

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

Estudo eco-epidemiológico de *Leishmania* spp. em hospedeiros invertebrados e pequenos mamíferos na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, Minas Gerais.

por

Gabriel Barbosa Tonelli

Belo Horizonte

2017

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR

G.B.TONELLI 2017

GABRIEL BARBOSA TONELLI

Estudo eco-epidemiológico de *Leishmania* spp. em hospedeiros invertebrados e pequenos mamíferos na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, Minas Gerais.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Doenças Infeciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. José Dilermando Andrade Filho
Coorientação: Dr. Gustavo Fontes Paz

Belo Horizonte

2017

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

T664e
2017

Tonelli, Gabriel Barbosa.

Estudo eco-epidemiológico dos hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, Minas Gerais / Gabriel Barbosa Tonelli. – Belo Horizonte, 2017.

xvii, 69 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 65 - 82

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*/isolamento & purificação 3. Reservatórios de Doenças/parasitologia I. Título. II. Andrade Filho, José Dilermando (Orientação). III. Paz, Gustavo Fontes

CDD – 22. ed. – 616.936 4

GABRIEL BARBOSA TONELLI

Estudo eco-epidemiológico de *Leishmania* spp. em hospedeiros invertebrados e pequenos mamíferos na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, Minas Gerais.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. José Dilermando Andrade Filho
Coorientação: Dr. Gustavo Fontes Paz

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 21/02/2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Geraldo Tonelli e Teresa Tonelli, por todo carinho, dedicação, confiança e apoio.

Ao meu orientador José Dilermando Andrade Filho pela confiança em mim como seu aluno, pela dedicação, ensinamentos, pela amizade e bons momentos inesquecíveis em trabalhos de campo. Espero contar sempre com você!

Ao Dr. Gustavo Fontes Paz pela paciência na coorientação, pelos ensinamentos e oportunidades em trabalhos de campo e pelos bons momentos juntos.

A Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo pelos ensinamentos, recepção no laboratório, paciência e disponibilidade. Pessoa que admiro muito!

Ao Bruno Warley por toda colaboração no início do projeto e amizade.

Ao Felipe Dutra Rêgo quem sempre tive o prazer de acompanhar e ser acompanhado desde que entrei para o Grupo de Pesquisas em Leishmanioses. Obrigado pelo auxílio e ensinamentos em campo. Pela colaboração nos procedimentos laboratoriais e pela amizade que considero muito!

Ao Gustavo Mayr de Lima Carvalho quem muito me auxiliou em trabalhos de campo e fez um papel de co-orientador externo me ensinando muito. Obrigado também pela amizade e bons momentos!

A Aline Tanure pela parceria e grande colaboração durante os anos de coleta e durante o processamento do material coletado.

A Gabriela Ribeiro Ássimos, minha primeira orientação. Obrigado por seu enorme esforço, paciência, colaboração e dedicação. Você é uma pessoa brilhante.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Leishmanioses: Juliana Faustino, Tina, Rogério, Paloma Shimabukuro, Patrícia Quaresma, Danyele Franca, Jucélia, Agnes, Agna e Jerônimo.

Obrigado pelo convívio divertido e bastante proveitoso com muito aprendizado.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela dedicação, ensinamentos e oportunidade de se realizar este estudo.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante o período de trabalho.

Agradeço o Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL), como todo, pela oportunidade de se desenvolver este trabalho.

À Biblioteca do CPqRR, em especial a Nuzia Pereira, pelo acesso à todo acervo necessário e pela informação concedida.

Agradeço aos motoristas do CPqRR, em especial ao Magno e ao Cláudio, por guiarem nossas viagens de campo em segurança e conforto e pela amizade.

A equipe da RPPN Santuário do Caraça por nos aceitar e sempre nos dar total auxílio durante todo o período de trabalho. Em especial ao Pe. Wilson, Pe. Lauro, bióloga Aline, os guias do parque João Júlio e Geraldo (Neneco), Júnior Silva e ao Daniel. Este último o qual tenho um carinho especial por toda motivação, auxílio e enorme amizade gerada. OBRIGADO!

Aos meus amigos de Belo Horizonte, Pedro Leopoldo e Divinópolis quem sempre me deram apoio e forças nos momentos difíceis.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que depositaram pensamentos positivos para o sucesso deste trabalho e que muito me incentivaram.

RESUMO

As leishmanioses são doenças parasitárias de origem zoonótica, sendo transmitidas por flebotomíneos vetores em ambiente silvestres, rurais e urbano. Sua distribuição está condicionada não somente ao vetor, mas também aos mamíferos reservatórios. O presente trabalho teve como objetivo realizar estudos eco-epidemiológicos em relação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados de *Leishmania* spp. no Santuário do Caraça. Do período de Junho de 2013 a Junho de 2014 foram realizadas coletas bimestrais intercaladas de flebotomíneos e de pequenos mamíferos em pontos selecionados ao acaso em locais de atração turística na RPPN Santuário do Caraça. Foram utilizadas 25 armadilhas luminosas do tipo CDC para coletas de flebotomíneos distribuídas em sete trilhas pelo parque. Para coleta dos pequenos mamíferos foram utilizadas 60 armadilhas do tipo Tomahawk distribuídas em seis trilhas (dez armadilhas por trilha). Um total de 376 flebotomíneos foi coletado (300 fêmeas e 76 machos) representando 18 espécies. As espécies mais abundantes foram *Psychodopygus lloydi* (72,79%), *Brumptomyia troglodytes* (5,25%), *Nyssomyia whitmani* (4,01%) e *Pintomyia monticola* (4,30%). Duas amostras de *Ps. lloydi* foram detectadas com DNA de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, utilizando a técnica ITS1 PCR-RFLP, e sete espécimes desta espécie foram identificados com sangue de porco doméstico (*Sus scrofa*) através de sequenciamento do gene *ctyb*. Um total de 55 pequenos mamíferos foi coletado tendo como espécies mais abundantes *Akodon cursor* (56,4%), *Cerradomys subflavus* (10,9%) e *Oligoryzomys nigripes* (10,9%). Foram obtidos seis isolados de *Le. (V.) braziliensis* de fígado e pele de cauda dos mamíferos das espécies *A. cursor* (3), *C. subflavus* (1) e *Oxymycterus dasytrichus* (1). Estes mesmos espécimes foram detectados positivos na técnica de kDNA PCR. Os resultados encontrados inferem que há circulação de *Le. (V.) braziliensis* neste ambiente silvestre e que *Ps. lloydi* possa desempenhar papel importante na manutenção do ciclo neste local e que,

ainda, *A. cursor*, *C. subflavus* e *O. dasytrichus* atuam como hospedeiros de leishmaniose tegumentar na área de estudo.

Palavras-chave: Leishmanioses, Reservatório, Vetor, Isolamento.

ABSTRACT

Leishmaniasis is parasitic diseases of zoonotic origin, being transmitted by sandflies vectors in wild, rural and urban environments. Its distribution is conditioned not only to the vector, but also to the mammalian reservoirs. The present work had as objective to carry out eco-epidemiological studies regarding the vertebrate and invertebrate hosts of *Leishmania* spp. in the Caraça Sanctuary. From June 2013 to June 2014, bimonthly collections of sandflies and small mammals were collected at randomly points at tourist attraction sites at the RPPN Sanctuary of Caraça. Twenty five CDC light traps were used to collect sandflies distributed on seven trails through the park. For the collection of the small mammals 60 traps of the Tomahawk type were distributed in six trails (ten traps per track). A total of 376 sandflies were collected (300 females and 76 males) representing 18 species. The most abundant species were *Psychodopygus lloydi* (72.79%), *Brumptomyia troglodytes* (5.25%), *Nyssomyia whitmani* (4.01%) and *Pintomyia monticola* (4.30%). Two samples of *Ps. lloydi* were detected with *Leishmania (Viannia) braziliensis* DNA using the PCR-RFLP ITS1 technique, and seven specimens of this species were identified with domestic pig blood (*Sus scrofa*) by *ctyb* gene sequencing. A total of 55 small mammals were collected having as most abundant species *Akodon cursor* (56.4%), *Cerradomys subflavus* (10.9%) and *Oligoryzomys nigripes* (10.9%). Six isolates of *Le. (V.) braziliensis* were obtained from liver and tail skin of the species *A. cursor* (3), *C. subflavus* (1) and *Oxymycterus dasytrichus* (1). These same specimens were detected positive in the kDNA PCR technique. The results show that there is *Le. (V.) braziliensis* circulation in this wild environment and that *Ps. lloydi* may play an important role in the maintenance of the cycle at this site and that, furthermore, *A. cursor*, *C. subflavus* and *O. dasytrichus* act as hosts for cutaneous leishmaniasis in the study area.

Key-Words: Leishmaniasis, Reservoir, Vector, Isolation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa representativo da localização da Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça em Minas Gerais, Brasil.....31
- Figura 2:** Vista do Santuário do Caraça a partir do Cruzeiro.....32
- Figura 3:** Algumas das principais atrações turísticas encontradas na RPPN Santuário do Caraça.....32
- Figura 4:** Armadilhas luminosas do tipo CDC utilizadas nas coletas de flebotomíneos ao longo da RPPN Santuário do Caraça.....33
- Figura 5:** Pontos de coleta de flebotomíneos distribuídos ao longo da RPPN Santuário do Caraça.....35
- Figura 6:** Localização das trilhas para coleta dos pequenos mamíferos ao longo da RPPN Santuário do Caraça.....37
- Figura 7:** Pequenos mamíferos capturados nas armadilhas do tipo Tomahawk na região da trilha 2 na RPPN Santuário do Caraça.....38
- Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras positivas na PCR-ITS1 dos flebotomíneos coletados na RPPN Santuário do Caraça. PM = Peso Molecular; 19.3 e 19.7 = Amostras positivas; La, Lb, Li e Lg = Controles positivos de cepas de *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensi* respectivamente.....48
- Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose a 4% da RFLP-ITS1 PCR das amostras positivas na detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos coletados na RPPN Santuário do Caraça. PM = Peso Molecular; 19.3 e 19.7 = Amostras positivas; La, Lb, Li e Lg = Controles positivos de cepas de *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensis* respectivamente.....48
- Figura 10:** Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio com produtos amplificados da reação de PCR *cytb* de fêmeas de flebotomíneos naturalmente alimentadas capturadas na RPPN. PM – Peso Molecular 100pb; 1 a 13 – amostras das fêmeas de flebotomíneos naturalmente alimentadas; CP: Controle Positivo e CN: Controle Negativo.....49
- Figura 11:** Curva de rarefação baseada em amostras para riqueza de pequenos mamíferos nas duas áreas amostradas na RPPN Santuário do Caraça.....52
- Figura 12:** Curva de estimativa de espécies de pequenos mamíferos da RPPN Santuário do Caraça utilizando o estimados não paramétrico Jackknife 1.....53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Sazonalidade dos flebotomíneos capturados na RPPN Santuário do Caraça durante o período de coleta.....46
- Gráfico 2:** Frequência dos pequenos mamíferos capturados durante o período de captura na RPPN Santuário do Caraça.....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Espécies de flebotomíneos coletados na RPPN Santuário do Caraça distribuídos por trilha de coleta.....47
- Tabela 2:** Fonte alimentar identificada após sequenciamento do produto amplificado da PCR cytb das fêmeas de flebotomíneos naturalmente alimentadas coletadas na RPPN Santuário do Caraça.....50
- Tabela 3:** Pequenos mamíferos capturados na RPPN Santuário do Caraça em cada trilha amostral.....52
- Tabela 4:** Espécies de pequenos mamíferos capturados na RPPN Santuário do Caraça por análise molecular e amostras positivas para cultura.....53
- Tabela 5:** Espécies de pequenos mamíferos capturados na RPPN Santuário do Caraça que foram positivas na análise molecular por kDNA PCR e análise em cultura por tecido.....54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ L: microlitro

A. cursor: *Akodon cursor*

Br.: *Brumptomyia*

C. subflavus: *Cerradomys subflavus*

CEUA: Comitê de Ética em Uso Animal

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

DNA: Ácido desoxirribonucleico

°C: Graus Celsius

E.: *Equus*

Ev.: *Evandromyia*

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ITS1: *Internal Transcribed Spacer 1*

kDNA: Região conservada dos minicírculos do DNA de *Leishmania*

LCD: leishmaniose cutânea difusa

ISA: Índice de Abundância de Espécies

H: Shannon

J: Equitabilidade

LCL: leishmaniose cutânea localizada

NMDS: Escala Multidimensional Não-Métrica

LMC: leishmaniose mucocutânea

Le.: *Leishmania*

LIT: Liver Infusion Tryptose

FBS: Soro Fetal Bovino

HSP70: Heat Shot Protein 70

Cytb: Citocromo b

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LT: leishmaniose tegumentar

Lu: Lutzomyia

La: Leishmania amazonenses

Lb: Leishmania braziliensis

Li: Leishmania infantum

Lg: Leishmania guyanensis

CN: Controle Negativo

CP: Controle positivo

LV: Leishmaniose Visceral

MG: Minas Gerais

Mi: Micropygomyia

MMA: Ministério do Meio Ambiente

MS: Ministério da Saúde

NNN: Novy-MacNeal-Nicolle

Ny: Nyssomyia

OMS: Organização Mundial de Saúde

O. dasytrichus: Oxymycterus dasytrichus

Pb: pares de bases

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PCR-RFLP: *Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*

PM: Peso molecular

Ps.: Psychodopygus

Pi.: Pintomyia

RPPNSC: Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Observações gerais sobre as leishmanioses.....	18
1.2 Leishmaniose visceral.....	20
1.3 Leishmaniose tegumentar.....	22
1.4 Flebotomíneos.....	24
1.5 Os reservatórios e <i>Leishmania</i>	26
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Área de Estudo.....	30
4.2 Estudo dos flebotomíneos.....	33
4.3 Estudo dos pequenos mamíferos.....	36
4.4 Análises moleculares.....	38
4.4.1 Análise molecular dos flebotomíneos.....	38
4.4.2 Análise molecular dos pequenos mamíferos.....	39
4.4.3 Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> por PCR RFLP.....	39
4.5 Cultura.....	39
4.6 Identificação do repasto sanguíneo em fêmeas de flebotomíneos alimentadas naturalmente.....	40
4.6.1 Extração do DNA.....	40
4.6.2 PCR do gene <i>cytb</i>	41
4.6.3 Eletroforese do produto amplificado.....	41

4.7	Análise espacial.....	42
4.8	Análise estatística.....	43
4.8.1	Flebotomíneos.....	43
4.8.2	Pequenos mamíferos.....	43
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Fauna e a infecção dos flebotomíneos.....	45
5.1.1	A fonte alimentar dos flebotomíneos do Caraça.....	49
5.2	Fauna e pequenos mamíferos e a infecção natural por <i>Leishmania braziliensis</i>	50
6	DISCUSSÃO.....	55
6.1	A fauna flebotomínica na RPPNSC e a infecção por <i>Leishmania braziliensis</i>	56
6.2	A infecção e o isolamento de <i>Leishmania braziliensis</i> nos hospedeiros vertebrados na RPPNSC.....	59
7	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	ANEXOS.....	83
	Anexo 1 – Licença permanente para coleta de material zoológico nº15237-2 do Ministério do Meio Ambiente (MMA).....	83
	Anexo 2 – Aceite para depósito de material flebotomínico na Coleção de Flebotomíneos do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (COLFLEB/FIOCRUZ).....	85
	Anexo 3 – Submissão do estudo dos flebotomíneos para publicação em formato de artigo na revista PLoS ONE.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Observações gerais sobre as leishmanioses

As leishmanioses são as mais complexas de todas as doenças transmitidas por vetores, em sua ecologia e epidemiologia. Tem como agentes etiológicos parasitos pertencentes à família Tripanosomatidae (Döflein, 1901) e à ordem Kinetoplastida. Existem aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* descritas e destas, 31 espécies são conhecidas como parasitas de mamíferos e 20 espécies causam doença ao homem (Akhoundi *et al.*, 2016). Esta parasitose envolve diversas espécies de reservatórios vertebrados e de flebotomíneos vetores evidenciando sua complexibilidade em relação a sua ecoepidemiologia (Brandão-Filho *et al.*, 2003; Ready, 2013).

Parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários digenéticos que apresentam duas formas evolutivas básicas: a forma promastigota (flagelada) e a forma amastigota (sem flagelo) (Akhoundi *et al.*, 2016). A forma flagelada é encontrada no tubo digestório do inseto vetor e é a forma infectante. Já a forma amastigota é uma forma intracelular obrigatória encontrada nas células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros vertebrados (MacMorris-Adix, 2009).

Estes parasitos são transmitidos, em seu ciclo, através da picada das fêmeas infectadas dos vetores flebotomíneos, no ato do repasto sanguíneo, inoculando formas flageladas infectivas no hospedeiro vertebrado (Dawit, 2013). Neste, por sua vez, o parasito é englobado pelas células de defesa do sistema mononuclear fagocitário dos mamíferos e se diferencia para a forma amastigota, que se reproduz no meio intracelular até o rompimento da célula, liberando várias formas amastigotas. Estas formas liberadas serão fagocitadas por outra célula de defesa e se iniciará o processo de infecção novamente (Killick-Kendrick, 1981; Kaye &

Scott, 2011; Dawit, 2013). Outras formas de transmissão das leishmanioses são mencionadas por Dawit (2013) como, por exemplo, através de transfusão sanguínea, via transplacentária e acidentes laboratoriais.

As leishmanioses se manifestam basicamente em duas formas clínicas: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT) (Lainson & Shaw 1987; Ashford, 2000; Cattand *et al.*, 2006). Estão amplamente distribuídas no mundo ocorrendo em cerca de 100 países do mundo, de clima subtropical ou tropical, em ciclos antroponóticos e zoonóticos e são estimados 1,6 milhões de casos novos por ano e mais de 300 milhões de pessoas em situação de exposição à doença (WHO, 2010; WHO, 2014). No Brasil, as leishmanioses, em geral, apresentam ampla distribuição alcançando todo território com alta concentração em algumas áreas como o Norte, que contribui com 36,6% do total dos casos registrados no ano. Outra região de maior concentração de casos de leishmanioses no Brasil é o Centro-Oeste, com média de 38,8 casos por 100.000 habitantes (Alvar *et al.*, 2012). A identificação das regiões de maior prevalência de casos no país permite, ainda, que sejam identificadas áreas de menor endemicidade e que mereçam maior foco na prevenção de novos casos uma vez que os casos de leishmaniose vêm demonstrando constante crescimento populacional (Costa, 2005; WHO, 2011; Alvar *et al.*, 2012).

As leishmanioses são bastante dinâmicas, sendo as circunstâncias de transmissão continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e do comportamento humano. Modificações no habitat natural dos vetores e hospedeiros naturais têm contribuído para a mudança no panorama epidemiológico das leishmanioses mantendo sua origem silvestre. A epidemiologia das leishmanioses somente pode ser compreendida mediante o conhecimento dos elos que compõem seu ciclo de transmissão, como os vetores e reservatórios envolvidos, e suas relações ecológicas (Ferreira *et al.*, 2012).

1.2 Leishmaniose visceral

A LV é causada por parasitos do complexo *Le. donovani* e *Le. infantum*, sendo a primeira somente no Velho Mundo (Campino *et al.*, 2006; Seridi *et al.*, 2008ab; Laurent *et al.*, 2009). É uma zoonose caracterizada pela evolução crônica da doença e pela sua mortalidade alcançando 90% dos casos se não tratada (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Em relação às manifestações clínicas destes parasitos, alguns casos são assintomáticos, porém, alguns sintomas podem ser observados em algumas infecções como, por exemplo: febre, perda de peso, anorexia, tremores, mal estar (WHO, 2010). Ainda, são observadas como sinais clínicos mais comuns as megalias do fígado e baço, não necessariamente em ambos os órgãos no mesmo momento, palidez das membranas mucosas e linfadenopatia (WHO, 2010).

A LV é a forma clínica mais grave da leishmaniose estimando-se mais de 500.000 novos casos anuais com mais de 50.000 óbitos (WHO, 2011). Sua distribuição está acondicionada a regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Deane & Deane, 1962) e tem 90% dos casos notificados em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2014). O primeiro relato de caso de LV no território nacional foi realizado em 1913, em um paciente de Boa Esperança, Mato Grosso (Migone, 1913). Acredita-se que esta parasitose teve sua abrangência ao longo do território brasileiro a partir das alterações antrópicas no ambiente e intensa e rápida migração da população rural para zonas periféricas das cidades com inadequadas infraestruturas sanitárias. Neste ambiente, animais silvestres juntamente com o cão desempenharam papel de reservatório (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008) levando, posteriormente, a urbanização da LV (Alencar, 1983; Rangel & Vilela, 2008). Nas zonas periféricas, podem ser facilmente observados locais que favorecem a existência de vetores da leishmaniose como acúmulo de lixo, presença de matéria orgânica, tocas de roedores, abrigos de animais e frestas nas construções (MacMorris-Adix, 2009).

A principal espécie de flebotomíneos envolvida na transmissão da LV nas Américas é a *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Lu. longipalpis*, é encontrada em abundância em áreas peridomiciliares e ambientes rurais (Ferreira *et al.*, 2013; Rêgo *et al.*, 2014) e como discutido por (Rangel & Vilela, 2008), esta espécie se encontra em processo de adaptação à ambientes modificados pelo homem permitindo, então, a manutenção dos ciclos de transmissão da LV em ambientes rurais e possível propagação para áreas urbanas, guiando para um perfil diferenciado de transmissão. Esta espécie apresenta todos os critérios estabelecidos por Killick & Kendrick (1990) para competência vetorial destacando os critérios essenciais como comportamento antropofílico, distribuição espacial coincidindo com casos humanos da parasitose e infecção natural por *Le. infantum* (Deane, 1956; Lainson & Rangel, 2005; Rangel & Vilela, 2008).

Este parasito tem como hospedeiros/reservatórios no meio silvestre alguns canídeos como *Cerdocyon thous* e *Lycolopex vetulus* (Deane & Deane, 1954; Lainson *et al.*, 1969), além de alguns roedores e marsupiais como o *Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis* (Lainson & Shaw, 1987; Sherlock *et al.*, 1984; Grimaldi *et al.*, 1969). Outro reservatório da LV, considerado o principal em meio rural e urbano, é o *Canis familiaris*, cão doméstico, que há milhares de anos fora o primeiro animal domesticado pelo homem, aumentando o contato com um potencial reservatório permitindo, assim, aumentar a complexidade da epidemiologia da LV (Ashford, 1996).

É notável que nas cidades onde seja encontrada uma considerável população de cães, são observados casos de LV (Oliveira *et al.*, 2001) logo, estes animais são grandes alvos das estratégias de controle desta doença em meios urbanos (MS, 2006). Porém, a expansão e urbanização desta doença trazem incertezas quanto sua epidemiologia e quais são de fato os reservatórios e vetores que atuam como mantenedores do parasito, aumentando a necessidade

de maior compreensão do ciclo urbano da LV (Moreno *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2008; MS, 2006).

1.3 Leishmaniose tegumentar

A LT é causada por parasitos dos subgêneros *Leishmania*, com espécies no velho e novo mundo, e *Viannia*, com espécies no novo mundo (Hide *et al.*, 2007; Rethinger, *et al.*, 2007). É caracterizada por manifestações clínicas como desenvolvimento de lesões ulceradas no local da picada do flebotomíneo vetor (leishmaniose cutanea localizada – LCL) e tem tendência à cura espontânea; nódulos não ulcerados ao longo do corpo do paciente (leishmaniose cutanea difusa – LCD); e inflamação no tecido mucoso comprometendo o tecido conjuntivo (leishmaniose mucosa – LM) que é uma forma secundária da lesão cutânea que afeta, geralmente, as mucosas das vias aéreas superiores e que em alguns casos pode haver comprometimento de conjuntivas oculares e mucosas de órgãos genitais e ânus (Rethinger *et al.*, 2007; MS, 2017).

A LT é uma zoonose endêmica mais de 70 países do mundo e 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Brasil, Paquistão, Argeria, Peru, Arábia Saudita e na Síria (Desjeux, 2004). A leishmaniose tegumentar ocorre no continente Americano desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina apresentando principal foco de distribuição da doença na porção sul-americana, compreendendo todos os países exceto o Uruguai e Chile (Montenegro, 1926).

O Brasil corresponde a mais de 80% dos casos autóctones que acometem o continente americano (Monteiro *et al.*, 1994) tendo as todas as suas regiões afetadas pela doença, com maior incidência no Norte (41,1%) (MS, 2012). A distribuição da LTA é embasada em casos notificados em humanos (Lainson & Shaw, 1987) o que compromete ainda mais o conhecimento sobre o alcance territorial desta parasitose, pois existem mamíferos silvestres

que fazem papel de mantenedores do ciclo da doença permitindo, assim, a transmissão nestes ambientes. A sua expansão geográfica está em constante crescimento e alguns dos fatores responsáveis por tal expansão são os relacionados às atividades de desmatamento (Martins *et al.*, 1956; Gontijo *et al.*, 2002) e também as mudanças no comportamento da população humana que possam alterar o ambiente e que, ainda, permita maior contato entre vetores e reservatórios com humanos, variando, assim os padrões de transmissão da doença (Chaves *et al.*, 2008; Travi *et al.*, 2002).

A LTA é considerada uma doença de origem silvestre e que se encontra em expansão geográfica. É uma doença infecciosa, não contagiosa, e sua importância médica está associada a pessoas que entram em contato com áreas silvestres e com a fauna local destes ambientes, porém podem ser encontrados casos em áreas rurais e em regiões periurbanas (MS, 2017). Três perfis epidemiológicos podem ser observados para LTA: i) Perfil silvestre: aonde a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária; ii) Perfil Ocupacional ou de Lazer: tem a transmissão associada às atividades em áreas de mata como trabalhos rurais, ecoturismo e construções e/ou ampliações de estradas; iii) Perfil Rural ou Periurbano: apresenta transmissões em áreas urbanas e/ou periurbanas (MS, 2017).

A LTA apresenta grande diversidade de agentes, de vetores e de hospedeiros/reservatórios que possibilitam a expansão destas doenças para regiões não estudadas ainda, tornando a elucidação de sua epidemiologia cada vez mais complexa. O parasito apresenta diversas espécies, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, pelo mundo e várias delas podem realizar o papel de agente etiológico da LTA no Brasil como, por exemplo, *Le. (Leishmania) amazonensis*, *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (V) guyanensis*, *Le. (V) lainsoni*, *Le. (V) shawi* e *Le. (V) naiffi* (Gontijo e Carvalho, 2003; Lainson, 2010).

Diversas espécies de flebotomíneos estão associadas à transmissão das leishmanioses que causam LTA no Brasil. Algumas espécies já foram incriminadas como vetores, como por

exemplo, *Nyssomyia intermedia*, vetor de *Le. braziliensis*, que se alimenta tanto em animais silvestres quando em animais domésticos e também apresenta hábito antropofílico, colocando em risco a saúde humana (de Souza *et al.*, 2006; Margonari *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2010). Outra espécie de flebotomíneos de importância médica para LTA é *Ny. whitmani*. Esta espécie apresenta distribuição geográfica bastante ampla sendo observada em quase todo território brasileiro (Rangel & Lainson, 2009; Carvalho *et al.*, 2013).

Em relação aos reservatórios da LTA destacam-se algumas espécies de animais silvestres como espécimes das ordens Rodentia, Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Chiroptera (Ashford, 1996; Gontijo e Carvalho, 2003; Roque & Jansen, 2014). Em um estudo, Truppel *et al* (2014), foi detectada infecção por *Le. braziliensis*, através de métodos moleculares e sorológicos, em cavalo e em mula no Sul do Brasil sugerindo possível papel destes animais como mantenedores do parasito no ambiente. O comportamento sinantrópico de alguns animais como ratos e gambás pode ser o fator que permita a urbanização do ciclo da LTA colocando em risco a saúde humana o que tornam estes animais alvo de estudos para controle dos reservatórios das leishmanioses (Brandão-Filho, *et al.*, 2003).

1.4 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos dípteros em que as fêmeas apresentam hábito hematófago. Pertencem a família Psychodidae e subfamília Phlebotominae Galati (2003). Os flebotomíneos passam por várias fases evolutivas sendo caracterizados como holometábolos. As formas imaturas se desenvolvem em área rica em matéria orgânica e a forma adulta tem como características o voo saltado e a posição das asas em 90° em relação ao abdômen do inseto. A ocorrência de flebotomíneos é relatada nos mais diversos ambientes e, por

apresentar superfície corporal bastante delicada, são encontrados abrigando-se em locais seguros possibilitando sua proteção contra as mudanças severas no meio ambiente (Lewis, 1974).

Aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos são conhecidas em nosso planeta. Destas, mais da metade está presente na região Neotropical sendo que 229 foram registradas no Brasil (Galati, 2003; Ready, 2013). Os flebotomíneos são bastante estudados, pois tem a capacidade de atuarem como hospedeiros de fungos, bactérias e protozoários (Forattini, 1973; Warbug, 1991; Shaw, 1992; Dujardin *et al.* 1999). Entretanto, o estudo dos flebotomíneos tem grande foco no seu papel epidemiológico em relação às leishmanioses a fim de compreendermos melhor as espécies envolvidas nos ciclos urbanos e silvestres e suas relações com os hospedeiros/reservatórios.

Lu. longipalpis (Lutz & Neiva, 1912), principal espécie vetor da *Le. infantum* no Brasil (Deane, 1956; Lainson & Rangel, 2005) tem grande relação com algumas aves, homem e diversas espécies de mamíferos domésticos e sinantrópicos que atuam como hospedeiros e reservatórios. Outras espécies como *Ny. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Ny. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), são importantes vetores de *Le. braziliensis*, agente etiológico da LTA na região Sudeste. Essas três espécies de flebotomíneos demonstram considerável grau de adaptação ao ambiente modificado, além de comportamento antropofílico no que diz respeito a sua alimentação (Gomes & Neves, 1998; Rangel *et al.*, 1984; Gontijo *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Andrade Filho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008). Outras espécies de flebotomíneos vêm sendo sugeridas, através de análises moleculares, como vetores de *Leishmania spp.* como, por exemplo, *Ny. neivai*, *Evandromyia sallesi* e *Psychodopygus lloydi* (Andrade Filho *et al.* 2007; Saraiva *et al.* 2009; Quaresma *et al.*, 2012).

1.5 Os reservatórios de *leishmania*

A distribuição das leishmanioses está condicionada principalmente à distribuição dos insetos vetores. Entretanto, os ciclos de transmissão dependem do fluxo dos reservatórios mamíferos e dos insetos vetores, sendo a ecologia dos reservatórios e vetores determinante dos perfis epidemiológicos da doença. Portanto, o conhecimento dos reservatórios é fundamental para programar medidas efetivas de prevenção e controle (Silva *et al.*, 2005).

Forattini (1960) discute sobre o foco epidemiológico dos órgãos de saúde para o homem e animais domésticos não levando em conta o conceito de que as leishmanioses são parasitoses de origem silvestre e que nestes ambientes a fauna responsável pela manutenção dos ciclos da doença é pouco conhecida. Os ciclos silvestres são bastante antigos e foram moldados por milhões de anos antes do surgimento do homem através de relações co-evolutivas entre os parasitas, vetores e hospedeiros mamíferos. Reservatórios mamíferos e insetos vetores foram mantendo continuamente os parasitas em equilíbrio sem envolvimento humano (Carreira *et al.*, 2014).

O conceito de reservatório é adotado a aqueles vertebrados susceptíveis a infecção do parasito e que, ainda, permite que este agente alcance o estágio de transmissão. Para se incriminar um animal como reservatório, alguns requisitos são discutidos e ordenados em um sistema de reservatórios de doenças parasitárias como demonstrado por Ashford (1997).

Alguns mamíferos silvestres já foram mencionados por sua importância médica por serem reservatórios ou hospedeiros acidentais de *Leishmania* spp. como as espécies da ordem Rodentia: *Meriones shawi*, *Rhombomys opimus*, *Rattus rattus*, *Oryzomys capito*, *Akodon sp.* e *Cuniculus paca*; Marsupialia: *Didelphis marsupialis*, *D. albiventris* e *Phinlander opossum*; Xenarthra: *Tamandua tetradactyla*; Carnivora: *Cerdocyon thous* e *Felis catus*; Perissodactyla: *Equus asinus*, *E. caballus* (Ashford, 1996; Gramiccia & Gradoni, 2005; MS, 2017).

Os reservatórios que apresentam comportamento sinantrópico são encontrados em ambientes de mata frequentados pela ação antrópica e algumas espécies são vistas com frequência nos quintais das residências situadas nas bordas das matas (Roque & Jansen, 2014). Além de contribuir para a manutenção do parasito na enzootia silvestre, algumas espécies de roedores e marsupiais são importantes na conexão entre os ciclos silvestre, rural e urbano (Cabrera *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2015).

Compreender a interação entre os reservatórios e flebotomíneos vetores no ambiente aonde são encontrados é um pré-requisito para o direcionamento de estratégias apropriadas de medidas de controle e prevenção das leishmanioses (Costa *et al.*, 1999).

Apesar de não haverem notificações de casos de leishmaniose na RPPN Santuário do Caraça faz-se importante a realização de estudos no local sobre a fauna de possíveis reservatórios vertebrados e invertebrados do parasito uma vez que existem relatos de casos nas cidades próximas, a fauna de vertebrados é bastante rica e, nesta, existem espécimes pertencentes a ordens de importância médica e, por fim, não há estudos sobre os flebotomíneos no local.

2 JUSTIFICATIVA

A região do Santuário do Caraça certamente vem sofrendo uma pressão dos municípios vizinhos onde já foram registrados casos autóctones de leishmaniose humana e canina. O grande fluxo de pessoas e animais possibilita o contato entre vetor/reservatório e vetor/homem, o que, poderá ocasionar o aumento na prevalência da infecção com consequente aumento no número de casos das doenças. O Santuário do Caraça recebe em média, 60.000 visitantes por ano, dos quais pelo menos 17.500 são hóspedes em sua pousada. Isso faz com que seja, por sua relevância e implicação social, uma das mais importantes e mais visitadas Unidades de Conservação do Estado de Minas Gerais. (PSC, 2012). O incremento turístico e econômico nesta região associado à importância médica dos flebotomíneos justificam estudos mais detalhados quanto ao comportamento destes insetos, no sentido de entender suas relações no ambiente silvestre, e, de certo modo, conhecer os possíveis riscos à saúde oferecidos aos visitantes e trabalhadores do RPPNSC.

Estes fatos justificam o desenvolvimento de um estudo eco-epidemiológico sobre os hospedeiros vertebrados e invertebrados de *Leishmania* spp. para contribuir com os órgãos de vigilância epidemiológica que atuam na região do Santuário do Caraça.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos eco-epidemiológicos referentes aos hospedeiros vertebrados e invertebrados de *Leishmania spp.* no Santuário do Caraça.

3.2. Objetivos específicos

1. Descrever os padrões de riqueza e diversidade das espécies de flebotomíneos em diferentes áreas do Santuário do Caraça;
2. Estudar a variação sazonal da fauna flebotomínica;
3. Estudar a fauna de pequenos mamíferos;
4. Detectar, isolar e identificar *Leishmania spp.* em pequenos mamíferos e nas fêmeas de flebotomíneos coletadas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça (RPPNSC) está inserido na porção sul no Quadrilátero Ferrífero com uma área de 11.233 hectares, sendo 10.187,89 hectares reservados como área de conservação (Figura 1), localizada na Região Sudeste de Minas Gerais e sua vegetação é caracterizada pela transição entre Cerrado e Mata Atlântida (Talamoni, 2014; Paula, 1997).

Enquadrado na categoria de Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) reconhecida e protegida pelo IBAMA. O Caraça recebe grande número de visitantes por ano com número significativo de hóspedes e oferece um turismo com trilhas para vários locais, dentre estes, diversas grutas e cachoeiras espalhadas na área, que podem chegar a 150 metros de profundidade (PSC, 2012), tornando esta região grande alvo de ecoturismo (Figura 2 e 3). É uma das maiores atrações ecoturísticas do estado e do Brasil recebendo visitantes de todo globo. A RPPNSC fornece atrativos turísticos como trilhas já delimitadas que levam em locais bastante apreciáveis como picos e cachoeiras. Além disso, o local é composto por uma fauna bastante rica de vertebrados e invertebrados, que chama a atenção de vários turistas e pesquisadores para observação e estudos.

Em relação aos mamíferos, o local abriga 46 espécies de roedores além de outros espécimes de diversas ordens de vertebrados (PSC, 2012). Ainda em seu plano de manejo, apesar de não terem sido realizados estudos sobre flebotomíneos na RPPN, constam espécies destes dípteros observados na região que circunda o Santuário do Caraça como: *Brumptomyia troglodytes* (Lutz, 1922), *Lutzomyia ischyracantha* (Martins, Falcão & Silva, 1962),

Psathyromyia shannoni (Dyar, 1929) e *Pintomyia biachigalatae* (Andrade-Filho, Aguiar, Dias & Falcão, 1999).

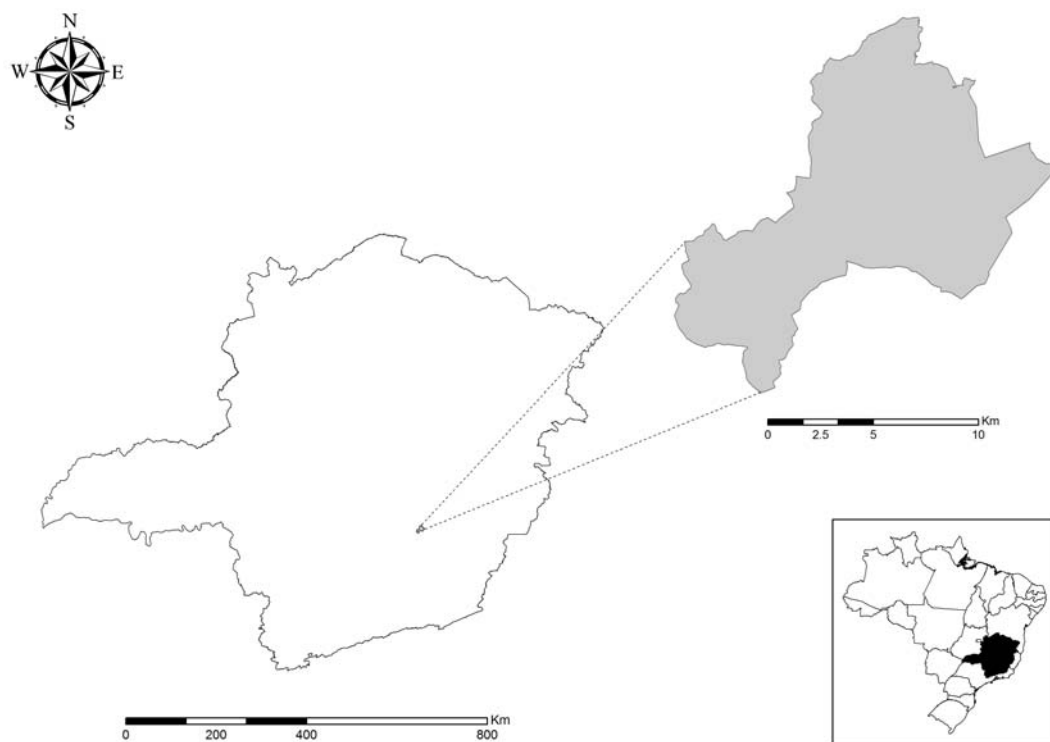


Figura 1 – Mapa representativo da localização do Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça em Minas Gerais, Brasil.



Figura 2 – Vista do Santuário do Caraça a partir do Cruzeiro.

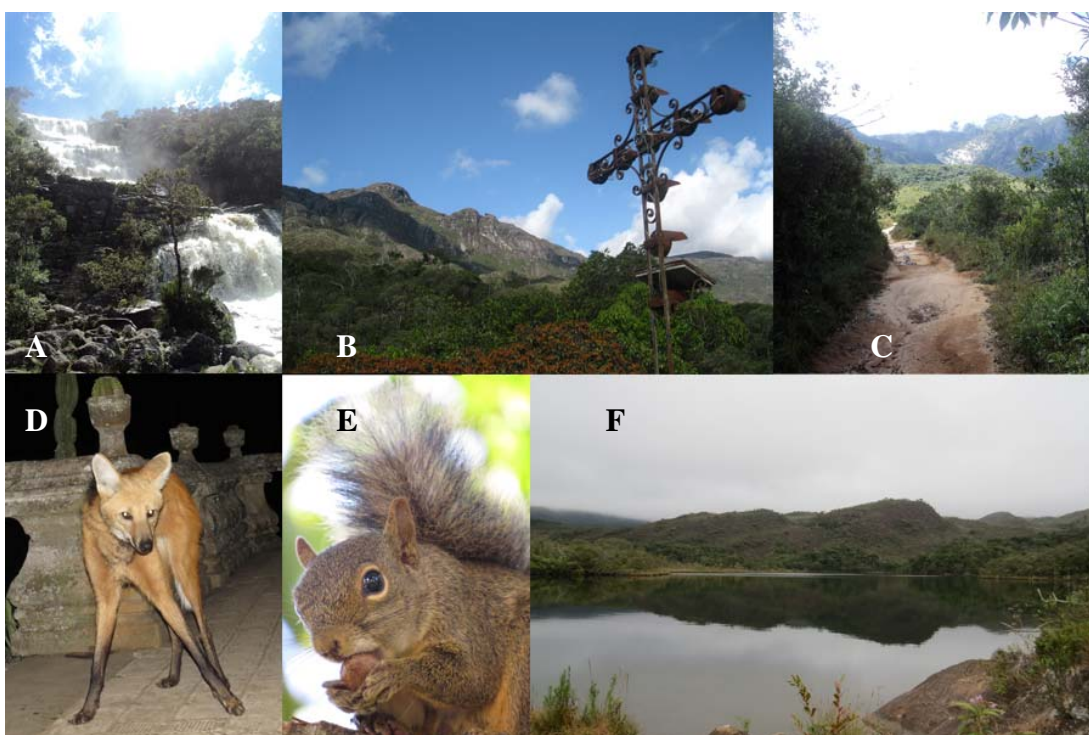


Figura 3 – Algumas das principais atrações turísticas encontradas na RPPN Santuário do Caraça. **A:** Cascatinha. **B:** Pico da Carapuça visto a partir do Cruzeiro. **C:** Trilha para a Cascatinha. **D:** Lobo Guará. **E:** Caxinguelê. **F:** Vista do Tanque Grande.

4.2 Estudo dos flebotomíneos

Utilizamos 25 armadilhas luminosas do tipo CDC distribuídas em sete trilhas ao longo da RPPNSC (Figura 4). As Trilhas 1 e 2 (Mata da Cascatinha e Cascatinha) estão localizadas em áreas de floresta; trilhas 3 e 4 (Pedra da Paciência e Gruta do Bocaina) se encontram em locais de campo rupestre e uma armadilha em uma caverna; trilhas 5 e 6 (Casa dos Pesquisadores e Casa das Sampaiais) estão localizadas em região peridoméstica e intradoméstica e a trilha 7 (Engenho) está localizada em área peridoméstica ao entorno do Santuário do Caraça, próximo às construções para hospedagem de turistas no parque (Figura 5).



Figura 4 – Armadilhas luminosas do tipo CDC utilizadas nas coletas de flebotomíneos ao longo da RPPN Santuário do Caraça. A – Armadilha disposta em um galinheiro em área peridoméstica; B – Armadilha disposta em zona afótica da Gruta do Bocaina; C e E –

Armadilhas dispostas em área de mata na trilha da Cascatinha e D – armadilha disposta no lado externo da casa dos pesquisadores.

As campanhas de coleta foram realizadas bimestralmente entre Junho de 2013 e Junho de 2014. A temperatura e umidade relativa do ar foram medidas durante as semanas de coleta para análises sazonais com o auxílio de um termômetro analógico. As coletas foram realizadas sob a licença permanente para coleta de material zoológico nº 15237-2 do Ministério do Meio Ambiente – MMA (Anexo 1).

Os flebotomíneos capturados foram armazenados em tubos contendo álcool 70% para posteriores análises e identificação. Em laboratório, indivíduos machos foram montados em Berlese enquanto indivíduos fêmeas foram dissecados para subsequente análise molecular e identificadas pela estrutura do cibário e pela espermateca. A classificação utilizada foi a mesma proposta por Galati (2003). Os espécimes montados estão depositados na Coleção de Flebotomíneos do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz - FIOCRUZ-COLFLEB (Anexo 2).

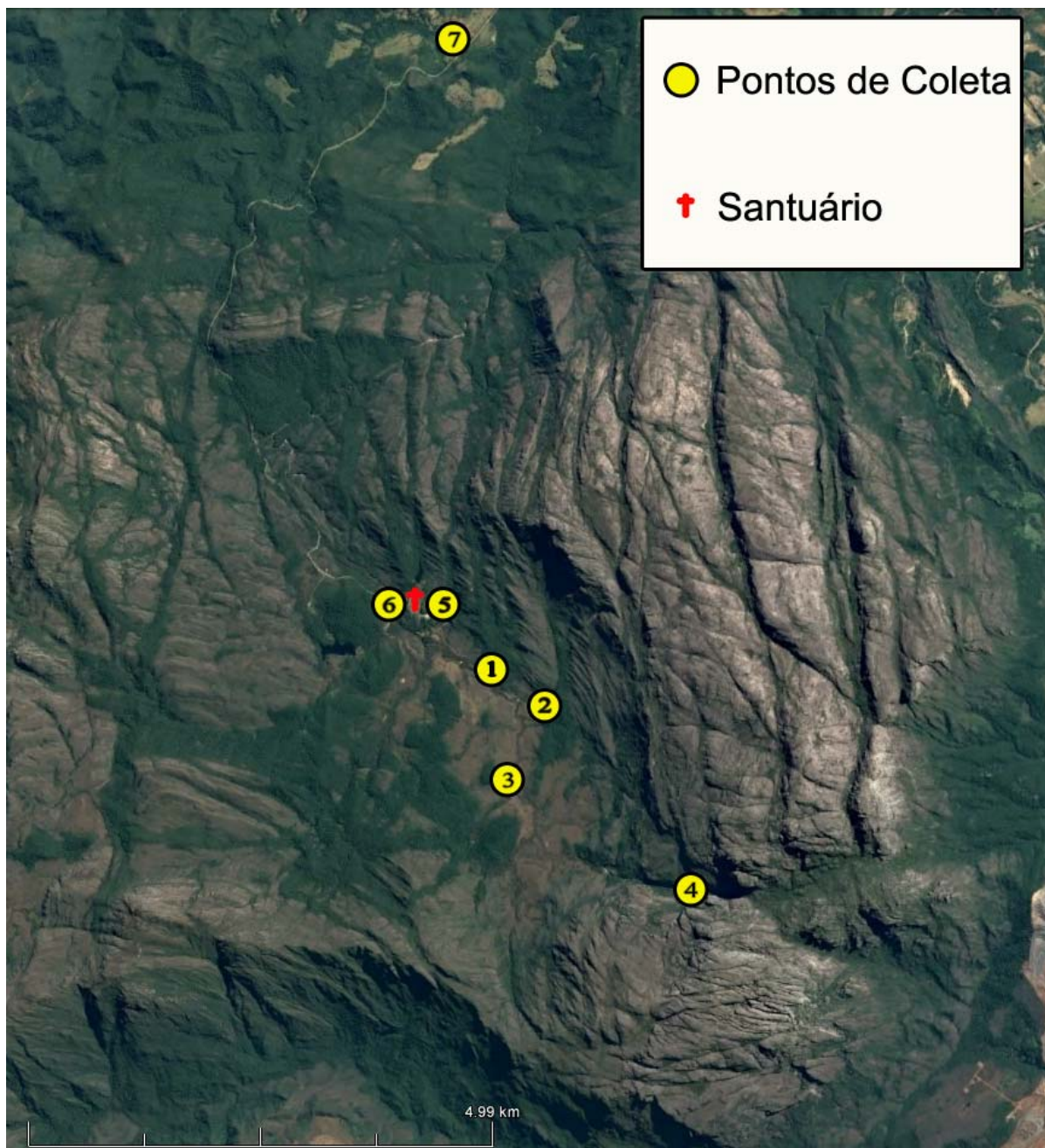


Figura 5 – Pontos de coleta de flebotomíneos distribuídos ao longo da RPPN Santuário do Caraça. Os pontos amarelos numerados representam os locais de captura em ordem numérica para identificação das trilhas. A cruz vermelha representa a localização do Santuário do Caraça.

4.3 Estudo dos pequenos mamíferos

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz) tendo protocolo registrado sob o número 14/16-3 e, também, sob licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) nº 40191-2. Todos os procedimentos envolvendo pequenos mamíferos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

As coletas dos pequenos mamíferos foram realizadas bimestralmente entre Julho de 2013 a Maio de 2014. As coletas eram realizadas por quatro noites consecutivas por mês de captura utilizando armadilhas Tomahawk® (30 x 17,5 x 15,5 cm). Foram traçadas seis trilhas para amostragem contendo dez armadilhas cada. Cada trilha de coleta era localizada em trilhas da RPPNSC com características diferentes (Figura 6). Como isca atrativa para os pequenos mamíferos, foi utilizada uma mistura de fragmentos de abacaxi e algodão embebido em emulsão Scott® que, em alguns estudos, já demonstrou efetiva atração para pequenos mamíferos silvestres (Lancher *et al.*, 1989; Quaresma *et al.*, 2011) (Figura 7).

Para coleta de material e necropsia, cada animal capturado foi anestesiado por uma associação de xilazina (10 mg/Kg) e quetamina (200 mg/Kg) seguido de eutanásia por overdose de thiopental (1,25%) em concentração três vezes maior que a do plano anestésico. Amostras de baço, fígado, medula, pele de orelha e pele de cauda foram retirados para extração de DNA e posterior análises parasitológicas. A identificação dos pequenos mamíferos seguiu literatura específica (Gardner, 2007; Bonvicino *et al.*, 2008; Patton *et al.*, 2015) e comparação com espécies já depositadas seguindo a nomenclatura utilizada por Paglia *et al.* (2012). Os espécimes coletados foram depositados na Coleção de Mamíferos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

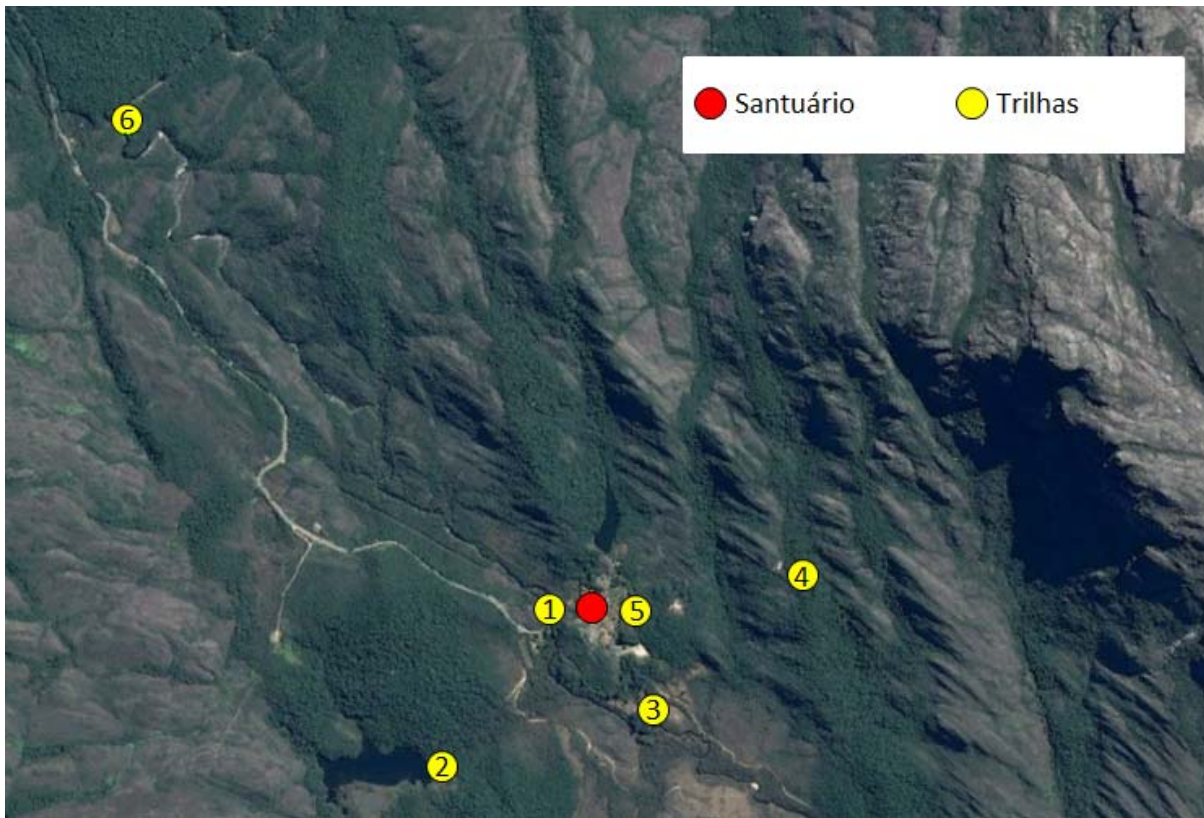


Figura 6 – Localização das trilhas para coleta dos pequenos mamíferos ao longo da RPPN Santuário do Caraça. Os pontos amarelos numerados representam os locais das trilhas e suas respectivas identificações. O ponto vermelho representa a localização do Santuário do Caraça.



Figura 7 – Pequenos mamíferos capturados nas armadilhas do tipo Tomahawk na região da trilha 2 na RPPN Santuário do Caraça.

4.4 Análises moleculares

4.4.1 Análise Molecular dos Flebotomíneos

As fêmeas dos flebotomíneos coletadas e os tecidos extraídos a partir dos pequenos mamíferos silvestres capturados foram submetidos à extração total do DNA individualmente utilizando o Kit Genra Puregene (Qiagen, USA) seguindo o protocolo do fabricante.

Em relação aos flebotomíneos, o DNA extraído foi sujeito à amplificação do fragmento de 300-350pb da região intergênica do DNA de *Leishmania* (Internal Transcribed Spacer q – ITS1) utilizando os primers LITSR: 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S: 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'.

4.4.2 Análise molecular dos Pequenos Mamíferos

O DNA extraído dos tecidos dos pequenos mamíferos foi analisado de acordo com a metodologia seguida por Silva *et al.*, (2010), utilizando primers 5' GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA 3'; 5'CCGCCCCTATTTTACACCAACCCC 3' e 5' GCCCACTATATTACACCAACCCC 3' a fim de amplificar a região conservada dos minicírculos de do DNA de *Leishmania* (kDNA) (Degrave *et al.*, 1994).

DNA extraído de cepas de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) foram utilizados como controle positivo nas reações de PCR. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com 7uL de brometo de etídio (10mg/mL) com peso molecular de 100pb.

4.4.3 Identificação da Espécie de *Leishmania* por PCR RFLP

Para identificação da espécie de *Leishmania*, o produto amplificado foi digerido utilizando a enzima HAEIII (10U / uL), seguindo as recomendações do fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Os padrões de restrição foram analisados em gel de agarose a 4% corado com 7uL de brometo de etídio (10mg/mL) em comparação com as cepas de referências de *Leishmania* spp. citadas anteriormente.

4.5 Cultura

Amostras de baço, fígado, pele de orelha e pele de cauda foram maceradas em solução salina a 1% (1 mL) com 50 uL de Nistatin (100.000 U/mL) e mix de antibiótico

penicilina/estreptomicina (100-200 ug/mL). Após um período de 24 horas os tecidos macerados foram inoculados em meio de cultura NNN (Novy-MacNeal-Nicolle)/LIT (Liver Infusion Tryptose) com 20% de soro fetal bovino (FBS) e associação de antibióticos (penicilina e estreptomicina 100-200 ug/ml). Todas as culturas foram incubadas a 25°C por 90 dias com periódica manutenção e repique das mesmas em intervalos de sete dias. Culturas positivas foram submetidas a extração de DNA e posteriormente a PCR utilizando como alvo o gene HSP70 (Heat Shock Proteins of 70 kilodaltons) de *Leishmania* spp. tendo como primers HSP70 for: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e HSP70rev: 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3', gerando um fragmento de 1300 pb. Amostras com esta banda específica foram submetidas a digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise por comprimento de polimorfismos de fragmentos de restrição (Garcia *et al.*, 2004). Os padrões de restrição foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 4% e comparados com padrões de referências das cepas de *Leishmania* citadas nas análises moleculares anteriormente.

4.6 Identificação do repasto sanguíneo em fêmeas de flebotomíneos alimentadas naturalmente

4.6.1 Extração de DNA

As fêmeas alimentadas capturadas foram armazenadas individualmente em tubos identificados e direcionadas para extração de DNA individual pelo Kit Blood GenomicPrep Mini Spin – GE Healthcare® conforme especificação do fabricante. O DNA extraído foi estocado a -20°C até a realização da PCR.

4.6.2 PCR do gene *cytb*

Para a reação de PCR do gene *cytb* foi utilizada as condições anteriormente descritas por Steuber *et al.* (2005), com a utilização dos iniciadores *cytb1*: 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' e *cytb2*: 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3', amplificam um fragmento de 359pb. O processo de amplificação foi realizado no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler - Life Technologies ajustado aos seguintes parâmetros: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final a 72° C por 5 minutos. Para a padronização da técnica foram utilizados como controles positivos, DNA extraído diretamente de sangue de cão e marsupial e como controles negativos, mix dos reagentes da PCR com DNA de fêmeas de colônia nunca alimentadas. Utilizou-se como controle negativo da reação, apenas o mix dos reagentes da PCR e no controle positivo, foi adicionado DNA extraído de sangue de cão (*Canis familiaris*).

4.6.3 Eletroforese do produto amplificado

O produto amplificado pela PCR *cytb* foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado por brometo de etídio, em transluminador (L-PIX, Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) sob luz ultravioleta. O produto foi purificado utilizando-se o Kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN) seguindo especificações do fabricante.

4.6.4 Sequenciamento, Edição e Alinhamento das Sequências

O produto de PCR purificado foi submetido à reação de sequenciamento para o qual foi utilizada uma empresa privada que fornece serviço de sequenciamento de DNA (Macrogen - <http://dna.macrogen.com/eng/>). As amostras positivas e purificadas foram ajustadas na concentração de 50 ng de DNA/ μ L e posteriormente liofilizadas com centrifugação inicial de 14.000 g por 10 minutos e posterior centrifugação a 60° C por duas horas no Concentrator plus/ Vacufuge[®] plus da eppendorf para o envio e posterior sequenciamento.

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio dos softwares FinchTV 1.4.0 (Geospiza) e MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011), que produz uma fita de consenso para cada amostra. As sequências foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank para avaliação da identidade, através do algoritmo Basic Local Alignment Search Tool - BLAST[®] (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). O nível de identificação das espécies foi determinado quando as sequências exibidas apresentavam mais de 96% de identidade abrangendo ao menos 95% da sequência analisada.

4.7 Análise espacial

Os locais de estudo foram georreferenciados e os dados tabulados em uma matriz que codifica cada local e os resultados referentes aos mesmos. As análises foram realizadas através das ferramentas disponíveis nos programas ArcGis 9.2 e MapInfo 8.5 para Windows e o sistema de coordenadas foi SAD 69.

4.8 Análise estatística

4.8.1 Flebotomíneos

Utilizamos o índice de abundância de espécies (ISA) e, em sequência, o índice padronizado de abundância de espécies (Roberts & Hsi, 1979), para avaliar a abundância de espécies na área de estudo. Os valores para SISA variam de 0 a 1, sendo o valor 1 representando a maior abundância. Para avaliar a diversidade de espécies e a uniformidade de abundância entre os locais de coleta utilizamos os índices de Shannon (H) e Equitabilidade (J) (Hayek & Buzas, 1997), respectivamente. Para avaliar a associação entre o número de flebotomíneos coletados e as variáveis climáticas na RPPNSC entre junho de 2013 e junho de 2014, utilizamos modelos lineares generalizados (GLM) nos quais a distribuição de probabilidade foi o Binomial Negativo e o termo offset foi o logaritmo natural do número das armadilhas observadas em cada tempo de coleta. A análise descritiva dos dados foi realizada usando o software Microsoft Excel (Office 2010). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software estatístico R (R Development Core Team, 2015).

4.8.2 Pequenos mamíferos

A diferença da riqueza de espécies entre as áreas foi testada através de curvas de rarefação com base em amostras (Gotelli & Colwell, 2001) utilizando EstimateS (versão 10.9 para Windows) com 500 aleatorizações e intervalo de confiança de 95%. Nesta análise o programa gera curvas que representam a acumulação de espécies de forma aleatória sobre a

ordem das amostras associando à um desvio padrão. Foram considerados como unidade de amostragem os locais de captura por meses de coleta.

A estimativa da quantidade de espécies de pequenos mamíferos na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça foi realizada pelo estimador Jackknife 1 que estima a riqueza total da área estudada utilizando o número de espécies que ocorreram durante a amostragem.

5 RESULTADOS

5.1 Fauna e a infecção dos flebotomíneos

Um total de 376 de flebotomíneos foi coletado sendo que 300 eram fêmeas e 76 espécimes machos, distribuídos por 10 gêneros e 18 espécies. Os gêneros mais representativos foram *Evandromyia* e *Psychodopygus* com quatro espécies cada. As espécies com maior prevalência foram *Psychodopygus lloydi* (Antunes, 1937) (72,79%) seguido de *Brumptomyia troglodytes* (Lutz, 1922) (5,25%), *Nyssomyia whitmani* (4,01%) e *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) (4,30%). Os índices de Shannon (H) e Equitabilidade (J) foram baixos ($H'=1.23$; $J'=0.43$). De acordo com o SISA, as espécies mais abundantes foram *Br. troglodytes* (0.52), *Ps. lloydi* (0.39) e *Mi. ferreirana* (0.35), enquanto as espécies menos abundantes foram *Ev. termitophila* (0.03) e *Lu. longipalpis* (0.07). Exceto na Gruta da Bocaina, *Ps. lloydi* foi capturado em todas as trilhas. Os locais de captura de maior sucesso amostral foram Engenho (27,19%), Casa das Sampaiais (24,27%) e Mata da Cascatinha (24,27%) (Tabela 1).

Em relação aos meses de coleta, os meses de maior sucesso de captura foram Agosto de 2013 (12%), Dezembro de 2013 (48%) e Fevereiro 2014 (17%), enquanto que os meses de menor sucesso de captura foram Junho de 2013 (7%), Outubro de 2013 (2%) e Abril de 2014 (5%). As temperaturas locais demonstraram baixos valores em geral durante o período do desenvolvimento do estudo e a média da temperatura dos meses mais frios foi de 14,7°C em Junho de 2013 e 13,23°C em Outubro de 2013 e a média da temperatura dos meses mais quentes foi em 20,75°C em Dezembro de 2013 e 19,76°C em Fevereiro de 2014. A média mensal da humidade relativa do ar permaneceu entorno de 60%, com o maior registro em Dezembro de 2013 (84,38%) seguido de Fevereiro de 2014 (79,8%), enquanto que os

menores registros foram dos meses de Agosto de 2013 (69,13%) e Abril de 2014 (76,8%) (Gráfico 1).

A partir de duas amostras analisadas foram detectados fragmentos de 300-350 pb pela técnica de PCR-ITS1 do DNA extraído dos flebotomíneos, indicando resultado positivo na presença de DNA de *Leishmania* spp. A identificação em nível de espécie pela PCR-RFLP indicou o perfil destas amostras positivas como *Leishmania (V.) braziliensis* (Figura 8 e 9). As duas amostras positivas nesta análise eram da espécie *Ps. lloydi* e foram capturadas no mês de Dezembro de 2013 na trilha da Casa das Sampaiais.

Sazonalidade dos flebotomíneos capturados na RPPN Santuário do Caraça

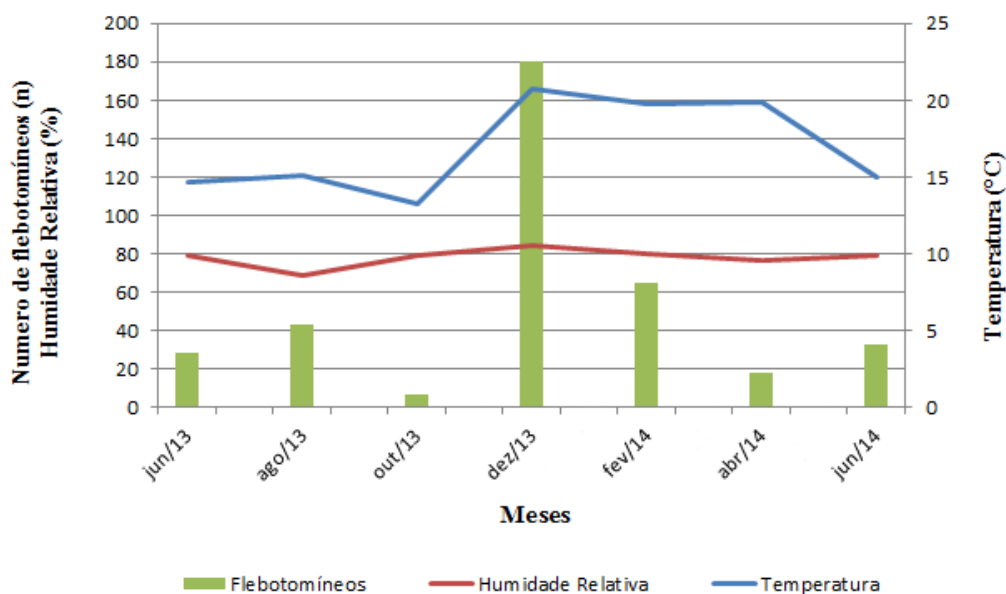


Gráfico 1 – Sazonalidade dos flebotomíneos capturados na RPPN Santuário do Caraça durante o período de coleta.

Tabela 01: Espécies de flebotomíneos coletados na RPPN Santuário do Caraca distribuídos por trilha de coleta.

	Trilha 1 Mata Cascatinha	Trilha 2 Cascatinha	Trilha 3 Pedra da Paciência	Trilha 4 Gruta da Bocaina	Trilha 5 Casa dos Pesquisadores	Trilha 6 Casa das Sampaias	Trilha 7 Engenho	TOTAL	%
<i>Bumptonmyia troglodytes</i>	11	3	1	0	2	3	0	20	5,32
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0,27
<i>Evandromyia lenti</i>	0	1	0	0	0	0	11	12	3,19
<i>Evandromyia termiophila</i>	0	0	0	0	0	0	4	4	1,06
<i>Evandromyia tupynamebai</i>	2	0	0	0	0	1	0	3	0,80
<i>Lutzomyia ischyracanta</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	0,53
<i>Micropigomyia ferreirana</i>	2	1	0	0	0	1	0	4	1,06
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	3	6	1	0	6	16	4,26
<i>Plinomyia misionensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>Plinomyia monticola</i>	10	1	0	0	0	0	5	16	4,26
<i>Psathyromyia pastanai</i>	1	6	0	0	0	0	0	7	1,86
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>Psychodopygus carreirai</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0,27
<i>Psychodopygus ilocydi</i>	42	24	10	0	47	82	67	272	72,34
<i>Psychodopygus pascallei</i>	12	0	0	0	0	1	0	13	3,46
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0,27
<i>Trichopygomyia longispina</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0,27
TOTAL	82	37	14	6	50	88	99	376	
	24,27%	9,36%	3,22%	1,75%	9,94%	24,27%	27,19%		

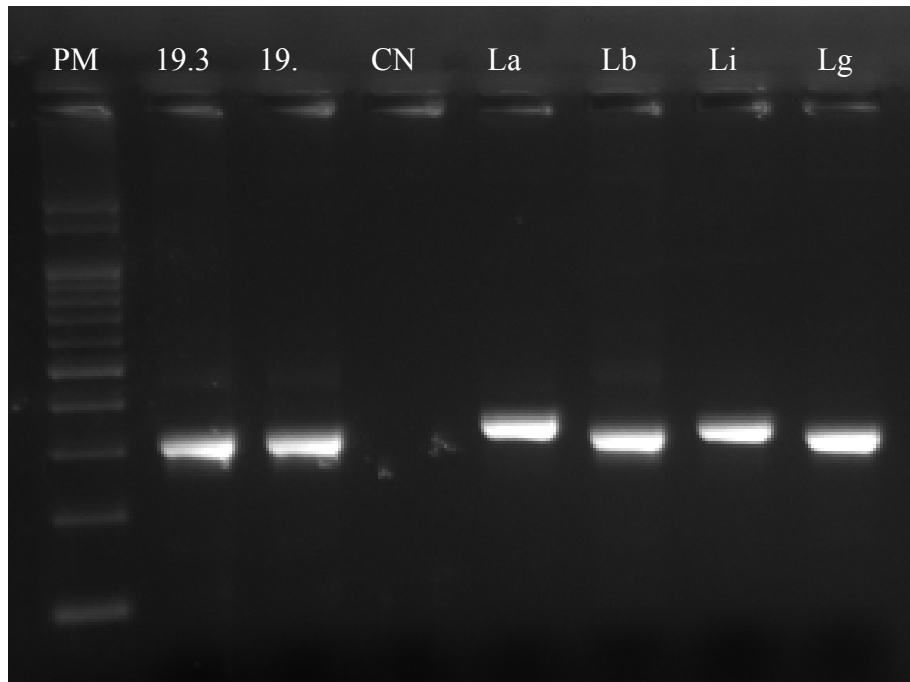


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras positivas na PCR-IST1 dos flebotomíneos coletados na RPPN Santuário do Caraça. PM = Peso Molecular; 19.3 e 19.7 = Amostras positivas; La, Lb, Li e Lg = Controles positivos de cepas de *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensis* respectivamente.

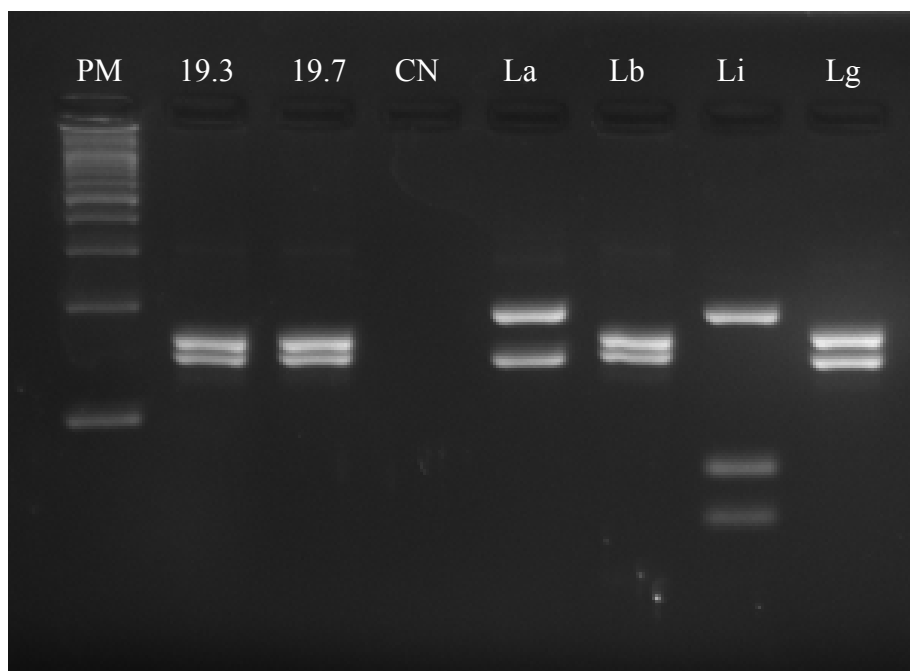


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose a 4% da RFLP-ITS1 PCR das amostras positivas na detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos coletados na RPPN Santuário do

Caraça. PM = Peso Molecular; 19.3 e 19.7 = Amostras positivas; La, Lb, Li e Lg = Controles positivos de cepas de *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensis* respectivamente.

5.1.1 Fonte alimentar dos flebotomíneos do Caraça

Foram observados 13 espécimes de flebotomíneos alimentados durante o trabalho que compreendem a espécie *Ps. lloydi*. Dessas fêmeas analisadas apenas nove apresentaram amplificação do fragmento de 359pb correspondente ao gene do cytb (Figura 10), destas, sete amostras corresponderam a *Sus scrofa* (porco doméstico) e em duas amostras não foi obtido alinhamento (Tabela 2).

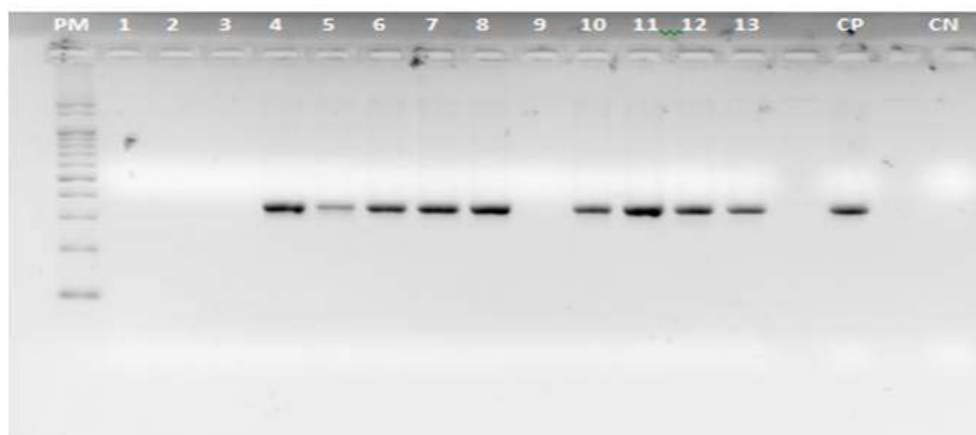


Figura 10 – Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio com produtos amplificados da reação de PCR cytb de fêmeas de flebotomíneos naturalmente alimentadas capturadas na RPPNSC. PM – Peso Molecular 100pb; 1 a 13 – amostras das fêmeas de flebotomíneos naturalmente alimentadas; CP: Controle Positivo e CN: Controle Negativo.

Tabela 2
 Fonte alimentar identificada após sequenciamento do produto amplificado da PCR cytb das fêmeas de flebotomíneos naturalmente alimentadas coletadas na RPPN Santuário do Caraça.

Espécie de flebotomíneo / Fonte de Alimentação	<i>Sus scrofa</i>	Sem Alinhamento	Total
<i>Psychodopygus lloydi</i>	7	2	9

5.2 Fauna de pequenos mamíferos e a infecção natural por *Leishmania braziliensis*

Um total de 55 pequenos mamíferos divididos das famílias Cricetidae [*Akodon cursor* (Winge, 1887), *Cerradomys subflavus* (Wagner, 1842), *Necomys lasiurus* (Lund, 1841), *Nectomys squamipes* (Brants, 1827), *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) e *Oxymycterus dasytrichus* (Schinz, 1821)], um *Sciuridae* [*Guerlinguetus ingrami* (Thomas, 1901)] e dois *Didelphidae* [*Gracilinanus agilis* (Burmeister, 1854), *Marmosops incanus* (Lund, 1841)] foram capturados a partir das seis trilhas traçadas durante o período estudado (Gráfico 2). Destas espécies, *Akodon cursor* (56,4%) foi a mais abundante capturada, seguido de *Cerradomys subflavus* (10,9%) e *Oligoryzomys nigripes* (10,9%). Os pontos de maior amostragem foram a trilha 1 (21,82%), trilha 4 (20%) e trilha 5 (20%) (Tabela 3).

Frequencia dos pequenos mamíferos capturados na RPPN Santuário do Caraça

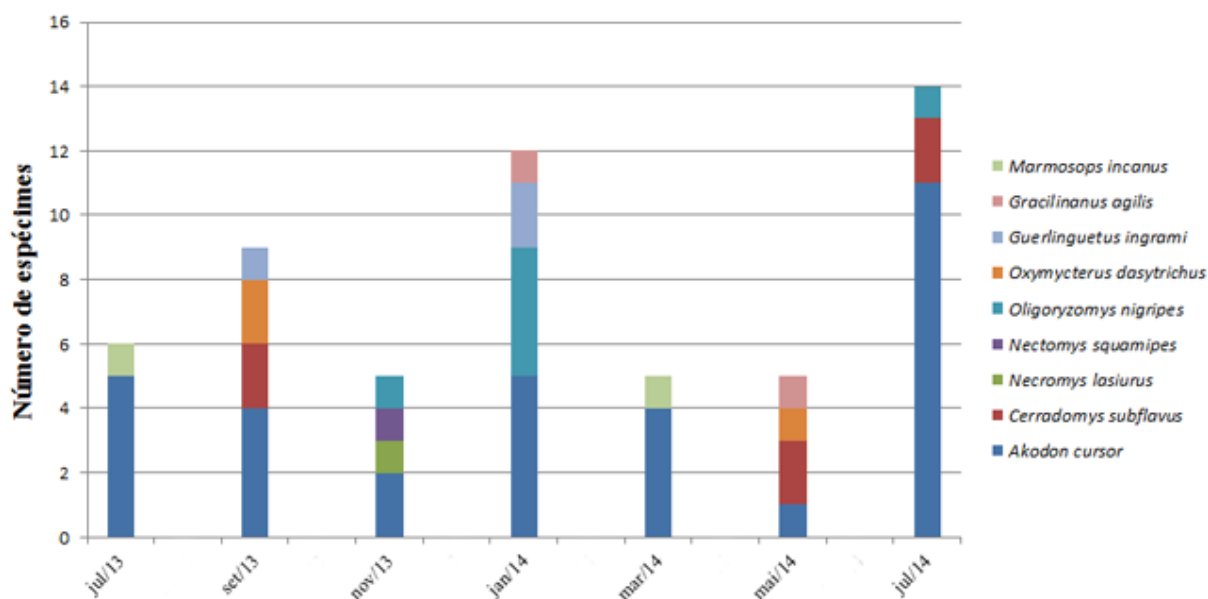


Gráfico 2 – Frequência dos pequenos mamíferos capturados durante o período de captura na RPPN Santuário do Caraça.

As curvas de rarefação indicaram que a riqueza de pequenos mamíferos não diferiu significativamente entre as áreas amostradas, área de mata e área peridomiciliar, (Figura 11). A diversidade foi maior na área das trilhas 1 e 5 (áreas peridomiciliares) ($H' = 1,472$, $J = 0,753$) do que na área das trilhas 2, 3, 4 e 6 (áreas de mata) ($H' = 1,156$, $J = 0,661$). A diversidade total foi de 1.412 e a equidade foi de 0.678.

Cinco (9,1%) animais foram detectados positivos para infecção de *Leishmania* spp. no diagnóstico em meio de cultura e por PCR-kDNA. Foram obtidos isolados a partir de fígado e pele de cauda de pequenos mamíferos de três espécies capturadas (*Akodon cursor*, *Cerradomys subflavus* e *Oxymycterus dasytrichus*) e caracterizados por PCR-HSP70-RFLP como *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Tabela 4). Todas as amostras positivas na cultura foram, também, positivas na PCR-kDNA (Tabela 5).

Tabela 3 - Pequenos Mamíferos capturados na RPPN Santuário do Caraça em cada trilha amostral

	Trilha 1 (%)	Trilha 2 (%)	Trilha 3 (%)	Trilha 4 (%)	Trilha 5 (%)	Trilha 6 (%)	TOTAL
<i>Akodon cursor</i>	9	2	4	9	2	5	31
<i>Cerradomys subflavus</i>	0	2	2	1	1	0	6
<i>Gracilinanus agilis</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>Guerlinguetos ingrami</i>	0	0	0	0	3	0	3
<i>Marmosops incanus</i>	1	0	0	0	0	1	2
<i>Necomys lasiurus</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Nectomys squamipes</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	1	3	0	0	2	0	6
<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	0	0	0	0	3	0	3
TOTAL	12	8	7	11	11	6	55

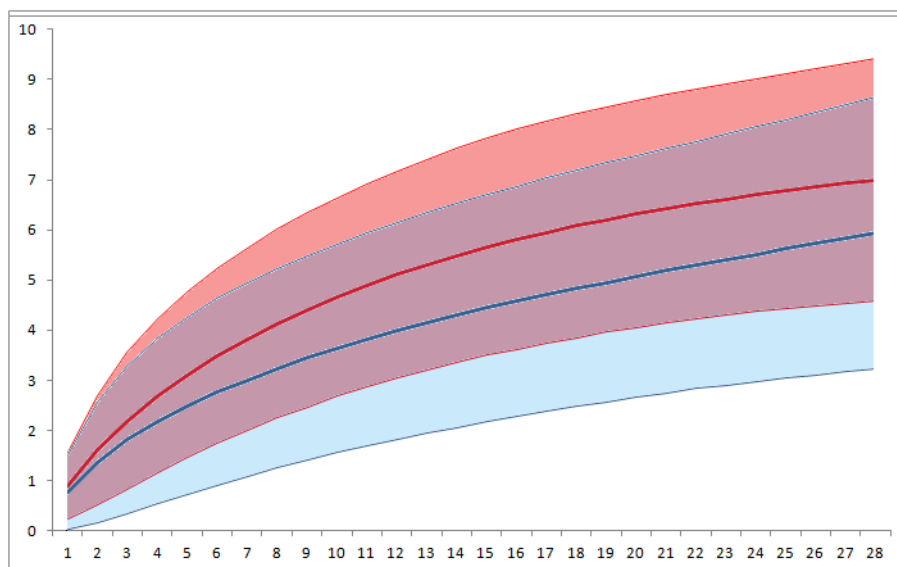


Figura 11 – Curva de rarefação baseada em amostras para a riqueza de pequenos mamíferos nas duas áreas amostradas na RPPN Santuário do Caraça. Em vermelho, dados da área próxima a sede (Área peridomiciliar); em azul, dados da área distante da sede (Área de mata).

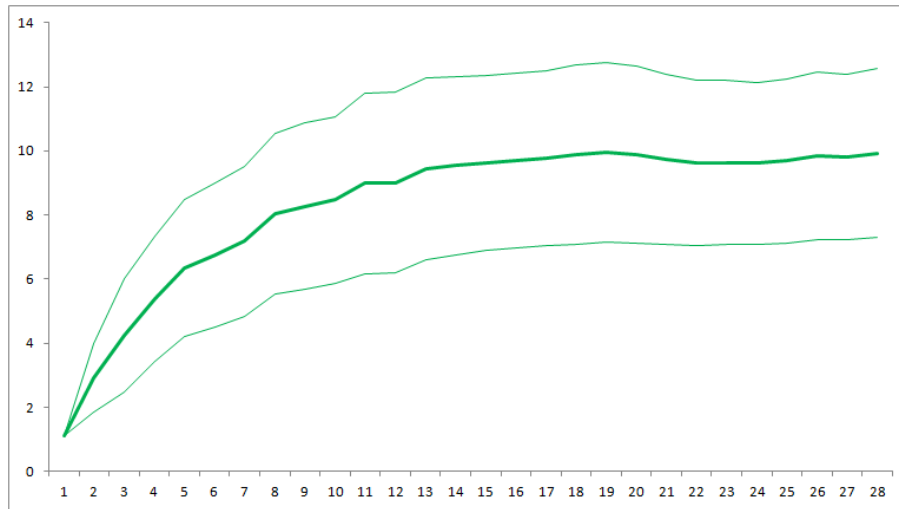


Figura 12 - Curva de estimativa de espécies de pequenos mamíferos da RPPN Santuário do Caraça utilizando o estimador não-paramétrico Jackknife 1. A linha grossa representa a riqueza média observada, enquanto a área sombreada representa o intervalo de confiança.

Tabela 4 - Espécies de pequenos mamíferos capturados na RPPN Santuário do Caraça por análise molecular e amostras positivas para cultura.

Espécies	Espécimes capturados	kDNA Positivo (frequência %)	Cultura positiva
Cricetidae			
<i>Akodon cursor</i>	31	3 (9,7)	3
<i>Cerradomys subflavus</i>	6	1 (16,6)	1
<i>Necomys lasiurus</i>	1	0	0
<i>Nectomys squamipes</i>	1	0	0
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	6	0	0
<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	3	1 (33,3)	1
Sciuridae			
<i>Guerlinguetos ingrami</i>	3	0	0
Didelphidae			
<i>Gracilinanus agilis</i>	2	0	0
<i>Marmosops incanus</i>	2	0	0
TOTAL	55	5	5

Tabela 5 - Espécies de pequenos mamíferos capturados na RPPN Santuário do Caraça que foram positivas na análise molecular por kDNA PCR e análise em cultura por tecido analisado.

Espécies	Fígado		Baço		Pele de Cauda	
	kDNA	Cultura	kDNA	Cultura	kDNA	Cultura
<i>Cerradomys subflavus</i>	x	x				
<i>Akodon cursor</i>	x		x			x
<i>Akodon cursor</i>	x	x	x		x	x
<i>Akodon cursor</i>	x	x	x			
<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	x	x				
TOTAL	5	4	3	0	1	2

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses têm complexa relação com seus vetores e reservatórios, e sua ecologia torna difícil a compreensão dos desafios dessas doenças. Utilizam de mecanismos de defesa bastante eficaz contra do sistema imune dos reservatórios e vetores favorecendo o processo de infecção (Oliver *et al.*, 2005). Várias espécies de mamíferos de comportamentos distintos podem atuar como reservatórios, e assim também são para os flebotomíneos vetores e sua competência vetorial (Killick-Kendrick, 1990; Killick-Kendrick & Ward, 1981).

Alguns trabalhos têm auxiliado na melhor compreensão da epidemiologia das leishmanioses no estado de Minas Gerais em áreas tanto em áreas urbanas quanto em ambientes silvestres com levantamentos de fauna de flebotomíneos e mamíferos assim como análises de infecção por *Leishmania spp.* nos mesmos. A fauna de flebotomíneos já foi demonstrada por de Souza (2004) em Belo Horizonte, capital mineira, enfatizando uma predominância das espécies *Ny. whitmani* e *Pi. monticola*. Ainda no mesmo local, Ferreira *et al.* (2015), estudaram a infecção mista por *Le. braziliensis* e *Le. infantum* na fauna de mamíferos demonstrando possível papel de hospedeiros e reservatórios em algumas espécies das Ordens Rodentia e Didelphimorphia.

A fauna de flebotomíneos e de mamíferos que possam desempenhar papel importante na ecologia das leishmanioses no ambiente silvestre, rural e urbano é bastante diversificada e, ainda, os fatores ambientais juntamente do impacto das ações trópicas tornam mais complexa a elucidação sobre a epidemiologia das leishmanioses (Andrade Filho *et al.*, 2001; Brazil *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2013; Richini-Pereira *et al.*, 2014; Roque e Jansen, 2014; Saraiva *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2015).

6.1 A fauna flebotomínica na RPPNSC e a infecção por *Leishmania braziliensis*

É válido apontar que os municípios ao redor da RPPNSC apresentam consideráveis densidades de *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani*, como foi encontrado em Barão de Cocais e em Catas Altas (Dados não publicados). Ainda, em levantamentos realizados em colaboração com as secretarias de saúde de cada município satélite da RPPNSC, foram detectados casos humanos e caninos autóctones de leishmaniose, incluindo casos viscerais e cutâneos além de um óbito.

As espécies de flebotomíneos observadas no presente estudo compõem uma fauna similar encontrada em outros estudos realizados em áreas silvestres e, também, em reservas naturais. As grandes diversidades de espécies coletadas nesses ambientes representam um perfil diferente do observado em áreas urbanas (Massafera *et al.*, 2005; Mestre *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2009).

No Parque Estadual do Ibitipoca, região com características climáticas e de topografia semelhante as da RPPNSC (alta humidade e altitudes e baixas temperaturas), Carvalho (2011) amostrou algumas das mesmas espécies que foram encontradas no presente trabalho incluindo *Ps. lloydi*, *Psychodopygus pascalei* (Coutinho & Barretto, 1940), *Pi. monticola*, *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938) e *Br. troglodytes*. Os fatores climáticos destes locais como baixas temperaturas e alta umidade do ar, possivelmente explicam o baixo número de indivíduos de flebotomíneos coletados em relação a outros estudos de fauna flebotomínica (Campos *et al.*, 2013; Rêgo *et al.*, 2014).

Algumas espécies capturadas na RPPNSC já foram incriminadas como potenciais vetores de *Leishmania* spp como *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* (Lainson & Shaw, 1985; Sherlock, 1996; Nascimento *et al.*, 2007; Ryan & Brazil, 1984; Silva *et al.*, 2007; Felipe *et al.*, 2011; Lainson & Shaw, 1979; Hock *et al.*, 1986; Arias *et al.*, 1985; Ryan *et al.*, 1990;

Azevedo & Rangel, 1991; Queiroz *et al.*, 1994; Luz *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2002; Galati *et al.*, 1996). Em outras das espécies coletadas como *Evandromyia lenti*, *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Micropygomyia ferreirana* (Barreto, Martin & Pellegrino, 1956) e *Ps. lloydi* (Lana *et al.*, 2015; Paiva *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2010; Margonari *et al.*, 2010; Paiva *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2011; Quaresma *et al.*, 2012; Rêgo *et al.*, 2015; Lara-Silva *et al.*, 2015; Savani *et al.*, 2009) DNA de *Leishmania* foi detectado, o que pode sugerir que estes desempenham um papel como mantenedores do parasito no ciclo de transmissão nos ambientes silvestres.

A espécie mais abundante capturada no nosso estudo foi *Ps. lloydi*, que apresenta ampla distribuição geográfica sendo encontrado nos estados de Minas Gerais, Maranhão, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (Andrade Filho *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2007; Rebêlo *et al.*, 2010). De acordo com Santos *et al.* (2007), a maioria das espécies do gênero *Psychodopygus* ocorre somente em habitats silvestres, e Lainson & Rangel (2003) explicam que algumas espécies deste gênero são importantes na transmissão da forma cutânea da leishmaniose, como *Psychodopygus wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson 1971), *Psychodopygus complexus* (Mangabeira, 1941), *Psychodopygus paraensis* (Costa Lima, 1941) e *Psychodopygus ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940).

Duas ferramentas têm sido utilizadas para diagnosticar a infecção por *Leishmania*, ou a presença de DNA de *Leishmania* em vetores. O diagnóstico padrão ouro para esta doença é através da dissecação da fêmea de flebotomíneos. Esta técnica tem a vantagem de se permitir a observação dos parasitos em suas formas flageladas e a posição no trato digestivo do inseto, entretanto, é necessária mão de obra qualificada e muita experiência e ainda é uma técnica que demanda bastante tempo, sendo necessário muitos espécimes analisados para se obter dados significativos, como discutido por Brazil e Brazil (2003). Além disso, através deste método não é possível identificar o parasito em nível de gênero e espécie o que requer

isolamento em cultura ou análises moleculares do parasito para identificação, pois há outros tripanossomatídeos que não *Leishmania* que podem ser encontrados em flebotomíneos (Forattini, 1973; Miles *et al.*, 1983; Shaw *et al.*, 2003; Saraiva *et al.*, 2015). A segunda ferramenta utilizada para diagnosticar infecções por *Leishmania* em vetores visa detectar presença de DNA do parasito, como PCR convencional com diferentes alvos. Esta é uma técnica bastante sensível e altamente específica, o que é importante para estudos com *Leishmania* porque a taxa de infecção em vetores é relativamente baixa (Rocha *et al.*, 2010). Em nosso estudo, duas fêmeas da espécie *Ps. lloydi*, coletadas em Dezembro de 2013, foram detectadas com DNA de *Le. (V.) braziliensis* através da ITS1-PCR-RFLP, com taxa de infecção de 0,6% (2/300). Os dois espécimes encontrados infectados por *Le. (V.) braziliensis* foram capturados na trilha 6, Casa das Sampaiais, local bastante visitado por turistas. *Ps. lloydi* e *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) foram as espécies mais abundantes capturadas em um estudo piloto utilizando armadilhas do tipo Shannon (dados não publicados). Esta espécie, *Ps. lloydi*, foi encontrada infectada pelo mesmo parasito também por Quaresma (2012), sugerindo que *Ps. lloydi* possa desempenhar um papel como vetor de *Le. (V.) braziliensis* no ciclo silvestre neste ambiente, uma vez que esta foi a espécie mais abundante encontrada em nosso trabalho e, ainda, foi capturada em todos os meses de coleta.

Nossos resultados de identificação de repasto sanguíneo utilizando a técnica de PCR amplificando o gene de *cytb* mostram, corroborando com Quaresma *et al.* (2012), que esta metodologia é uma boa ferramenta para identificar a fonte alimentar dos flebotomíneos ingurgitados. Sete amostras foram positivas nesta metodologia e as identificações foram coerentes com os locais de coleta. Todas as amostras foram identificadas como sendo de *Sus scrofa*, o porco domesticado, que provavelmente são provenientes dos porcos criados no chiqueiro localizado no ponto de coleta 7, na Fazenda do Engenho, aonde todas as amostras de flebotomíneos alimentados foram capturados. Na literatura não encontramos registro dos

flebotomíneos se alimentarem em suínos, apesar de haver de relato de infecção do porco doméstico por *Leishmania* spp. (Brazil *et al.*, 1987). Embasando em alguns dos critérios sugeridos por Killick-Kendrick & Ward (1981) para incriminar uma espécie como vetor, que consideram a distribuição geográfica e abundância da espécie de flebotomíneos analisada no local estudado e comportamento antropofílico para tal incriminação, os meses de Dezembro de 2013 à Fevereiro de 2014 foram os meses aonde observamos maior abundância de flebotomíneos além de ser o período de condições climáticas mais favoráveis para a existência desses vetores na RPPNSC. Os flebotomíneos infectados foram capturados em Dezembro de 2013 e, baseado em sua abundancia e distribuição, sugerimos que este período é o mais propício a ocorrer transmissão da *Leishmania* neste ambiente, considerando assim este período como o mais necessário de atenção epidemiológica em relação à transmissão das leishmanioses.

Os dados obtidos ate aqui fornecem um maior conhecimento sobre os flebotomíneos na RPPN Santuário do Caraça, uma vez que este é o primeiro trabalho de levantamento de fauna de flebotomíneos no local. Além de poder auxiliar em estratégias de controle vetorial se caso necessário.

6.2. A infecção e isolamento de *Leishmania (V.) braziliensis* nos hospedeiros vertebrados na RPPNSC.

Apesar de não ter relatos de casos de leishmanioses na RPPNSC, é possível que o local exerça pressão sobre áreas próximas em relação a doenças parasitárias que dependem de vetores e reservatórios que estão presentes nesta extensa e preservada área silvestre que apresenta uma grande diversidade de fauna. Algumas espécies de mamíferos que já foram relatadas em um estudo no local (Talamoni *et al.*, 2014) possam ter um papel importante na

manutenção do ciclo silvestre de transmissão da *Leishmania*, desde que estas espécies atuem como reservatórios para este parasita de multi-reservatórios (Andrade *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2012; Brandão-Filho *et al.*, 2003).

Este é o primeiro registro de isolamento de *Le. (V.) braziliensis* de *Akodon cursor*, *Cerradomys subflavus* e *Oxymycterus dasytrichus* no sudeste do Brasil. Em nosso trabalho foram obtidos seis isolados desta espécie de *Leishmania* nestes roedores citados. DNA de *Le. braziliensis* foi identificado em baço, fígado e pele. O que corrobora com alguns estudos aonde foi observado parasitismo de *Le. braziliensis* não só na pele mas também em vísceras (Brandão-Filho *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2013).

Nossos resultados corroboram, ainda, com isolamentos de *Le. (V.) braziliensis* obtidos a partir de *Akodon cursor* (Rocha *et al.*, 1988), *Rattus rattus* (Vasconcelos *et al.*, 1994) no Brasil e *Rattus rattus* na Venezuela (de Lima *et al.*, 2002). *Le. (V.) braziliensis* foi isolada de espécimes de *Necomys lasiurus* e *Rattus rattus*, naturalmente infectados, capturados entre 1996 e 2000 na área endêmica de leishmaniose cutânea na região de Amaraji, estado do Pernambuco, nordeste brasileiro (Brandão-Filho *et al.*, 2003). Em 2006 um isolado foi obtido a partir de baço coletado de um *Nectomys squamipes*. O baço coletado deste animal foi inicialmente inoculado em hamster e posteriormente adicionado em meio de cultura NNN. O isolado foi caracterizado por anticorpos monoclonais e multilocus eletroforese enzimática como *Le. (V.) braziliensis*, zymodema Z-74 MNEC/BR/2006/NEC191 (Lima *et al.*, 2013).

Observação direta do parasito intracelular, como análises por imprint de tecidos em lâminas de microscopia, deveria ser o primeiro passo para identificar infecções por *Leishmania* spp. pois é uma metodologia que demanda pouco tempo e o resultado do diagnóstico seria muito eficaz, entretanto, a sensibilidade é altamente variável (20% - 70%) e requer bastante experiência para se obter resultados satisfatórios (Romero *et al.*, 2010). Outra metodologia de diagnóstico é a cultura em meio bifásico. A sensibilidade desta metodologia

diminui a medida que o número de parasitos diminuem também. Assim, o método de PCR tem sido o diagnóstico mais utilizado para identificar infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos já que a carga parasitária pode não ser alta o suficiente para ser detectada em métodos de baixa sensibilidade. Através da análise por PCR-RFLP do HSP70 é possível distinguir as espécies de *Leishmania* com alta precisão além de ter a habilidade de detectar parasitos em amostras clínicas. Este fato indica que esta metodologia poderia ser tomada como o padrão ouro para identificação de espécies de *Leishmania* (Silva *et al.*, 2010).

Nenhum dos animais capturados no presente estudo apresentava sinais clínicos de leishmaniose tegumentar. Apesar de estudos anteriores mostrarem lesões nos pequenos mamíferos estudados que possam ter origem decorrente à infecção por *Leishmania*, não foram observados supostos sinais clínicos de infecção nos animais capturados em nosso estudo (ex.: lesões na pele) (Andrade *et al.*, 2015). Este fato indica que estes pequenos mamíferos são bons hospedeiros de *Le. (V.) braziliensis* e sugere, ainda, que este parasito está adaptado a várias espécies de pequenos mamíferos, provavelmente em razão de sua coexistência ao longo do tempo (Lima *et al.*, 2013).

Estudos que visam investigar os hospedeiros naturais do parasito *Leishmania* geralmente são complicados devido às dificuldades de se trabalhar com espécies silvestres e em relação aos custos associados com trabalhos de campo de longo prazo (Silva *et al.*, 2010). Embora o envolvimento de roedores na manutenção e transmissão de *Le. (V.) braziliensis* seja negligenciado pela saúde pública e por pesquisadores, estas relações dos pequenos mamíferos com ciclos silvestres das leishmanioses necessitam de análises críticas para atualizar as estratégias de prevenção e programas de controle em áreas endêmicas e não endêmicas para leishmaniose tegumentar (Richini-Pereira *et al.*, 2014).

Os isolados obtidos foram provenientes de pequenos mamíferos capturados nas trilhas 1, 5 e 6 (Figura 6), duas áreas peridomiciliares e uma em ambiente silvestre. Em um dos

locais aonde isolado de *Le. (V.) braziliensis* foi obtido dos animais capturados, foi detectada infecção por métodos moleculares em flebotomíneos, da espécie *Ps. lloydi*, pela mesma espécie do parasito isolado. Estes isolados nos reservatórios vertebrados foram obtidos em Setembro de 2013 e a detecção do DNA de *Leishmania* nos flebotomíneos foi realizada em Dezembro de 2013. Diante disso, o período mais quente, que vai de setembro à janeiro, pode ser considerado como o período mais importante, do ponto de vista epidemiológico, para a manutenção e transmissão da doença em questão uma vez que este período apresenta condições climáticas ideais para populações de flebotomíneos e nesta época do ano é encontrada uma diversa fauna de pequenos mamíferos que podem atuar como hospedeiros.

A curva de rarefação (Figura 11) indica que a riqueza de pequenos mamíferos observada em nosso estudo é semelhante entre as áreas peridomiciliares e de mata. Refutando a hipótese de que a diversidade da fauna nas áreas de mata poderia ser maior que a fauna nas áreas de peridomicílio.

A análise realizada por Jackknife 1 (Figura 12), demonstra estabilidade ao final da amostragem indicando que nosso esforço amostral foi suficiente para obter todas as espécies naquela área estudada. O que não corrobora com o estudo de Talamoni *et al.* (2014) aonde a autora registrou 23 espécies de pequenos mamíferos enquanto nós observamos apenas 8 espécies. Este fato é comum devido à diferença comportamental e dos hábitos das espécies silvestres fazendo necessária a utilização de várias metodologias distintas para uma amostragem adequada destes animais.

Os resultados obtidos com nosso trabalho reforçam a necessidade de se realizar estudos sobre as leishmanioses em áreas silvestres uma vez que os ciclos da doença e os fatores ecológicos que os compõem nestes ambientes não são completamente compreendidos pelos órgãos de saúde.

Ambientes aonde são encontrados vetores que possam apresentar comportamento antropofílico, potenciais reservatórios e agentes etiológicos são alvos de atenção especial em relação ao risco de transmissão de doenças infecciosas. No caso da RPPN Santuário do Caraça, que recebe muitos visitantes de diversos locais do mundo por ano, existe a possibilidade de migração de leishmaniose através dos viajantes (Antinori *et al.*, 2005; Pavli e Maltezou, 2010).

Baseado em nossos achados, estudos contínuos na RPPN Santuário do Caraça são de grande importância a fim de realizar um monitoramento das infecções na fauna local dos pequenos mamíferos e de flebotomíneos uma vez que é uma área de atração turística global e poderia ser uma rota de migração de doenças infecciosas para áreas não endêmicas.

7 CONCLUSÕES

Com o presente estudo, podemos tomar as seguintes conclusões:

- Os fatores climáticos, temperatura e humidade do ar, podem influenciar na abundância da fauna de flebotomíneos. Durante o tempo de coleta na área de estudo os meses de maior abundância foram os meses de maior temperatura, Dez/2013 – Fev/2014;
- *Le. braziliensis* foi encontrada em tecidos extraídos de espécimes de mamíferos das espécies *Akodon cursor*, *Oxymycterus dasytrichus* e *Cerradomys subflavus* sugerindo seu papel como potenciais hospedeiros/reservatórios deste parasito em ambiente silvestre;
- O achado de flebotomíneos da espécie *Psychodopygus lloydi* com DNA de *Leishmania braziliensis* em trilhas aonde foram obtidos isolados deste parasito, sugere que esta espécie de flebotomíneo tenha papel importante no ciclo silvestre da doença;
- *Akodon cursor* pode ser um importante reservatório de *Le. braziliensis* na RPPNSC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHOUNDI, M.; et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis** 10(3): e0004349.

ALENCAR, J. E.; Expansão do Calazar no Brasil. **Ceará Méd**; 5:86-102, 1983.

ALVAR, J.; et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 7(5): e35671, 2012.

ANDRADE, M. S., et al. Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl Trop Dis** 9(10): e0004137, 2015.

ANDRADE FILHO, J. D., et al.. Nota sobre a distribuição geográfica de *Lutzomyia (Psychodopygus) arthuri* (Fonseca) e *Lutzomyia (Psychodopygus) lloydi* (Antunes) (Diptera: Psychodidae). **An da Soc Entomológica do Bras. Sociedade Entomológica do Brasil**; 26: 403–405, 1997.

ANDRADE FILHO, J. D., et al. Phlebotomine Sand Flies in the State of Piauí, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 96: 1085-1087, 2001.

ANDRADE FILHO, J. D., et al. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 102: 481–487, 2007.

ANTINORI, S., et al. Cutaneous leishmaniasis: Na increasing threat for travellers. **Clin Microbiol Infect**.11: 343-346, 2005.

ARIAS, J. R., et al. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. **Am J Trop Med Hyg**; 34: 1098–1108; 1985.

ASHFORD, W.; Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. **Clinics in Dermatology**; 14: 523-523; 1996.

ASHFORD, R. W.; What it takes to be a reservoir host. **Belgian Journal of Zoology** 127:85 – 90. 1997.

ASHFORD, R. W.; The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**; 30: 1269-1281; 2000.

AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL E. F. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz**; 86: 405–410, 1991.

BONVICINO, C. R., et al. Guia de Roedores do Brasil. Rio de Janeiro: **Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS**. 120p. 2008.

BRANDÃO-FILHO, S. P., et al. 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**; 97: 291–296, 2003.

BRAZIL, R. P.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; MACAU, R. P. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Vol. 82 (1) :145, 1987.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. "Biologia de flebotomíneos neotropicais." Flebotomíneos no Brasil. **Fiocruz**. 257-274. 2003.

BRAZIL, R. P., et al. The sand fly fauna (Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema, State of Rio de Janeiro, Brazil, na endemic área of cutaneous leishmaniasis transmission. **Journal of Vector Ecology**. Vol. 36, Supplement 1, 2011.

CABRERA, M. A. A., et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo; 45: 79-83, 2003.

CAMPINO, L., et al. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. **Trop Med Int Health**. 11:1708-1714, 2006.

CAMPOS, A. M., et al. Ecology of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a Transitional Area Between the Amazon and the Cerrado in the State of Maranhão, Brazil. **J Med Entomol**. 50, 2013.

CARREIRA, J. C. A., et al. The Geospatial Approach on Eco-Epidemiological Studies of Leishmaniasis. **Leishmaniasis – Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. INTECH, cap. 6, p. 125-145, 2014.

CARVALHO, G. M. L., et al. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**. 8: 407-414, 2008.

CARVALHO, G. M., et al. Diversity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Jorn Med Entomol**. 48: 764–769, doi:10.1603/ME10258. 2011.

CARVALHO, G. M. L., et al. Ecological Aspects of Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) from a Cave of the Speleological Province of Bambuí, Brazil. **PLoS One**. 8(10):e77158. 2013.

CATTAND, P., et al. Tropical diseases lacking adequate control measures: Dengue, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis, Chap. 23 *In*: Jamison, D.T., Breman, J.G., Measham, A.R., Alleyne, G., Claeson, M., Evans, D.B., J.H.A. P, mills, A, Musgrove, P. (ED) **Disease control priorities in developing countries**. Washington (DC): IBRD/The World Bank and Oxford University Press. 2006.

CHAVES, L. F., et al. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. **PLoS Negl Trop Dis**. 2(2):e176, 2008.

COSTA, C. H. N., et al. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 93: 464, 1999.

COSTA, C. H. N., et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**. 99(3):229-36, 2005.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A review on biology, epidemiology and public health significance of leishmaniasis. **J Bacteriol Parasitol** 4:166, 2013.

De LIMA, H., et al. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97, 169-174, 2002.

De SOUZA, M. C., et al. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Vol. 99(8): 795-803, 2004.

De SOUZA, R. L., et al. 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**. 76(3):559-565, 2006.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital** 45: 419-421, 1954.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese de Livre Docência. **Faculdade de Medicina**. USP, 162p. 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 4:198-212, 1962.

DEGRAVE, W., et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* — a mini review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 89:463–469, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 27(5):305-18, 2004.

DUJARDIN, J. P., et al. Uso de marcadores genéticos en la vigilancia entomológica de la enfermedad de Chagas. In: Cassab, J.A., Noireau, F., Guillen, G. (Eds.). La Enfermedad de Chagas en Bolivia - Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998–2002). **Ministerio de Salud y Previsión social**, OMS/OPS, IRD and IBBA; 157–169, 1999.

FELIPE, I. M. A., et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Fundação Oswaldo Cruz; 106: 207–211, 2011.

FERREIRA, E. C.; Melo, L. A.; Gontijo, C. M. F. Leishmanioses do Novo Mundo – Estudo de hospedeiros não humanos e sua importância para a compreensão da ecoepidemiologia da doença. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. UFMG, v. 65, p. 9-27, 2012.

FERREIRA, E. C., et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**. 11:71, 2015.

FORATTINI, O. P. Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera:Psychodidae). **Arch Hyg Saúde Publ**. 25: 209-215, 1960.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica IV**. *Psychodidae*. *Phlebotominae*, Leishmaniose e Bartonelose. Ed. Edgard Blucher Ltda; São Paulo. VIII: 658pp, 1973.

GALATI, E. A. B., et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Saude Publica**. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 30: 115–128, 1996.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF & Lainson R, editores. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 23–51, 2003.

GARCIA, L., 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**. May;42(5):2294-7, 2004.

GARDNER, A. L. **Mammals of South America**. Volume 1: Marsupials, xenarthrans, shrews and bats. Chicago and London: University Of Chicago Press. 690p, 2007.

- GOMES, A. C.; NEVES, V. L. F. C. Estratégia e perspectiva de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop.** 6: 553-58, 1998.
- GONTIJO, C. M. F., et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop.** 81: 143-150, 2002.
- GONTIJO, B.; de CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 36(1):71-80, Jan-Fev, 2003.
- GOTELLI, N. J.; COLWELL, R. K. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. **Ecology letters** 4.4: 379-391, 2001.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International journal for parasitology.** 35, 1169-1180, 2005.
- GRIMALDI, G. Jr., TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World, **Am. J. Trop. Med, Hyg.** 41:687-725, 1989.
- HAYEK, L. A. C.; BUZAS, M. A. Surveying Natural Populations. **New York, Columbia University Press.** 347–389, 1997.
- HIDE, M.; et al. Understanding human leishmaniasis: the need for an integrated approach. *In:* M. Tibayrenc (*ed.*), **Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies.** John Wiley & Sons, 2007.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature.** Vol. 9, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med Vet Entomol.** Blackwell Publishing Ltd;4: 1–24. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. & WARD, R. D. Ecology of *Leishmania*. **Workshop nº 11. Parasitology**, 82: 143-152, 1981.

HOCK, A., et al. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from Phlebotomine in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brazil. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 81 (Supl.):62, nov., 1986.

LAINSON, R., SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In *Biology of the Kinetoplastida*. W. H. R. Lumsden and D. A. Evans (Editors). **London and New York: Academic Press**. 2: 1-116, 1979.

LAINSON, R., et al. Leishmaniasis in Brazil. XXI. visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz; Neiva, 1912) as the vector. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 79: 223–226, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In W. Peters and Killick-Kendrick (ED) *The leishmaniasis in biology and medicine*. Vol 1. **Biology and epidemiology**. Academic Press, London, United Kingdom, 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Ecologia das Leishmanioses. In EF Rangel, R Lainson, **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-309, 2003.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100(8): 811-827, 2005.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amaz Saude.** 1(2):13-32, 2010.

LACHER-JR, T. E., MARES, M. A.; ALHO, C. J. R. The structure of a small mammal community in a central Brazilian savanna, p.137-162. In: Redford, K. H. & Isenberg, J.F. (eds). **Advances in Neotropical Mammalogy.** The Sandhill Crane Press, Inc., Gainesville, USA, 1989.

LANA, R. S., et al. Phlebotomine Sand Fly Fauna and *Leishmania* Infection in the Vicinity of the Serra do Cipó National Park, a Natural Brazilian Heritage Site. **Biomed Res Int.** Hindawi Publishing Corporation; 1–9, 2015.

LARA-SILVA, F. de O., et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop.** 148: 128–136, 2015.

LAURENT, T., et al. Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 63(2):173-181, 2009.

LEWIS, D. J. "The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis." **Annual review of entomology** 19.1: 363-384, 1974.

LIMA, B. S., et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 107, 2013.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Manguinhos**, 1912.

LUZ, B., et al. *Lutzomyia whitmani* (Diptera : Psychodidae) as vector of *Leishmania* (*V. braziliensis*) in Parana. **Ann Trop Med Parasitol**, 94, 2000.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, 24(12):2941-2947, 2008.

MARGONARI, C., et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 101(1):31-38, 2006.

MARGONARI, C., et al. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. **J Med Entomol**. Entomological Society of America ; 47: 1212–1219. doi:10.1603/ME09248, 2010.

MARTINS, A. V.; et al. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. 8(4):577-581, 1956.

MASSAFERA, R.; et al. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no Estado do Paraná. **Rev Saude Publica**. 571–7, 2005.

MACMORRIS-ADIX M.; Leishmaniasis: A review of the disease and the debate over the origin and dispersal of the causative parasite *Leishmania*. **Macalester Reviews in Biogeography**: Vol. 1, Article 2. 2008.

MESTRE, G. L. da C., et al. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Veterinária**. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 20: 228–234, 2011.

MICHALSKY, É. M., et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. SBMT; 44: 58–62, 2011.

MIGONE, L. E., Un caso de kala-zar a Asunción (Paraguay). **Bull Soc Path Exot**. 6:118-20, 1913.

MILES, M. A., et al. Vertebrate Hosts and Vectors of Trypanosoma Rangeli in the Amazon Basin of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 32: 1251–1259, 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, secretaria de vigilância em saúde**, Brasília, Brasil; 120p, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Leishmaniose Visceral**. [online]. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561> 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SMS). **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: editora do ministério da saúde; 190p, 2017.

MIRANDA, J. C., et al. Frequency of infection of Lutzomyia phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 97: 185–188, 2002.

MONTEIRO, S. P.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 29:67-72. 1994.

MONTENEGRO, J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilology** 13:187, 1926.

MORENO, E. C., et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38 456-463, 2005.

NASCIMENTO, J. C., et al. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 49: 119–122, 2007.

NASCIMENTO, B. W. L., et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis áreas in central western of Minas Gerais state – Brazil. **Acta Tropica** 125: 262-268, 2013.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View
Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. **Clin Microbiol Rev**. 18: 293–305, 2005.

OLIVEIRA, C. L., et al. Spatial distribution of human and canine leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cad. Saúde Publ**. 17:1231-1239, 2001.

OLIVEIRA, C. I., et al. Clinical utility of polymerase chain reaction – based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**. 37: 149-153, 2003.

OLIVEIRA, C. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: Challenges for control. **Reports in Public health**; 24(12):2953-2958, 2008.

PAGLIA, A. P., et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. 2ª Edição. **Occasional Papers in Conservation Biology**, n.6. Conservation International, Arlington, 2012.

PAIVA, B. R., et al. Detection and identification of Leishmania species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Trop.** 99: 252–259, 2006.

PAIVA, B. R, et al. Species-specific identification of Leishmania in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Trop.** 115: 126–130, 2010.

PATTON, J. L.; PARDIÑAS, U. F. J.; D’ELIA, G. Mammals of South America. Volume 2: Rodents. Chicago and London: **University Of Chicago Press**. 1356p, 2015.

PAULA, J. A. Biodiversidade, População e Economia: Uma Região da Mata Atlântica. Belo Horizonte. **UFMG/CEDEPLAR**. 672 pp, 1997.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, na emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**. 14, e1032-e1039, 2010.

PORTAL DO SANTUÁRIO DO CARAÇA (**PSC**). Disponível em: <http://www.santuariodocaraca.com.br/>. Acessado em: 01/02/2017. 2012.

QUARESMA, P. F, et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of Leishmania in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 579– 585, 2011.

QUARESMA, P. F., CARVALHO, G. M. L., RAMOS, M. C. N. F. Natural *Leishmania sp.* reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 107: 480-485, 2012.

QUEIROZ, R. G., et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. **Am J Trop Med Hyg.** 50: 693–8, 1994.

RANGEL, E. F., et al. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 em área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 79: 395-396, 1984.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública.** 24(12):2948-2952, 2008.

RANGEL, E. F., LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104: 937-954, 2009.

READY, P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. Annual. **Rev Entomology.** 58: 227-250, 2013.

REBÊLO, J. M. M., et al. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. **Rev Bras Entomol.** Sociedade Brasileira De Entomologia; 54: 494–500, 2010.

REITHINGER, R.; et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect dis.** 7(9):581-96, 2007.

REGO, F. D.; et al. Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera:Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **Parasites & Vectors**. 7:220, 2014.

RÊGO, F. D., et al. Molecular Detection of Leishmania in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniasis Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **PLoS One**. 10: e0122038. doi:10.1371/journal.pone.0122038, 2015.

RICHINI-PEREIRA, V. B., et al. Molecular detection of Leishmania spp in road-killed wild mammals in the Central Western area of te State of São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. 20:27 Page 2 of 7, 2014.

ROBERTS, D. R.; HIS, B. P. An Index of Species Abundance for Use with Mosquito Surveillance Data. **Environ Entomol**. 8, 1979.

ROCHA, N. M. M., et al. *Leishmania (braziliensis) braziliensis* isolated from *Akodon arviculoides* captured in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 82, 68, 1988.

ROCHA, L. S., et al. Survey of natural infection by Leishmania in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. Oxford University Press; 2010.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis** 2010; 4:e584.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synantropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Jornal for Parasitology: Parasites and Wildlife** 3: 251 – 262, 2014.

RYAN, L.; BRAZIL, R. P. Leishmania infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the Island of Sao Luis, Maranhao State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Fundação Oswaldo Cruz; 1984;79: 383–384.

RYAN, L., et al. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 84: 786, 1990.

SANTOS, D. R., et al. First report of *Psychodopygus lloydi* (Antunes) (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern of Brazil. **Rev Bras Entomol** 51: 524-525, 2007.

SARAIVA, L., et al. 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.; et al. Survey of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Environmentally Protected Area in Brazil. **PLoS One.** 2015;10.

SAVANI, E. S. M. M.; et al. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Vet Parasitol.** 2009;160: 18–24.

SERIDI, N.; et al. Genetic polymorphism of Algerian *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. **Microbes Infect.** 2008a; 10(12-13):1309-1315.

SERIDI, N.; et al. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2008b; 102(6):556-563.

SHAW, J. J. Endotrypanum, a unique intraerythrocytic flagellate of New World treesloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater? **Ciência e Cultura** 1992; 44: 107-116.

SHAW, J.; et al. Transmissão de outros agentes: os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. **In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Orgs.) Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro : Fiocruz 2003, p. 337-351.

SHERLOCK, I. A., et al. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984; 79:515.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Fundação Oswaldo Cruz; 1996; 91: 671–683.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitology.** 2005; v. 21, n.12, 550-552.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2007;40: 420–425.

SILVA, L. A.; et al. 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 Jan;10(1):77-83.

SOARES, R. P.; et al. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** Vol.2010, ID 439174, 7, 2010.

SOUZA, C. F.; BORGES, M. A. Z.; ANDRADE, A.J. Contribution to the Knowledge of the Phlebotomine Sand Flies Fauna (Diptera: Psychodidae) of Timóteo Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Neotrop Entomol.** Sociedade Entomológica do Brasil; 2009;38: 267–271.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitol Res** 97:247-254, 2005.

TALAMONI, S.; et al. Mammals of Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, state of Minas Gerais, Brazil. **Check List**. 2014;10: 1005–1013.

TRAVI, B. L.; et al. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. **J Med Entomol**. 2002; 39(3):451-456.

TRUPPEL, J. H.; et al. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? **PLos One**. 9(4): e93731, 2014.

VASCONCELOS, I. A.; et al. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturire, northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50, 158-164, 1994.

WARBURG, A. Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections. **J Inv Pathol** 1991; 58: 1889-202.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases/Leishmaniasis. 2010; 91-96.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). [online]. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/news/2011/v1-working-database/en/index.html>>. Genebra 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis Fact sheet N°375, updated February 2013 [online]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Genebra 2014.

ANEXOS

Anexo 1 - Licença permanente para coleta de material zoológico nº 15237-2 do Ministério do Meio Ambiente (MMA).

		Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO	
Licença permanente para coleta de material zoológico			
Número: 15237-2		Data da Emissão: 29/11/2011 17:39	
Dados do titular			
Nome: José Dilermando Andrade Filho		CPF: 835.584.546-34	
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01	
Observações e ressalvas			
1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.		
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 exige o pesquisador 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, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.		
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.		
6	Este documento NÃO exige 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 ICMBio, 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 ICMBio 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 o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .		
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.		
Táxons autorizados			
#	Nível taxonômico	Taxon(s)	
1	FAMILIA	Psychodidae	
2			
Destino do material biológico coletado			
#	Nome local destino	Tipo Destino	
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção	
2	CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	coleção	
Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).			
Código de autenticação: 36646273			
		Página 1/2	



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15237-2		Data da Emissão: 29/11/2011 17:39	
Dados do titular			
Nome: José Dilermando Andrade Filho		CPF: 835.584.546-34	
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01	

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

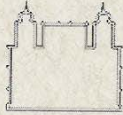
Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36646273



Página 2/2

Anexo 2 – Aceite para depósito de material flebotômico na Coleção de Flebotômicos do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (FIOCRUZ-COLFLEB).



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotômicos
Coleção de Flebotômicos

FIOCRUZ/COLFLEB

Belo Horizonte, 29 de maio de 2013-05-29

Declaro para os devidos fins, que a Coleção de Flebotômicos do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz receberá para depósito os flebotômicos que porventura sejam coletados no Parque Santuário do Caraça, referentes ao projeto "Estudo ecoepidemiológico dos hospedeiros/reservatórios de *Leishmania* na região do Santuário do Caraça, Minas Gerais".

Atenciosamente,

José Dilermando Andrade Filho
TECNOLOGISTA - IRR/Fiocruz
S/ane 1555636

José Dilermando Andrade Filho

Curador da Coleção de Flebotômicos

Coordenador do Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotômicos

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715 - CEP 30.190-002 - Belo Horizonte, MG, Brasil
Telefone: + 55 XX (31) 3349-7756
E-mail da Coleção: colfleb@fiocruz.br;
E-mail do Curador: jandrade@cpqrr.fiocruz.br

Anexo 3 – Submissão do estudo dos flebotomíneos para publicação em formato de artigo na revista PLOS One.

The screenshot displays the PLOS ONE submission management interface. At the top, the PLOS ONE logo is visible, along with navigation links: HOME, LOGOUT, EJS, RESORTS, UPDATE MY INFORMATION, AUTHOR CENTER, MANUSCRIPTS, CONFLICTS, SUBMIT A MANUSCRIPT, and NOTICE FOR AUTHORS. The user is logged in as Estephan Moringier, with the role of Editor and the username EstephanMoringier.

The main section is titled "Submissions Being Processed for Author José Diemando Andrade Filho" and shows "Page: 1 of 1 (1 total submissions)". Below this is a table with the following columns: Action, Manuscript Number, Title, Initial Date Submitted, and Current Status. A single submission is listed with Manuscript Number PONE-2016-03338, Title "Aspects of the ecology of phlebotomine Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in the Private Natural Heritage Reserve Sangradouro, Ceará", Initial Date Submitted Oct 31, 2016 21:34PM, and Current Status Under Review. The table also includes "Display" options for each row, set to "10" results per page.

At the bottom of the table area, there is a link to "Go to Author User Menu".

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
Action	PONE-2016-03338	Aspects of the ecology of phlebotomine Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in the Private Natural Heritage Reserve Sangradouro, Ceará	Oct 31, 2016 21:34PM	Under Review