalent species in residential areas of the Administrative Region of Sobradinho. An Bras Dermatol 2014; 89(2): 372-4.
- Bates PA, Rogers ME. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. Current Molecular Medicine 2004; 4: 601-609.
- 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.
- 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, 291-296.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros. [s.l.]: [s.n.], 2013.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria De Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: MS, 2010. 180 p.
- Brazil RP & Brazil BG. Bionomia. In: Rangel EF, Lainson R (orgs) Flebotômíneos do Brasil. Editora da Fundação Oswaldo Cruz 2003; 257-274.
- 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: 145.
- Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. Rev Inst Med Trop São Paulo 2003; 45: 79-83.
- Cabrea A, Yepes J. Mamíferos Sudamericanos. Buenos Aires: EDIAR, 1960. 238p.
- Carreira JCA, da Silva AVM, Pereira DP, Brazil RP: Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. Parasit Vectors 2012, 5:111.
- Carvalho MLR, Andrade ASR, Fontes CJF, Hueb M, Silva SO, Melo MN. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is the prevalent species infecting with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. Acta Trop 2006; 98: 277-285.

- Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the Valley of the Mogi Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. *Bol Dir Malariol San. Amb* 1995; 35: 77-84.
- Cássia-Pires R, Boité MC, D'Andrea PS, Herrera HM, Cupolillo E, Jansen AM, Roque AL. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (rodentia: hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(12): e3389.
- Chang KP, Fong D, Bray RS. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: K.P.Chang & R.S.Bray eds *Leishmaniasis*, elsevier London 1985; 1-30.
- Chaves LF, Hernandez MJ, Dobson AP, Pascual M. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2007; 23(7), 311-316.
- Córdoba-Lanus E, De Grosso ML, Pinero JE, Valladares B, Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop* 2006; 98: 1-5.
- Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla M, Paláu MT. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani* chagasi in Colômbia, South America. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 195.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s. l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 12-17.
- Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40: 415-419.
- Coutinho SG, Nunes MP, Morzochi, MCA. A survey for american cutaneous leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80: 17-22.
- da Silva LA, de Sousa CS, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 77-83.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2006; 48 (3): 151-156.
- de Araújo VE, Pinheiro LC, Almeida MC, de Menezes FC, Morais MH, Reis IA, Assunção RM, Carneiro M. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(11): e2540.

- De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica* 1992; 52: 45-58.
- De Carvalho CV, Ricci G, Affonso R. Guia de Práticas Em Biologia Molecular. 1 ed. YENDIS; 2010.
- De Freitas TP, D'Andrea PS, Jesus de Paula DA, Nakazato L, Dutra V, et al. Natural Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12: 81–83.
- De Souza Rocha L, Falqueto A, Santos CB, Grimaldi Jr G, Cupolillo E. Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* reflects distinct ecoepidemiologic features. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; 559-565.
- Deane LM, Deane MP. Encontro de *Leishmanias* nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O Hospital* 1954; XLV (4): 45-47.
- Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, El-Safi S, Al-Basheer AA, Arévalo J, Miranda-Verástegui C, Leclipteux T, Mertens P, Dujardin JC, Herdewijn P, Büscher P. A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for the Diagnosis of Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 198: 1-8.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* 1994; 89: 463-469.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 239-243.
- Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I – Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1977; 19 (6): 403-410.
- Dujardin J.C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: Towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology* 2006; 22: 4-6.
- Eisenbergh JF, KH Redford. 1999. Mammals of the neotropics, the central neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brasil. Vol 3. University of Chicago Press, Chicago. 609 p.

- Eresh S, McCallum M, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* 1994; 109: 423-433.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill 3rd FR, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 165-256.
- Ferreira EC. Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências e Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, 2010.
- Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitol* 2007; 134(3): 369-77.
- Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier, RA, Rylands AB, Patton JL. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers in Conservation Biology* 1996; 4.
- Forattini OP & Santos MR. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em foco de leishmaniose tegumentar americana. *Arch Hyg Saúde Publ* 1952; 17: 171-174.
- Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira AO. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Públ* 1972; São Paulo 6: 431-433.
- Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública* 1953; 7: 158-167.
- Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar Americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1960; 2(4): 195-203.
- FUNASA. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros. 2010.
- Furtado I, Aleixo J, Lopes CF. Surto de Leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *O Hospital* 1966; 70: 259-266.
- Galletti, E. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Res Vet Sci* 2011; 91: 243-245.

- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2294 – 2297
- Giorgio, S. Moderna visão da evolução da virulência. *Revista de saúde pública* 1995; 29(5): 398-402.
- Gontijo CMF, da Silva, ES, de Fuccio MB, de Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-150.
- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7(3): 338-349.
- Gontijo CMF, Pratlong F, Passos VMA, Falcão AI, Dedet JP. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Minas Gerais State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90(1): 143.
- Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(5): 664-74.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control (Invited review). *Int J Parasitol* 2005; 35: 1169-1180.
- Grimaldi Jr G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; 6(44): 645-661.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852–1858.
- Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (12): 1468-1473.
- Hertig M, Fairchild GB, Johnson CM. Leishmaniasis transmission-reservoir Project. *Ann Rep. Gorgas Memorial Laboratory* 1957; 9-11.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. 2010. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=31&search=minasgerais>. Acesso em: fevereiro de 2014.

- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 2003; 113: 99-113.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Foucheaux C, Delure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997; 11: 105-111.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology* 1990; 4: 1-24.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Slögreen B, Trömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The Real Time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27 (2-3): 95–125.
- Lacher Jr TE, Mares MA, Alho CJR. The structure of a small mammal community in a central brazilian savanna, 137-162. In: Redford, K. H. & Eisenberg, J.F. (eds). *Advances in Neotropical Mammalogy*. The Sandhill Crane Press, Inc., Gainesville, USA, 1989.
- Lainson R, Rangel E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811-827.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. 1st ed. London: Academic Press 1987; 1-120.
- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: III. Cutaneous leishmaniasis in an opossum, *Marmosa murina* (Marsupialia, Didelphidae) from the lower Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969; 63 (6): 738-740.
- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970 ; 64 (5): 654-667.
- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomia problems. *Br Med Bull* 1972 ; 28: 44-48.
- Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden, WHR, Evans DA. ed. - *Biology of the Kinetoplastida*. London, Academic Press, 1979, v. 2, P. 1-116.

- Lainson R, Shaw, JJ. New World Leishmaniasis - Neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editores. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. 9th ed. London/New York: Topley & Wilson; 1998. P. 241-68.
- Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amaz Saude 2010; 1(2): 13-32.
- Lainson R. Leishmaniasis. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1982.
- Lange RB, Jablonski EF. Mammalia do Estado do Paraná: Marsupialia. Estudos de Biologia 1998; 43: 15-224.
- Lima AP, Minelli L, Teodoro U, Comunello E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento orbital remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. An. Bras. Dermatol. 2002; 77(7): 681- 692.
- Lopes UG, Momem H, Grimaldi Jr G, Marzochi MCA, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. J Parasitol 1984; 70: 89-98.
- Luis A, Hayman DT, O'Shea T, Cryan P, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? Proc R Soc London B 2013; 280: 2012-2753.
- 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: 551-555.
- Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE. Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. Cytokine 2008; 44: 288–292.
- Marcondes CB, Falqueto A, Lozovei ALL. Influence of preparation methods on the dimensions of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 201-202.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(1): 31-38.
- Margonari C, Pessanha JE, Barata RA, Michalsky EM, Costa DC, Dias ES. Study of Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 99:795-803

- Margonari C, Soares RP, Andrade Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and Leishmania Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J. Med. Entomol* 2010; 47(6): 1212-1219.
- Martinez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors* 2011, 4:57.
- Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1956; 8 (4), 577-581.
- Marzochi MCA. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: Universidade de Brasília. *Grandes Endemias Brasileiras*. Brasília: UNB, 1989.
- Meerburg B, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol* 2009; 35: 221–270.
- Melo L A. Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, 2008.
- Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 23 (1): 41-45.
- Miranda JC e Dias ES. Vetores das leishmanioses nas Américas. In: Barral A e Costa J. *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*. Salvador.: CYTED: 2011. P. 55-65.
- Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, de Doncker M, Dujardin JC, Van Der Auwera G. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 2010; 137: 1159–1168.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. <http://infection.thelancet.com> 2005; 366: 1561-1577.
- Nascimento BWL, Saraiva L, Neto RGT, Serra e Meira PCL, Sanguinette CC, Tonelli GB, Botelho HA, Belo VS, Silva ES, Gontijo CMF, Filho JD A. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. *Acta Tropica* 2013; 125: 262-268.
- Nery-Guimarães F, Damasceno R, Azevedo M. Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1968; 66 (2): 151-168.
- Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1666-1669.

Nowak R M Walker's Mammals of the World. 6. ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1999, 836 p.

Nowak RM, Paradiso JL. Walker's Mammals of the World. 5th. ed. London: The Johns Hopkins University Press 1991; P. 10 – 113.

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.

OPAS – Organização Panamericana de Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. 2014; 2: 1-4.

Orsini O. Leishmaniose em Minas Gerais. *Brás. Med.* 1945; 54: 762-766.

Paglia AP, de Marco Jr.P, Costa FM, Pereira RF, Lessa G. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata secundária de Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Zool* 1995; 12: 67-79.

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

Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva CG, Gomes YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* 2010; 16 (4).

Paranhos-silva M, Nascimento EG, Melro MCBF, Oliveira GGS, Santos WLC, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos Santos AJ. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Tropica* 1998; 69: 75-83.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, BarbosaSantos EGO, Guerra HL. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban área of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88 (1): 103-110.

Pennisi MG. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun* 2004; 28(1): 363-6.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MC, Nunes MP, Grimaldi G Jr. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Jan; 38(1) :52-8.

Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Gerência de Epidemiologia e Informação (GEEPI/SMSA-PBHD). Dados da Leishmaniose Visceral no Município de Belo Horizonte 2014. Belo Horizonte: PBH, 2014. Disponível em:

http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=41517&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&. Acesso em: 11 dez. 2014.

Profeta da Luz ZM, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001; 34(3): 249-254.

Quaresma PF, Murta SMF, Ferreira EC, da Rocha-Lima ACVM, Xavier AAP, Gontijo CMF. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica* 2009; 111: 289-294.

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

Quintal APF, Ribeiro ES, Rodrigues FP, Rocha FS, Floeter-Winter LM, CM Nunes. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. *Veterinary Parasitology* 2011; 176: 112–119.

Rangel EF & Lainson R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; pp. 291–310.

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

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

Ready PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Rev. Entomol.* 2013; 58: 227–50.

Rêgo FD, Shimabukuro PH, Quaresma PF, Coelho IR, Tonelli GB, Silva KM, Barata RA, Dias ES, Gontijo CMF. Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriaba Indigenous Reserve, Brazil. *Parasites & Vectors* 2014; 7: 220.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired

biochemical/hematological status are with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2006; 81: 68-75.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(4): 530-541.

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 21-25.

Resende SM. Leishmaniose visceral em Minas Gerais. *Bol. Epidemiol* 2007; 1(10): 1-4.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 1990; 71: 267-275.

Rolão N, Martins MJ, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 2005; 12: 183-186.

Roque ALR e Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014; 251–262.

Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. *Trichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; 4: e589.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Further notes on leishman's bodies. *Br Med J* 1903; 2: 1261-1401.

Rouquayrol MZ, Almeida-Filho, N. *Epidemiologia e saúde*. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. 728 p.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplifications of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science, New Series* 1988; 239(4839): 487-491.

Sanguinette CC. Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: estudo dos flebotomíneos e da leishmaniose canina. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, 2011.

Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, Andrade Filho JD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol* 2009; 46: 1159-1163.

- Saraiva L, Andrade-Filho JD, Falcão AL, de Carvalho DA, Margonari C, Rezende C, Gomes LCR, 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; 117:137-145.
- Saravia NG, Valderrama L, Labrada, M. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J. infect. Dis* 1989; 159: 725-735.
- Savani ES, de Oliveira Camargo MC, De Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, San Paul State, Brazil. *Vet Parasit* 2004; 120: 229-233.
- Schallig HD, da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(3): 387-93.
- Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 486-490.
- Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5): 577-579.
- Shaw JJ. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular referece to Brazil. In: Burger J. Contributions to the knowledge of Diptera. Florida: Gainesville; 1999. P. 503-517.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr. G. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 515.
- Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1996; 6(91).
- Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Internat Health* 2006; 9: 1388-1398.
- Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol* 2005; 21(12): 550-552.

- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 285-291.
- Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Veterinary Record* 2000; 147, 421-422.
- Simpson L. Da Silva A. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *L. tarentolae*. *J. Mol. Biol* 1971; 56: 443-473.
- Simpson L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genome Organization, Transcription, Replication and Evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987; 41: 363-82.
- Soares IR, Silva SO, Moreira FM, Prado LG, Fantini P, Maranhão RPA, Silva-Filho JR, Melo MN, Palhares MS. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology* 2013; 197: 665-669.
- Souza AI. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 128(1-2): 41-5.
- Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Fliemetakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 102(1): 46-53.
- Streilen KE. Ecology of small mammals in the semiarid Brazilian Caatinga. IV. Habitat selection. *Annals of Carnegie Museum* 1982; 51: 331-343.
- Sudarshan M, Weirather JL, Wilson ME, Sundar S. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1751-1755.
- Sundsford A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Littauer P, Dahl KH. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS* 2004; 112: 815-837.
- Teixeira-Neto RG, da Silva ES, Nascimento RA, Belo VS, de Oliveira CL, Pinheiro LC, Gontijo CMF. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. *Parasites & Vectors* 2014; 7: 1-14.
- Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 275-278.

Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008; 61: 23-30.

Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, Sallenave SM, Valim C, David JR, Lopes UG. The identify of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50 (2): 158-164.

Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1026: 139-143.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html Acessado em 20 de Julho de 2014.

Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT. Population biology of multihost pathogens. *Science* 2001; 292(5.519): 1.109-1.112.

Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infections diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet London* 2004; 4: 337-348.