

Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues

**Avaliação do papel epidemiológico das Leishmanioses em
Comunidades Inseridas em Área de Preservação
Ambiental, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e
Maricá, RJ, Brasil**

Orientador: Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Laboratório de Doenças Parasitárias/IOC – Fiocruz

Rio de Janeiro
2016



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Oswaldo Cruz

Laboratório de Doenças Parasitárias
Pavilhão Arthur Neiva – Sala 22

**Avaliação do papel epidemiológico das Leishmanioses em
Comunidades Inseridas em Área de Preservação
Ambiental, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e
Maricá, RJ, Brasil.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de concentração Medicina Tropical: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle

Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues

Orientação: Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Rio de Janeiro
2016

Rodrigues, Andressa Alencastre Fuzari.

Avaliação do papel epidemiológico das Leishmanioses em Comunidades Inseridas em Área de Preservação Ambiental, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ, Brasil / Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues. - Rio de Janeiro, 2016.

167 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.

Orientador: Reginaldo Peçanha Brazil.

Bibliografia: f. 108-136

1. Flebotomíneos. 2. Leishmanioses. 3. Infecção natural por Leishmania. 4. Niterói. 5. Maricá. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Avaliação do papel epidemiológico das Leishmanioses em Comunidades Inseridas em Área de Preservação Ambiental, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ, Brasil

por

Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Maurício Vilela - IOC/Fiocruz-RJ
(revisor e presidente da banca)

Dr. André Roque – IOC/Fiocruz-RJ

Dr. Aloisio Falqueto – UFES

Dr. José Dilermando Andrade Filho – IRR/Fiocruz-MG

Dr. Carolina Spiegel – UFF

Dra. Daniele Pereira de Castro - IOC/Fiocruz-RJ
Suplente

Dr. Felipe Vigoder – UFRJ
Suplente

Tese defendida e aprovada em 20 de dezembro de 2016.

*"Viva como se fosse morrer amanhã.
Aprenda como se fosse viver para sempre"
(Mahatma Gandhi)*

Dedicatória

Ao meu marido, pelo amor, companheirismo, compreensão e apoio presentes em todas as etapas de minha vida. Aos meus filhos, Alceuzinho e Clara, donos dos mais lindos sorrisos e os abraços mais aconchegantes... que sempre me deram a certeza de estar no caminho certo e a força para seguir em frente. Alcançar os objetivos a que nos propomos pode furtar momentos preciosos daqueles que mais amamos. Desculpas e obrigado! Vocês são as preciosidades de minha vida!

Aos meu pais, pelo amor incondicional e confiança que sempre depositaram em mim. Como avós, sempre prontos a ajudar, mesmo com a longa distância... participando e permitindo que esta jornada pudesse ser concluída.

Agradecimentos

- ✓ À Deus, pela perseverança nos momentos de dificuldade e pela força nas horas de desânimo e cansaço;
- ✓ À família, que mesmo distante, me incentivou e dedicou muito amor;
- ✓ Ao grande mestre e amigo, Dr. Reginaldo Brazil, que em momentos difíceis de minha vida profissional, não me deixou desistir. Sua orientação e a oportunidade de aprender com suas experiências e ensinamentos foram mais que um presente. O convívio com você nesses 12 anos de Fiocruz, além do conhecimento científico adquirido, foi um grande aprendizado de vida, que levarei comigo para sempre. Sua sensibilidade, preocupação e atenção com as pessoas é indescritível. Obrigada pela confiança depositada em mim. É uma honra poder compartilhar de sua amizade e companherismo.
- ✓ À Dra. Patricia de Azambuja, por ter sido a minha porta de entrada na instituição, ao me receber em seu laboratório me proporcionou a oportunidade do aprendizado científico na prática e um acúmulo de experiências que levarei por toda a minha vida. Agradeço a confiança em mim depositada durante os anos que fiquei no laboratório e pela amizade conquistada.
- ✓ Ao Dr. Eloi Garcia, um mestre com alma de artista, pelo seu jeito especial de saber ensinar a arte da Ciência;
- ✓ Ao Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Endêmicas, em especial à pesquisadora e amiga Daniella de Pita Pereira no apoio das técnicas e nos esclarecimentos de Biologia Molecular. E à Thaís Araújo na dedicação e paciência durante a elaboração dos procedimentos das amostras e na realização das técnicas, sempre disposta a me ensinar;
- ✓ À Vanessa de Araújo Barbosa, minha primeira orientada, e com o passar dos anos, uma grande companheira e amiga. Sempre dedicada e disposta a ajudar, tanto no profissional como no pessoal. Graças a você, o trabalho de campo não foi interrompido durante minha gestação e licença maternidade. E agora, mesmo de longe, me ajudou na revisão e correção da tese. Muito, muito obrigada sempre!
- ✓ Ao Francisco de Assis Marra, nosso técnico querido e amigo. Companheiro incansável de todos os trabalhos de campo. No laboratório, disposto a ajudar sempre. Paciente, atencioso, amigo e sensível em perceber se está precisando de uma palavra de ânimo. Sem você, esse trabalho também não teria chegado ao fim. Muito Obrigada!!!

- ✓ Às minhas alunas, Aline Delmondes e Barbara dos Santos Oliveira, também de grande ajuda, aprendendo e iniciando suas vidas científicas, fizeram parte dos trabalhos de campo e das metodologias em laboratório. Saibam que aprendi muito com vocês, pois me deram a oportunidade de aprender como ensinar. Experiência maravilhosa !!
- ✓ À todos os colaboradores do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC/FIOCRUZ, no nome de Natalie Olifiers e Bernardo Teixeira, pela ajuda e expertise na organização e coordenação das expedições e trabalhos de campo; também na manipulação e identificação dos animais coletados;
- ✓ À equipe responsável pela parte de Educação em Saúde, no nome de Wagner Lança Passos e André Barbosa, companheiros de laboratório;
- ✓ À todos os pesquisadores e colaboradores do Laboratório de Doenças Parasitárias, que me receberam como integrante da grande equipe que formam;
- ✓ Às amigas, Rozana, Carol, Marcela, Leile, Dani, Naty e Cecília, pelas palavras de incentivo nos momentos de dificuldade, pela paciência nos momentos de nervosismo, pela oportunidade do trabalho em equipe e a aprendizagem que isso proporcionou. Resultando em um amizade ímpar, onde não mais precisamos esta presentes o tempo todo para sermos cúmplices e companheiras. Atualmente, pelos momentos de descontração e fraternidade que compartilhamos. Sei que poderei contar com a amizade de vocês em qualquer momento de minha vida;
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, onde desenvolvi meu mestrado e parte do doutorado: Fernando, Raquel, Mayara, Déborah, Tainá, Zildo e José Carlos, pela colaboração e amizade;
- ✓ Ao amigo José Joaquim, por sua preciosa ajuda nas análises estatísticas e na elaboração de alguns mapas;
- ✓ Aos amigo Cristian, por sua disposição e sempre presente para os trabalhos de campo, técnicas de laboratório e discussões de metodologias; Obrigada pela amizade e descontração entre os momentos de muito trabalho;
- ✓ Aos gerentes e funcionários do Parque Estadual da Serra da Tiririca, no nome de Felipe Queiroz, pela dedicação, atenção e colaboração em todas as coletas dentro do parque;
- ✓ Ao Instituto Estadual de Ambiente (INEA), no nome de Fabiana Bandeira, responsável pelos projetos e autorizações para os trabalhos dentro da Unidade

de Conservação Estadual. Sua atenção, simpatia e dedicação facilitaram muito as minhas tarefas;

- ✓ Ao serviço de apoio aos laboratórios do pavilhão Leonidas Deane, no nome de Fernanda Vasconcelos e Alyne Vitória; e no pavilhão Arthur Neiva, no nome de Fábio, Priscila Domingos e Maila, pelas preciosas ajudas com as burocracias do dia-a-dia e pela simpatia, atenção e dedicação que executam suas funções, contribuindo muito para a conclusão desse trabalho;
- ✓ À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, seus professores e pesquisadores pelos preciosos ensinamentos e conselhos. Aos funcionários pela atenção e dedicação;
- ✓ Ao Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz pelo suporte na realização deste trabalho;
- ✓ A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida;
- ✓ A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xvii
Índice de Quadros.....	xviii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xix
Resumo.....	xx
Abstract.....	xxi
1. Introdução.....	1
1.1 Leishmanioses – aspectos gerais.....	1
1.2 Leishmaniose Visceral.....	2
1.3 Leishmaniose Tegumentar.....	4
1.4 Leishmaniose no Rio de Janeiro.....	6
1.5 Agente etiológico das leishmanioses.....	8
1.6 Os Flebotomíneos.....	12
1.7 Complexo <i>Lu. Longipalpis</i>	16
1.8 Leishmanioses e seus reservatórios.....	18
1.9 Diagnóstico molecular de infecção por <i>Leishmania spp.</i>	20
1.10 Avaliação da fonte alimentar em flebotomíneos	22
1.11 Educação em Saúde.....	23
2. Justificativa.....	25
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. Material e Métodos.....	28
4.1 Estudo de Área – Parque Estadual da Serra da Tiririca.....	28
4.2 Captura e montagem de Flebotomíneos.....	34
4.3 Captura de pequenos mamíferos.....	40
4.4 Estudo de Infecção natural por <i>Leishmania spp.</i>	43
4.4.1 Obtenção do Extrato total dos flebotomíneos.....	44
4.4.2 Extração de DNA.....	44
4.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase – <i>Hot-start PCR multiplex</i>	45

4.4.4	Extração de DNA em papel de filtro – Amostras de sangue de mamíferos.....	46
4.4.5	Reação em Cadeia da Polimerase – Amostras de sangue de mamíferos.....	46
4.4.6	Eletroforese em gel de agarose.....	47
4.4.7	Reação em Cadeia da Polimerase – Identificação de espécies de <i>Leishmania</i>	47
4.4.8	Clonagem.....	48
4.4.8.1	Preparo de células competentes.....	48
4.4.8.2	Clonagem	49
4.4.8.3	PCR de Colônia	50
4.4.9	Sequenciamento.....	50
4.4.10	Análise das Sequências.....	50
4.4.10.1	Avaliação da qualidade das sequências geradas.....	50
4.4.10.2	Agrupamento das sequências	51
4.4.10.3	Retirando a sequência do vetor.....	51
4.4.10.4	Busca no Banco de Dados.....	51
4.5	Estudo de Fonte alimentar dos flebotomíneos.....	51
4.5.1	Extração de DNA.....	51
4.5.2	Reação em Cadeia da Polimerase – Detecção da fonte alimentar de flebotomíneos.....	53
4.5.3	Eletroforese em gel de agarose.....	53
4.5.4	Sequenciamento.....	53
4.5.5	Análise de sequências.....	54
4.6	Análises estatísticas.....	54
4.7	Educação em Saúde.....	56
4.8	Aspectos éticos.....	59
5.	Resultados.....	60
5.1	Fauna de flebotomíneos.....	60
5.2	Estudo da infecção natural por <i>Leishmania sp.</i> nas fêmeas de flebotomíneos.....	77
5.3	Estudo de fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneos.....	78
5.4	Fauna de pequenos mamíferos.....	80
6.	Discussão.....	87
6.1	Fauna de flebotomíneos.....	87

6.2	Estudo da infecção natural por <i>Leishmania sp.</i> nas fêmeas de flebotomíneos.....	96
6.3	Estudo de fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneos.....	97
6.4	Fauna de pequenos mamíferos.....	100
7.	Conclusões	106
8.	Referências	108
9.	Artigos publicados e aceitos para publicação durante Doutorado.....	137
9.1	Artigos e resumos gerados no Doutorado.....	137
9.2	Artigos e resumos publicados em colaboração durante o Doutorado.....	137
10.	Anexos.....	139
	Anexo 1.....	139
	Anexo 2	140
	Anexo 3.....	141
	Anexo 4.....	142
	Anexo 5.....	143
	Anexo 6.....	144
	Anexo 7	145
	Anexo 8	146
	Anexo 9.....	147

Índice de Figuras

- Figura 1.1: Endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo, dados de 2013. Fonte: adaptado de WHO (2015).....03
- Figura 1.2: Endemicidade de leishmaniose tegumentar no mundo, dados de 2013 - Fonte: adaptado de WHO (2015).05
- Figura 1.3: Forma amastigota de *Leishmania infantum* encontrada em aspirado de medula óssea. 282 x 211 mm (72 x 72 DPI). Fonte : Silva et al. 201409
- Figura 1.4: Forma promastigota no intestino médio de fêmea de *Lu. longipalpis* infectada com *Le. (L.) infantum* WT. Os intestinos foram dissecados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. Fonte: Freitas VC, 2010.09
- Figura 1.5: Ciclo biológico da *Leishmania spp.* - Fonte: adaptado de CDC (2015).....12
- Figura 1.6: Estágios do ciclo de vida do flebotomíneo. Ovo (A), larva (B) pupa (C) adulto (D). Fonte: Andressa Fuzari15
- Figura 1.7: Machos de *Lutzomyia longipalpis* com um par de pintas (A) e dois pares de pintas (B) nos tergitos abdominais. Fonte: (52) Gonzalez 201317
- Figura 4.1: Mapa da divisão do Estado do Rio de Janeiro em municípios. Os municípios em destaque representam as áreas onde foi realizado o trabalho. Fonte: Fuzari, 2013.....29
- Figura 4.2: Foto aérea do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ mostrando, em especial, o Morro do Telégrafo, Morro do Elefante e o Alto Mourão ao fundo (SEMADS 2001). Fonte: Barros, 200829
- Figura 4.3: Localização regional do PESET e principais vias de acesso à UC. Fonte: Plano de manejo PESET.....32
- Figura 4.4: Diferentes localidades do Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET), Niterói e Maricá, RJ. A. Morro do Alto Mourão – vista da estrada sentido Maricá - Niterói; B. Alto Mourão - Pedra do Elefante, Itacoatiara, Niterói; C. Mirante de Itaipuaçu – vista da baixada litorânea de Maricá e praia de Itaipuaçu; D. Mirante do Alto Mourão – vista das praias oceânicas de Niterói e das Lagoas de Itaipu e Piratininga; E. Sede Administrativa do PESET, Itaipuaçu, Maricá; F. Posto de recepção ao visitante, Itacoatiara, Niterói.....33
- Figura 4.5: Fotos das armadilhas luminosas modificadas: A – armadilha instalada na mata do ponto 1 (Itaipuaçu); B – armadilha instalada no galinheiro (ponto 5) da residência em Itaipu.....35
- Figura 4.6: Fotos de flebotomíneos montados entre lâmina e lamínula, visualizados ao microscópio óptico. A – Espermateca *Ny. intermedia* (40x) B – Genitália masculina *Ny. intermedia* (10x); C – *Lu. longipalpis* macho (4x); D - Genitália masculina *Lu. longipalpis* (10x). Fonte: Fuzari, 2011.....39
- Figura 4.7: Mapa mostrando parte da região do Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET) e as quatro áreas de trabalho em destaque: Área 1 – Mirante de Itaipuaçu, Maricá; Área 2 – Subsede do PESET, Itacoatiara, Niterói; Área 3 – Peridomicílio (Engenho do Mato, Quilombo e

Itaipú), Niterói; Área 4 – Morro das Andorinhas, Itaipú, Niterói; Trilhas utilizadas na coletas de pequenos mamíferos.....	40
Figura 4.8: Atividades realizadas no laboratório montado em campo: A - Triagem e classificação dos mamíferos; B - Manipulação e dissecação de roedor.....	43
Figura 4.9: Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> sp. (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação.....	46
Figura 4.10: Manipulação de amostras para extração de DNA de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas (com sangue no tubo digestório) para detecção de fonte alimentar.....	52
Figura 4.11: Alguns materiais utilizados para as Feiras de Ciências realizada pela equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias – SELF/INERU – IOC.....	57
Figura 4.12: Equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias – SELF/INERU – IOC atuando nos eventos de Educação em Saúde.....	58
Figura 4.13: Regras e estrutura do Jogo “Ache os Flebotomíneos”.....	58
Figura 4.14: Baners e estrutura da “Caverna Itinerante”.....	59
Figura 5.1: Percentual de machos e fêmeas de flebotomíneos coletados no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	60
Figura 5.2: Demonstração da curva de acumulação de espécies para cada área estabelecida no trabalho, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nas áreas de capturas nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	62
Figura 5.3: Espécies mais abundantes durante as capturas de flebotomíneos, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nas áreas de trabalho, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ. Área 1 – Mirante de Itapuaçu, Maricá (sítio localizado dentro da área do parque, ambiente de peridomicílio dentro da mata); Área 2 – Subsede do PESET, Itacoatiara, Niterói (ambiente de mata, próximo às trilhas abertas ao público); Área 3 – Peridomicílio (Engenho do Mato, Quilombo e Itaipú), Niterói (residências, onde foi observado, animais domésticos soltos, anexos, poucas plantações, árvores frutíferas, muito lixo e entulhos acumulados/ambientes limítrofes com a área de conservação do parque); Área 4 – Morro das Andorinhas, Itaipú, Niterói (residências, sendo apenas uma fora dos limites da área de parque, também com plantações, animais domésticos, anexos (como galinheiros), lixo e entulhos acumulados); Trilhas – transectos utilizados nas coletas de pequenos mamíferos, em diferentes localidades.....	64
Figura 5.4: Porcentagem dos gêneros encontrados, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nas áreas de capturas nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	65
Figura 5.5: Porcentagem de espécimes por espécie capturados, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	67
Figura 5.6: Espécies encontradas na localidade Mirante (área 1), ambiente de mata/peridomicílio, em Itapuaçu, Maricá, no período de junho de 2013 a abril de 2016.....	67

Figura 5.7: Espécies encontradas na subsede do PESET (área 2), ambiente de mata, em Itacoatiara, Niterói, no período de junho de 2013 a abril de 2016.....	69
Figura 5.8: Espécies encontradas no peridomicílio (área 3), nas localidades de Engenho do Mato, Quilombo e Itaipu, Niterói, no período de junho de 2013 a abril de 2016.....	69
Figura 5.9: Espécies encontradas no Morro das Andorinhas (área 4), ambiente de peridomicílio, porém residências inseridas dentro da área do PESET, em Itaipu, Niterói, no período de junho de 2013 a abril de 2016.....	70
Figura 5.10: Espécies de flebotomíneos capturadas nas trilhas utilizadas nas coletas de pequenos mamíferos, agosto/2014 e dezembro/2015, em Niterói e Maricá, RJ.....	70
Figura 5.11: Espécies reconhecidas como vetores de <i>Leishmania sp.</i> encontradas durante as coletas, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	73
Figura 5.12: Espécies reconhecidas como vetores de <i>Leishmania sp.</i> , distribuídas por coletas, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	73
Figura 5.13: : Espécies reconhecidas como vetores de <i>Leishmania sp.</i> , distribuídas por áreas de estudo, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ. Área 1 – Mirante de Itapuaçu, Maricá (sítio localizado dentro da área do parque, ambiente de peridomicílio dentro da mata); Área 2 – Subsede do PESET, Itacoatiara, Niterói (ambiente de mata, próximo às trilhas abertas ao público); Área 3 – Peridomicílio (Engenho do Mato, Quilombo e Itaipú), Niterói (residências, onde foi observado, animais domésticos soltos, anexos, poucas plantações, árvores frutíferas, muito lixo e entulhos acumulados/ambientes limítrofes com a área de conservação do parque); Área 4 – Morro das Andorinhas, Itaipú, Niterói (residências, sendo apenas uma fora dos limites da área de parque, também com plantações, animais domésticos, anexos (como galinheiros), lixo e entulhos acumulados); Trilhas – transectos utilizados nas coletas de pequenos mamíferos, em diferentes localidades.....	74
Figura 5.14: Distribuição dos espécimes de <i>Ev. tupyngambai</i> e <i>Mi. schreiberi</i> em cada coleta realizada no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	75
Figura 5.15: Medidas de temperatura e umidade relativa do ar foram aferidas por um aparelho Higrômetro nos dias das capturas. As medidas de precipitação mensal foram obtidas através do banco de dados (BDMET) do INMET, durante o período de junho de 2013 a abril de 2016, no município de Niterói, RJ. Fonte: Dados da Rede do INMET (http://www.inmet.gov.br/portal).....	75
Figura 5.16: Medidas de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação aferidas nas coletas em relação ao número de flebotomíneos coletados durante o período de junho de 2013 a abril de 2016.....	76
Figura 5.17: Exemplo de eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para avaliação de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos por <i>Leishmania sp.</i> . M: Marcador de peso molecular 100 pb; C-: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 1-2: Controles negativos - DNA extraído de flebotomíneos machos; 3-8: Fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular que se apresentaram negativas para	

Leishmania spp.; 9-12: Fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular revelando positividade das amostras 13: Controle positivo da reação (DNA de um único flebotomíneo macho misturado com DNA de *Le. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).....77

Figura 5.18: Exemplo de eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para identificação das espécies de *Leishmania* proveniente dos DNAs de flebotomíneos positivos na análise de infecção natural e re-amplificados com o fragmento do gene hsp70 (234pb) M: Marcador de peso molecular 100 pb; C-: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 1- 4: segundo round – DNA de Fêmeas de flebotomíneos positivas para *Leishmania* spp. 5: Controle positivo da reação (DNA de *Le. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).....78

Figura 5.19: Distribuição por gêneros, dos espécimes de pequenos mamíferos (Roedores e Marsupiais) capturados na expedição 1 (ago/2014 - estação seca) e na expedição 2 (dez/2015 - estação chuvosa), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....80

Figura 5.20: Percentual das espécies de Marsupiais (ordem Didelphimorphia) e Roedores (ordem Rodentia) capturadas nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....81

Figura 5.21: Percentual de animais Marsupiais (ordem Didelphimorphia) e Roedores (ordem Rodentia) capturados nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....81

Figura 5.22: Resultado em percentual (%) das espécies da ordem Didelphimorphia capturados nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....83

Figura 5.23: Resultado em percentual (%) das espécies da ordem Rodentia capturados nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....84

Figura 5.24: Exemplo de eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para avaliação de infecção natural de reservatórios por *Leishmania* sp.. M: Marcador de peso molecular 100 pb; C-: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 1- 13: DNA extraído de sangue (coletado em papel de filtro) de possíveis reservatórios de *Leishmania* spp. revelando negatividade das amostras 14: Controle positivo da reação (DNA de *Le. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).....84

Figura 5.25: Exemplares dos mesmos gêneros de roedores e espécie de marsupial encontrados nas coletas realizadas nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....85

Índice de Tabelas

Tabela 4.1: Descrição dos períodos de coletas em cada área de trabalho.....	36
Tabela 4.2: Demonstração das áreas trabalhadas, suas localidades e o ambiente, com descrição de todos os pontos de coletas de flebotômíneos (cada ponto de coleta = 1 armadilha) e suas coordenadas geográficas.....	38
Tabela 4.3: Distribuição dos transectos utilizados nas expedições para captura de pequenos mamíferos, suas localidades e as coordenadas geográficas.....	43
Tabela 5.1: Número de flebotômíneos, por espécies, distribuídos por sexo (fêmeas e machos) coletados nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	61
Tabela 5.2: Distribuição e quantificação de fêmeas, por espécie, utilizadas em cada técnica molecular.....	63
Tabela 5.3: Número de espécimes por espécie encontrados nas áreas de mata e peridomício nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.	65
Tabela 5.4: Índices de diversidade e equitabilidade por áreas de coleta nos municípios de Niterói e Maricá, RJ, no período de junho de 2013 a abril de 2016.....	65
Tabela 5.5: Número total de espécimes e Índice de constância (IC) por espécie encontrados nas áreas de estudo, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	66
Tabela 5.6: Espécies de flebotômíneos com infecção por <i>Leishmania</i> spp. segundo área de coleta, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	77
Tabela 5.7: Identificação de fonte alimentar em fêmeas de flebotômíneo naturalmente alimentadas coletadas no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	79
Tabela 5.8: Espécies de mamíferos capturados nas nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	82
.....	
Tabela 5.9: Relação das espécies de pequenos mamíferos e de flebotômíneos capturados nas trilhas, durante a expedição 1 (ago/2014 - estação seca) e a expedição 2 (dez/2015 - estação chuvosa), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.....	86

Índice de Quadros

Quadro 1.1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, sua distribuição geográfica, vetores e formas clínicas.....	11
Quadro 5.1: Quadro comparativo dos gráficos das espécies de fleboromíneos capturadas nas localidades Mirante (área 1), Mata de Itacoatiara (área 2), peridomicílio (área 3) e Morro das Andorinhas (área 4), em Niterói e Maricá, no período de junho de 2013 a abril de 2016.....	68

Lista de Abreviaturas e Símbolos

SIGLA	DESCRIÇÃO
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GPS	Global Positioning System
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PESET	Parque Estadual da Serra da Tiririca
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
WHO	World Health Organization
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
OMS	Organização Mundial da Saúde
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
TE	Tampão (Tris-HCl e EDTA)
TBE	Tampão (Tris – Ácido bórico – EDTA)

RESUMO

Os municípios de Niterói e Maricá (RJ), a partir dos anos 70, vem sofrendo um processo de impacto ambiental intenso e a ocorrência esporádica de casos humanos e caninos de leishmaniose tegumentar americana tem sido associada com a ocupação humana próximo às encostas da Serra da Tiririca. O Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET) inserido entre estes dois municípios, área de preservação recentemente criada, representa uma das poucas áreas com resíduos de mata atlântica tão próxima da área urbana. As leishmanioses, doenças com diversas manifestações clínicas, causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, é transmitida pelos flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae). No Brasil as leishmanioses tegumentar e visceral são, cada vez mais, doenças periurbanas; nesses ambientes, a falta de saneamento e coleta de lixo esporádica ou inexistente favorece e contribui para o aumento dos criadouros dos flebotomíneos, o que aumenta o risco da doença. A pobreza está associada a fatores ecológicos que podem aumentar esse risco, como as condições precárias de moradia, permitindo a entrada dos flebotomíneos e proporcionando locais de repouso durante o dia. Dentro do Projeto Brasil sem Miséria, proposto pelo governo federal, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o papel epidemiológico das leishmanioses, em algumas das comunidades inseridas na área do PESET em Niterói e Maricá, através da pesquisa da fonte alimentar, infecção natural e avaliação dos animais sinantrópicos. Foram realizadas coletas periódicas, no período de junho de 2013 a abril de 2016, em ambiente silvestre e peridomiciliar. Os insetos foram capturados com a utilização de armadilhas luminosas CDC (modelo HP) em 4 áreas diferentes, além das armadilhas utilizadas durante as duas expedições para captura de pequenos mamíferos (estação seca e chuvosa). Para a coleta destes últimos animais, foram utilizadas armadilhas tipo live-trap, dos modelos Tomahawk® e Sherman®, distribuídas em 6 transectos em cada expedição, com 15 estações de captura em cada. Em todo o trabalho foram coletados 4402 flebotomíneos, sendo 2468 machos (56,1%) e 1934 fêmeas (43,9%), de 11 espécies pertencentes a 8 gêneros: *Migonemyia migonei* (39,85%), *Evandromyia tupynambai* (21,07%), *Micropygomyia schreiberi* (16,39%), *Brumptomyia cunhai* (5,51%), *Br. nitzulescui* (3,49%), *Nyssomyia intermedia* (3,24%), *Ev. cortelezii* (2,68%), *Lutzomyia longipalpis* (2,27%), *Ev. edwardsi* (2%), *Ev. spp* (1,78%), *Br. spp* (1,07%), *Psathyromyia pelloni* (0,41%) e *Pintomyia bianchigalatae* (0,22%). Destas, *Ev. tupynambai* e *Mi. schreiberi* foram encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania spp.* pelo método molecular de PCR multiplex. No diagnóstico para fonte alimentar, apenas duas espécies de aves foi detectado, *Gallus gallus* e *Cairina moschata* (pato do mato). Dentre os pequenos mamíferos, foram capturados 32 exemplares, das seguintes espécies, *Trinomys eliasi* (31,25%), *Didelphis aurita* (28,12%), *Philander frenatus* (18,75%), *Metachirus nudicaudatus* (6,25%), *Trinomys sp.* (6,25%) e *Oligoryzomys nigripes*, *Monodelphis gr. americana*, *Gracilinanus microtarsus* com 3,13% cada. Nenhum com registro de infecção por *Leishmania sp.* Portanto, *Ev. tupynambai* foi espécie de maior frequência e *Mg. migonei* a de maior abundância, sugerindo a possibilidade desta ser o principal vetor na localidade; *Lu. longipalpis*, principal vetor da *Leishmania infantum*, capturada em maior quantidade agora, sugerindo o início de sua expansão na região; Em Itacoatiara (subsede do PESET), *Ev. tupynambai* pode ser a espécie mantenedora do ciclo de transmissão da leishmaniose neste ambiente.

Abstract

Since 1970's, Niterói and Maricá municipalities are undergoing a process of intense environmental impact, and the occurrence of sporadic human and canine cases of American Tegumentary Leishmaniasis has been associated with human occupation near slopes of Serra da Tiririca. The Serra da Tiririca state park (PESET) is located between both municipalities, is a natural area preserved recently created and represents one of few areas with residual Atlantic forest close to an urban area. The leishmaniasis, diseases with large clinical manifestations, caused by flagellate protozoan parasites of the genus *Leishmania*, is transmitted by sandflies, small insects of order Diptera, family Psychodidae and subfamily Phlebotominae. In Brazil, tegumentary and visceral leishmaniasis are, increasingly, peri-urban diseases; In these environments, both poor sanitation and rubbish collection support the increase of sand flies breeding sites which consequently increases the risk of the disease. Poverty is associated with ecological factors that can increase risk, such as poor housing conditions (mud walls and cracked walls) that allow entry and provide resting sites during the day for sand flies. Within Brasil sem miséria program, proposed by brazilian federal government, the main goal of this study is to evaluate the epidemiological aspects of leishmaniasis in some of the communities located in the area of Serra da Tiririca State Park in Niterói and Maricá, through the research of food source, natural infection and evaluation of synanthropic animals. Periodic collections were carried out, from June 2013 to April 2016, in a wild and peri domiciliary environment. The insects were captured using HP light traps (CDC type) in 4 different areas, in addition to the traps used during two expeditions to capture small mammals (dry and rainy season). For the mammals capture, live-trap, Tomahawk® and Sherman® models trap were used, distributed in 6 transects in each expedition, with 15 capture stations in each. A total of 4402 phlebotomines were collected, 2468 males (56.1%) and 1934 females (43.9%), of 11 species of 8 genus: *Migonemyia migonei* (39.85%), *Evandromyia tupynambai* (21, 07), *Micropygomyia schreiberi* (16.39%), *Brumptomyia cunhai* (5.51%), *Br. nitzulescui* (3.49%), *Nyssomyia intermedia* (3.24%), *Ev. cortelezzii* (2.68%), *Lutzomyia longipalpis* (2.27%), *Ev. edwardsi* (2%), *Ev. spp* (1.78%), *Br. spp* (1.07%), *Psathyromyia pellowi* (0.41%) and *Pintomyia bianchigalatae* (0.22%). Of these species, *Ev. tupynambai* and *Mi. schreiberi* were found naturally infected by *Leishmania spp.* by the molecular method. In the food source diagnosis, only two bird species were detected, *Gallus gallus* and *Cairina moschata* (Muscovy duck). Among the small mammals, 32 specimens of the following species, *Trinomys eliasi* (31.25%), *Didelphis aurita* (28.12%), *Philander frenatus* (18.75%), *Metachirus nudicaudatus* (6.25%), *Trinomys sp.* (6.25%) and *Oligoryzomys nigripes*, *Monodelphis gr. americana*, *Gracilinanus microtarsus* with 3.13% each. None infected with *Leishmania sp.* Therefore, *Ev. tupynambai* presented higher frequency and *Mg migonei* was the one of greater abundance, suggesting the possibility of this specie being the main vector in the area; *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *Leishmania infantum*, was captured in greater number, suggesting the beginning of its expansion in the region; In Itacoatiara (substation of PESET), *Evandromyia tupynambai* may be the specie that maintains the transmission cycle of leishmaniasis in this environment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Leishmanioses – Aspectos gerais

As leishmanioses, consideradas um conjunto de doenças tropicais, são as mais negligenciadas no mundo. Acometendo mais de 12 milhões de pessoas, 2 milhões de novos casos a cada ano e 350 milhões de pessoas com risco de contrair a infecção, principalmente em áreas, onde as taxas de incidência de populações pobres são altas. Atinge um total de 98 países, com relatos de transmissão endêmica, em todo o mundo (Alvar et al. 2006; Alvar et al. 2012).

A pobreza é um dos fatores determinante no contexto das leishmanioses, porém não o principal (Alvar et al. 2006). Baixa renda per capita, muitas vezes abaixo de US\$ 1/dia, são relatados em estudos de pacientes com leishmaniose em Bihar (Thakur 2000), Nepal (Adhikari & Maskay 2003, Bangladesh (Anoopa Sharma et al. 2006) e Brasil (Santos et al. 2000).

A pobreza está associada a fatores ecológicos que podem aumentar o risco de transmissão, como as condições precárias de moradia (paredes de barro e com rachaduras) que permitem a entrada e que proporcionam locais de repouso durante o dia para os insetos vetores, os flebotomíneos (Quinnell & Dye 1994; Bern et al. 2000; Bern et al. 2005; Barnett et al. 2005; Ranjan et al. 2005). Pois tais insetos desenvolvem-se em criadouros constituídos por solos úmidos, ricos em matéria orgânica, entre raízes expostas, embaixo de folhas caídas, pedras e ambientes antrópicos, bem como chiqueiros, galinheiros e estábulos, sempre que existam condições adequadas (Brazil & Brazil, 2003)

As leishmanioses são zoonoses causadas por várias espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross, 1903. Esse gênero está incluído na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Estes, por sua vez, são transmitidos pelas fêmeas de flebotomíneos. As leishmânias são protozoários heteroxênicos, parasitas intracelulares obrigatórios. Seu ciclo tem a participação de um hospedeiro definitivo, um mamífero e um hospedeiro intermediário, o flebotomíneo (Forattini 1973; Gontijo & Carvalho, 2003).

As leishmanioses estão elencadas entre as doenças mais complexas e diversas entre as transmitidas por vetores. Sua ecologia e epidemiologia, engloba diversas

espécies de reservatórios, diferentes espécies de flebotomíneos vetores e aproximadamente 20 espécies de parasitos. Estas doenças possuem ampla variação geográfica, geralmente com uma distribuição focal. Tais agravos ocorrem em mais de 100 países, de clima tropical e subtropical, em ciclos zoonóticos e antroponóticos (Ashford 1996; Lainson & Shaw 1987; Brazil et al. 2015).

Em sua epidemiologia, o hospedeiro silvestre, pode ser considerado, como reservatório natural das leishmanias. Em hospedeiros acidentais, incluindo o homem e animais domésticos, comumente a infecção é sintomática (Lainson *et al.*, 1983).

A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro, podendo ser classificadas em quatro formas clínicas: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea mucosa e leishmaniose cutânea difusa. Sendo as duas principais: leishmaniose cutânea ou tegumentar e a visceral (Saraiva et al. 1989; Lainson & Rangel 2005).

1.2 – Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (Gontijo & Melo, 2004; WHO 2016). Também é considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Caracteriza-se por episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. Tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (Alvar et al. 2012; Brasil, 2014) (Fig. 1.1), com um total estimado de 200 milhões de pessoas vivendo sob risco de adquirirem a infecção. Estima-se que entre 200 a 400 mil novos casos ocorrem a cada ano. Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorreram em 6 países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Programas para eliminação e o controle da LV no Sudeste Asiático estão alcançando progressos, e os casos estão diminuindo nos três principais países endêmicos: Bangladesh, Índia e Nepal (WHO, 2016; Gontijo & Melo, 2004; Sharma e Singh, 2008).

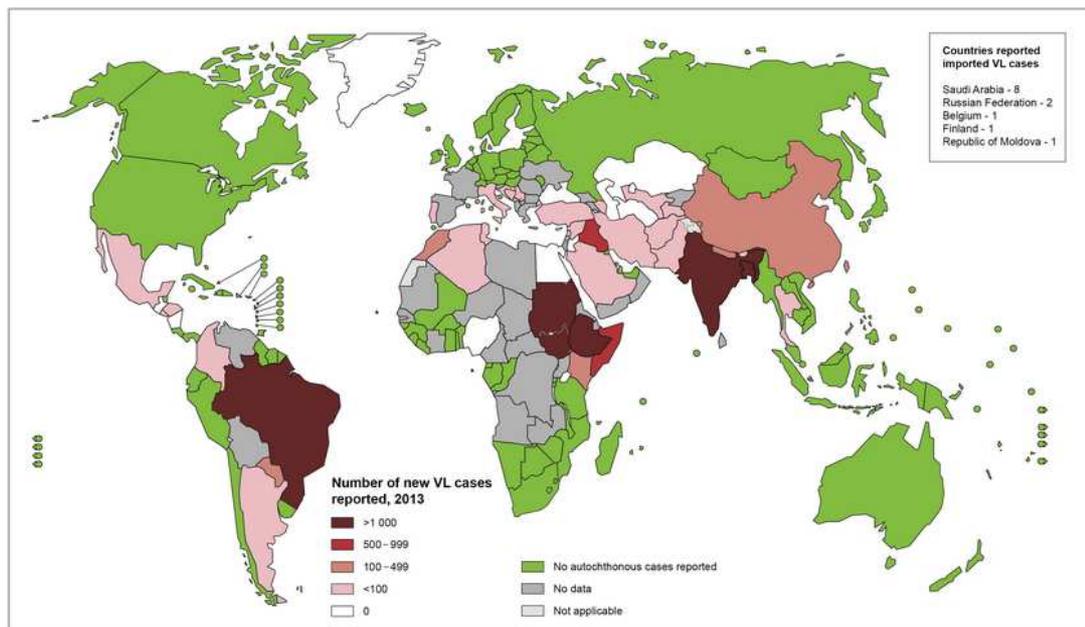


Figura 1.1: Endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo, dados de 2013. Fonte: adaptado de WHO (2015)

Na América do Sul e Central, a leishmaniose visceral se estabeleceu através de cães infectados trazidos por colonos de Portugal e da região do Mediterrâneo (Kuhls et al. 2011). Tem se apresentado cada vez mais um perfil periurbano, decorrente da falta de saneamento e coleta de lixo esporádica ou inexistente, propiciando o aumento dos criadouros dos flebotomíneos, e risco do surgimento de casos da doença (Tesh 1995; Costa et al. 2005). Atualmente a doença já foi descrita em pelo menos 12 países da América Latina, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, onde é considerada uma antrozoose endêmica/epidêmica rural e periurbana, com forte tendência a urbanização (Rangel & Vilela, 2008; Marzochi et al. 2009; Salómon et al. 2015). A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. A espécie *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da *Leishmania infantum* nas Américas. No Brasil também foi incriminado como vetor *Lu. cruzi* nos estados do Mato Grosso (Missawa et al. 2011; De Brito et al. 2014a e 2014b) e Mato Grosso do Sul (Pita-Pereira et al. 2008; dos Santos et al. 1998; Casaril et al. 2014; De Oliveira et al. 2015). E recentemente, no estado de Pernambuco, *Mygonymyia migonei* foi encontrada infectada naturalmente, através de PCR-multiplex, e pode ser considerada como potencial vetor da *Leishmania infantum* em cães (Carvalho et al., 2010).

Deane & Grimaldi (1985) estimaram até 1984, que de um total de 8.959 casos registrados no Brasil, 7.882 estavam na região Nordeste (Lainson & Rangel, 2005). Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV. A doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos. Atualmente a maior incidência de LV ainda se encontra no Nordeste, com aproximadamente 48% do total de casos do país, seguido das regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e, por último a região Sul. Em 21 dos 26 estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LV (Lainson & Rangel, 2005; MS, 2014). A partir dos anos 90, os estados do Pará e Tocantins, na região Norte, Mato Grosso do Sul, região Centro Oeste, e Minas Gerais e São Paulo, na região Sudeste, passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (Gontijo & Melo, 2004; MS, 2014).

1.3 – Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença antiga com relatos e descrições na literatura desde o século I d.C. na Ásia Central ao norte do Afeganistão, onde era conhecida como “Úlcera de Balkh” (Laveran, 1917). Os primeiros registros nas Américas foram relatados em cerâmicas pré-colombianas, entre 400 e 900 anos do século I d.C., feitas por nativos do atual Peru, no qual apresentava imagens humanas com mutilações de lábios e nariz, caracterizando os sintomas da leishmaniose cutâneo-mucosa (Lainson e Shaw, 1988). Através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas característica primordial da leishmaniose (Santos e Coimbra, 1994).

A LT é a forma mais comum de leishmaniose e provoca lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, resultando em cicatrizes de longa duração e incapacidade grave. Apresenta uma distribuição mundial, e são endêmicas em 88 países, 22 são do Novo Mundo e 66 do Velho Mundo, sendo sua notificação compulsória em apenas 30 deles. (Fig. 1.2) Estima-se que 350 milhões de pessoas vivem em regiões endêmicas correndo o risco de contrair a infecção. Cerca de 0,7 milhão a 1,3 milhão de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo, onde cerca de 95% dos casos de LT ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente

Médio e na Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de LT ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria (Alvar, 2012; WHO, 2016).

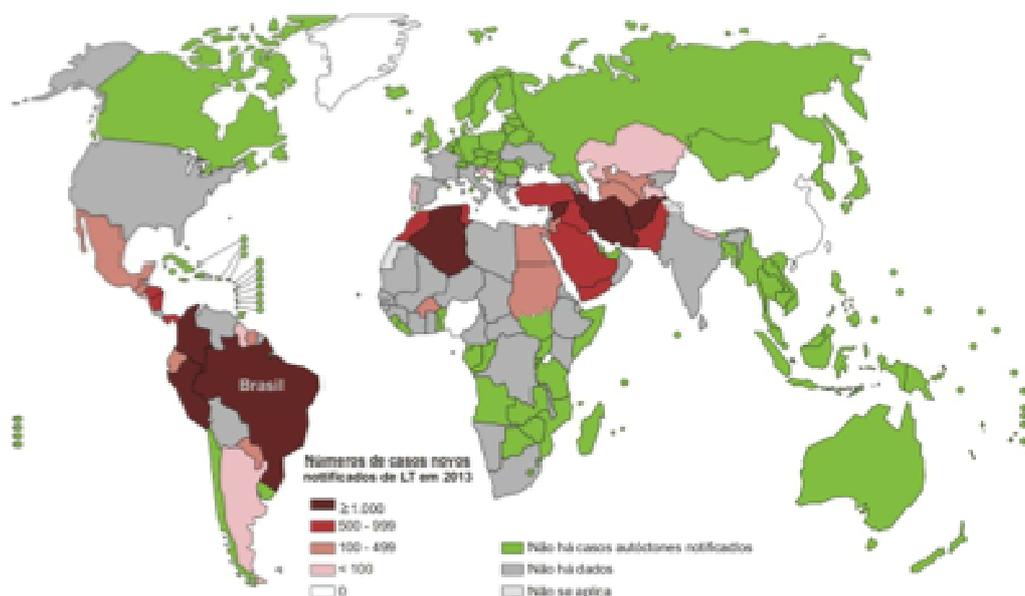


Figura 1.2: Endemicidade de leishmaniose tegumentar no mundo, dados de 2013 - Fonte: adaptado de WHO (2015).

No Novo Mundo, a LT ocorre do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai, causando diversas formas clínico-epidemiológicas (Lainson & Rangel, 2005; Aguiar et al. 2014; MS, 2014).

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

Na leishmaniose tegumentar, as leishmanias são parasitas de células cutâneas e de mucosas. Quando o parasito é inoculado, uma lesão cutânea, de aspecto pápulo-

vesiculoso, é formada no local da picada (Leishmaniose Cutânea - LC), que pode regredir e sofrer cura espontânea ou evoluir para uma lesão arredondada de borda endurecida. Em outros casos a infecção pode disseminar-se para outros pontos e áreas do corpo surgindo lesões cutâneas disseminadas (Leishmaniose Cutânea Difusa - LCD) pela ausência de resposta imune, podendo ocorrer ainda a invasão das mucosas, comumente da nasofaríngea (Leishmaniose Cutânea Mucosa - LCM). Nestas formas clínicas, as leishmanias envolvidas são específicas (Gontijo & Carvalho, 2003; Brazil et al. 2015).

Nas duas últimas décadas, a LT tem se expandido em praticamente todos os Estados, com surtos epidêmicos ocorrendo em todas as regiões do País, tornando-se um importante problema de saúde pública.

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 26 mil novos casos de LT no país. Entre 2001 e 2010 foram registrados no Brasil 269.855 casos confirmados de LT (DataSus2015). Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Lainson, 1988; Gontijo & Carvalho, 2003).

É uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle (MS, 2014).

1.4 - Leishmaniose no Rio de Janeiro

No estado do Rio de Janeiro, o primeiro caso autóctone de leishmaniose cutânea foi registrado por Rabello em 1913, posteriormente, houve relatos da doença nos bairros de Realengo, Jacarepaguá, Gávea e Águas Férreas (Dutra e Silva, 1915; Aragão et al. 1922). Outros registros da doença em áreas rurais de outras cidades no estado, foram efetuados, porém não despertou interesse das instituições de saúde. Nos anos 70, com alguns focos relatados em várias áreas do estado, aumentou interesse e preocupação sobre a questão. Desde então, a doença endêmica foi concentrada, na cidade do Rio de Janeiro, na região do Maciço da Pedra Branca (zona oeste da cidade). Em 1986, no município de Mesquita, limítrofe com os municípios de Nova Iguaçu e Rio

de Janeiro, um surto da doença foi relatado na área ocupada pelo Maciço do Gericinó (Oliveira-Neto et al. 1988). Esta região apresentou um perfil muito parecido ao do Maciço da Pedra Branca, quanto ao tipo de desmatamento e ocupação. Recentemente, em 2013, foram diagnosticados dois casos de leishmaniose cutânea americana na região ao redor do Cemitério de São Francisco Xavier, no bairro do Caju, na cidade do Rio de Janeiro (Bernardes Filho et al. 2014).

Assim, a leishmaniose tegumentar, no estado do Rio de Janeiro, apresenta um caráter de transmissão peridomiciliar e é classificado como área de transmissão esporádica, principalmente provocada pela adaptação de algumas espécies do inseto vetor aos ambientes naturais modificados, acarretando, dessa forma o envolvimento de animais domésticos (Brazil et al 1991; Marzochi & Marzochi, 1994; Santos et al. 2005; Madeira et al 2006; Mello et al. 2015).

Quanto à leishmaniose visceral, o Estado do Rio de Janeiro, também está classificado como área de transmissão esporádica, com casos humanos e caninos diagnosticados apenas no Município do Rio de Janeiro. Entretanto, nos últimos anos, foram relatados casos de leishmaniose visceral nos municípios de Angra dos Reis e Mangaratiba, demonstrando a expansão tanto espacial quanto em número de casos. (Marzochi et al. 1985; Cabrera et al. 2003; Madeira et al. 2006; Marzochi *et al.*, 2009).

Mais recentemente, entre 2007 a 2012, 18 casos de LV foram notificados com autoctonia comprovada em Volta Redonda, Barra Mansa e Miracema, segundo dados do SMS/MS, 2012. Em 2013 foi relatado, após investigação da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro, o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral em humanos na área urbana da cidade do Rio de Janeiro. A paciente é nascida no município do Rio de Janeiro, residente do bairro do Caju, e funcionária do cemitério do Caju (Silva et al. 2014).

A identificação frequente de cães domésticos com altas taxas de infecção associados à doença humana, aliada à evidência dos mesmos padrões genotípicos do parasita circulando nas populações humanas e caninas, sinaliza e reforça o envolvimento deste animal no ciclo de transmissão. (Lopes et al. 1984; Pacheco et al. 1986; Madeira et al. 2000; Marzochi et al. 2009; Silva et al. 2015; Abrantes et al. 2016).

A região oceânica de Niterói, município do Estado do Rio de Janeiro, a partir dos anos 70, apresentou uma grande especulação imobiliária e desde então foram relatados diversos casos de LT nas encostas da Serra da Tiririca, inserida entre os municípios de Maricá e Niterói. Neste último a ocorrência esporádica de casos humanos e caninos de LT tem sido associada com a ocupação humana próximo à encosta (Brazil et al. 1989; Horta et al. 1998; Uchôa et al. 2001; Serra et al. 2003).

De Paula (2009) relatou o primeiro caso autóctone de LV canina, em Inoã, município de Maricá, fornecendo elementos relacionados à distribuição geográfica de *Leishmania (Leishmania) infantum* no Estado do Rio de Janeiro. Desde então, novos casos foram descritos em regiões próximas.

Em 2012, a Vigilância Epidemiológica Estadual, relata a ocorrência de casos de LV em cães nos municípios de Mangaratiba, Maricá, Niterói, Rio de Janeiro e Volta Redonda, reiterando alerta para necessidade de atenção pelos serviços de vigilância e assistência municipais, quanto ao enfrentamento de um novo ciclo de transmissão da doença em cães e seres humanos no estado (NOTA TÉCNICA Nº 5/2012 - GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SES RJ).

1.5– Agente etiológico das leishmanioses

Espécies do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) são os agentes etiológicos das leishmanioses, estas, pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São protozoários digenéticos obrigatórios, onde é necessário, que o seu ciclo tem a participação de um hospedeiro definitivo, um mamífero e um hospedeiro intermediário, o flebotomíneo. São parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, nos tecidos dos vertebrados, sob a forma aflagelada” (amastigota) e com a forma flagelada (promastigota) encontrada no tubo digestório do inseto vetor (Forattini 1973; Gontijo & Carvalho, 2003, Brasil, 2014).

As promastigotas são formas alongadas, com 16 a 40 µm de comprimento, incluindo o flagelo, que geralmente tem o mesmo tamanho ou superior ao corpo do parasito. O flagelo é livre e longo, emergindo da região anterior do parasito. Na região mediana da célula, está o núcleo, que é arredondado. O cinetoplasto está situado entre a extremidade anterior e o núcleo. Nas formas amastigotas, o flagelo é curto e interiorizado na bolsa flagelar (Guerra Silva et al. 2014), por isso, muitas vezes esta forma é chamada de aflagelada. Seu tamanho varia entre 1,5-3 µm x 3-6,5 µm de

diâmetro, de acordo com a espécie do parasito. Possui um formato ovóide a esférico, seu núcleo ocupa um terço do corpo do parasito e é arredondado, enquanto o cinetoplasto fica próximo à bolsa flagelar (Guerra Silva et al. 2014).

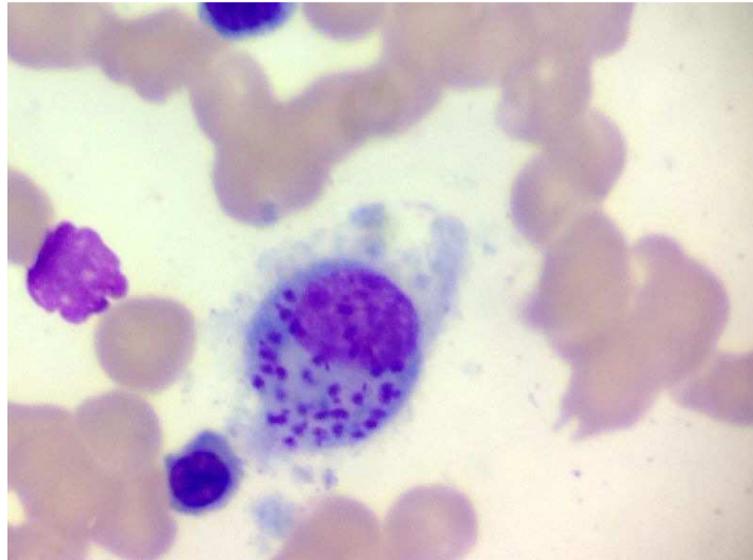


Figura 1.3: - Forma amastigota de *Leishmania infantum* encontrada em aspirado de medula óssea. 282 x 211 mm (72 x 72 DPI). Fonte : Silva et al. 2014

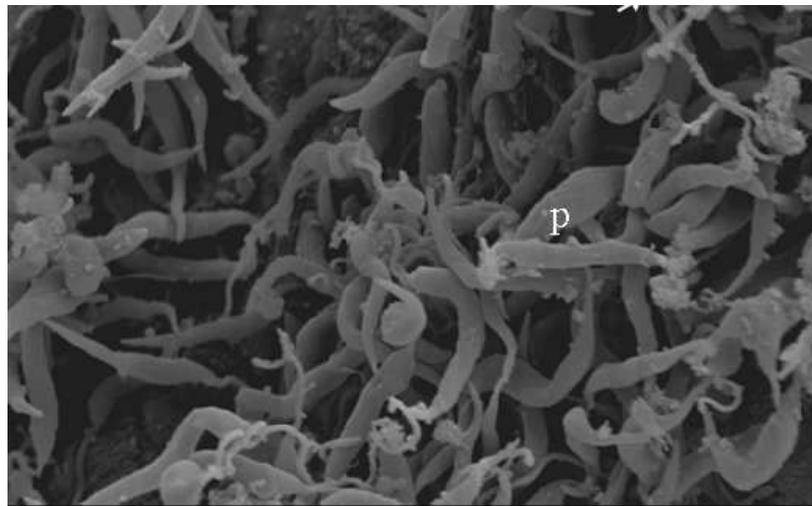


Figura 1.4: Forma promastigota no intestino médio de fêmea de *Lu. longipalpis* infectada com *Le. (L.) infantum* WT. Os intestinos foram dissecados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. Fonte: Freitas VC, 2010.

O cinetoplasto é a região que possui o mais complexo DNA mitocondrial encontrado na natureza. Este está presente em flagelados unicelulares da ordem Kinetoplastida, o k-DNA é conhecido como uma rede de milhares de DNAs circulares

catenados, que são de dois tipos: os maxicírculos e os minicírculos (Guerra Silva et al. 2014).

Os subgêneros *Leishmania* e *Vianna* foram definidos pelas diferenças observadas em relação aos sítios anatômicos de desenvolvimento dos parasitos, no tubo digestório dos insetos vetores. (Lainson & Shaw, 1987). Os parasitos que se desenvolvem apenas nas porções anterior e média do intestino, são agrupados no subgênero *Leishmania*, denominado como um comportamento suprapilário. Enquanto, que os que apresentam uma fase de divisão no intestino posterior, possuindo um comportamento peripilário, pertencem ao subgênero *Vianna* (Lainson & Shaw, 1972; Guerra Silva et al. 2014). A característica fisiológica das espécies de leishmanias permitiu dividi-las em três grupos diferentes: dois subgêneros, *Leishmania* e *Vianna* e separando o gênero *Sauroleishmania*, que posteriormente foi confirmado como um gênero válido por estudos bioquímicos e moleculares. O último gênero inclui espécies de lagartos e parasitas não patogênicos para humanos (Brazil et al. 2015).

Na década de 70, no Brasil, todos os casos de LT eram atribuídos a *Leishmania braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos outras espécies foram descritas e relacionadas com as formas clínicas: espécies envolvidas com LC são as *Leishmania (Vianna) braziliensis*, *L.(V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) shawi*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) lindenbergi*. A LCD é causada por *L. (Leishmania) amazonensis*, enquanto que na LCM a espécie envolvida é a *L. (V.) braziliensis* (Lainson, 1988; Silveira et al., 2002; Sharma & Singh, 2008; Rangel & Lainson, 2009; Brazil et al. 2015).

Nas Américas são conhecidas 13 espécies de *Leishmania* causadoras de doença humana, distribuídas em dois subgêneros *Vianna* e *Leishmania* (Quadro 1.1) (Lainson e Shaw, 1987; Brasil, 2009; Brasil, 2010; Lainson, 1997; Silveira et al.,1997; Brazil 2015).

Quadro 1.1: Principais espécies de *Leishmania* responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, sua distribuição geográfica, vetores e formas clínicas.

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

Fonte: Adaptado de Brazil et al. 2015.

A transmissão do parasito para o vertebrado se dá quando a fêmea de flebotomíneo infectada, pica o hospedeiro vertebrado e durante o repasto sanguíneo, inocula as formas promastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro. No tecido do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário e se transformam em formas amastigotas, onde o parasito se desenvolve e se multiplica por divisão binária, avançando para infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário, e se multiplicar (Figura 1.5) (Nieves e Pimenta, 2000; Rey, 2001; Pimenta et al., 2003; CDC, 2015). A infecção nos flebotomíneos ocorre no momento do repasto sanguíneo em um vertebrado infectado com as formas amastigotas, estas formas ingeridas pelos flebotomíneos se transformam em promastigotas, com ciclo de vida extracelular, desenvolvendo-se no intestino dos flebotomíneos, e migrando para a probóscide para

que ocorra uma nova infecção no vertebrado, mantendo o ciclo de vida da *Leishmania*. (Figura 1.5) (Nieves e Pimenta, 2000; Rey, 2001; Pimenta et al., 2003; Desjeux, 2004; CDC, 2015).

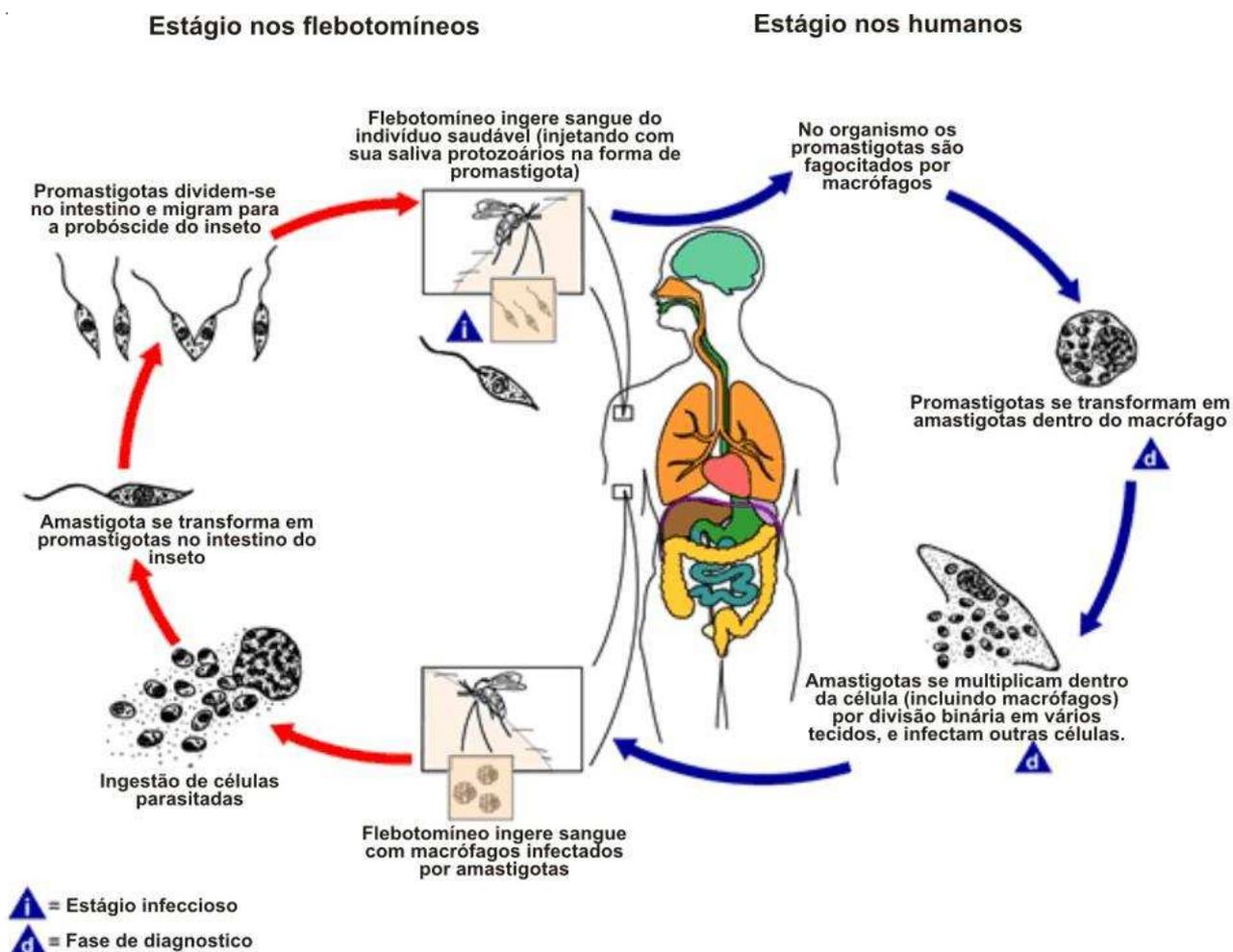


Figura 1.5: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. - Fonte: adaptado de CDC (2015)

1.6– Os Flebotomíneos

Os flebotomíneos são pequenos insetos nematóceros, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Está última apresenta grande importância em Saúde Pública, pois é composta por insetos hematófagos, vetores naturais de alguns agentes etiológicos de doenças humanas e de animais, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, bactérias do

gênero *Bartonella* e várias espécies de arborvírus (Pessoa & Martins 1982; Young & Ducan 1994; Alexander & Maroli 2003) que estão relacionados a agravos com menor notoriedade na literatura científica e na saúde coletiva mundial, tais como: doença de Carrión, meningite do verão, estomatite vesicular, encefalite do vírus Chandipura e *sandfly fever* (Maroli et al. 2013; Young & Duncan 1994).

A classificação taxonômica desses insetos é morfológica, baseada nos adultos, machos e fêmeas. (Forattini, 1973; Young & Ducan, 1994). De acordo com Young & Ducan (1994) a subfamília agrupa seis gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo. Destes três últimos gêneros, *Lutzomyia* é considerado o mais importante por conter representantes vetores de leishmanias na região neotropical.

Em 1995, Galati propôs uma classificação utilizando uma abordagem filogenética, na qual divide Phlebotominae em duas tribos: Hertigiini e Phlebotomini. A primeira, mais primitiva e sem espécies de interesse médico, possui duas subtribos: Hertigiina para a América e Idiophlebotomina para o Velho Mundo e Região Australiana. Phlebotomini foi dividida em 6 subtribos: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina. Sendo as espécies americanas distribuídas entre as quatro últimas.

Em 2003, Galati et al. descreveram o gênero *Edentomyia* Galati, Andrade Filho, Silva & Falcão, 2003, cuja espécie-tipo foi encontrada em cavernas no Estado do Piauí, Brasil, com características que permitem incluí-lo em Phlebotomini, mas não em qualquer uma de suas subtribos consideradas na classificação de Galati (1995). Portanto, existe um gênero dentro de uma subtribo ainda não determinada. De acordo com a autora, estão descritas 534 espécies nas Américas (517 atuais e 17 fósseis), divididas em 29 gêneros, sendo que a maioria da espécies tem registros no Brasil (Galati, 2003; 2015). Embora essa classificação tenha lançado nova luz sobre a evolução e a biogeografia dos flebotomíneos, refletindo um sistema de classificação mais natural do que o atualmente utilizado, já que contêm informações sobre um grande número de caracteres, ainda é pouco aceita no Brasil (Shimabukuro, 2007), porém, mais recentemente, foi publicado nota, com propostas e perspectivas de inclusão da nova chave taxonômica (Nota técnica – MS, 2014).

Os flebotomíneos são conhecidos popularmente no Brasil, dependendo da região, como asa branca, asa dura, birigui, cangalhinha, mosquito-palha, tatuquira, frebóti, arrupiado, dentre outras designações. A maioria das espécies do Novo Mundo habita áreas de florestas primárias e/ou secundárias. Em função das modificações ambientais impostas pelo homem, algumas espécies vêm se adaptando a ambientes rurais e periurbanos (Andrade Filho *et al.* 2001; Rangel & Lainson, 2009).

As formas adultas nos flebotomíneos podem ser distinguidas pelo tamanho pequeno (2-3mm), o corpo e as asas cobertos de cerdas e a antena composta por 16 segmentos. Seus voos são curtos e baixos, conferindo um comportamento saltitante e uma dispersão não superior a 200m (Forattini, 1973; Brazil & Brazil, 2003; Oliveira *et al.* 2013). São insetos holometábolos, suas formas imaturas desenvolvem-se em criadouros constituídos por solos úmidos, ricos em matéria orgânica, entre raízes expostas, embaixo de folhas caídas, pedras e ambientes antrópicos, bem como chiqueiros, galinheiros e estábulos, sempre que existam condições adequadas (Brazil & Brazil, 2003). Em condições adequadas de umidade, a fêmea põe em média de 40-70 ovos que eclodem em 6-17 dias, dando origem às larvas. À exceção dos outros Psychodidae, cujas larvas são aquáticas ou semi-aquáticas, as larvas dos flebotomíneos são terrestres, têm um aspecto vermiforme. Os criadouros naturais desses insetos dificilmente são encontrados, no Novo Mundo, Hanson (1961) encontrou resultados concretos, utilizando o método de flotação combinado a uma solução saturada de açúcar tendo obtido 2258 larvas do solo da floresta no Panamá, em quatro anos de estudo. Menos de 30% dessas larvas chegou à fase adulta, a qual a maioria foi identificada como *Lutzomyia longipalpis*. Em revisão sobre este assunto, Feliciangeli (2004) incluiu informações sobre criadouros de algumas espécies envolvidas na transmissão de leishmanioses nas Américas (Feliciangeli, 2004).

O ciclo-de-vida dos flebotomíneos tem em média 30-90 dias, conforme as condições ambientais. Possuem hábitos crepusculares ou noturnos e costumam permanecer em seus abrigos durante as horas de alta luminosidade do dia, abandonando-os na busca de alimento (Forattini, 1973; Brazil & Brazil, 2003).



Figura 1.6: Estágios do ciclo de vida do flebotomíneo. Ovo (A), larva (B) pupa (C) adulto (D).
 Fonte: Andressa Fuzari

Os adultos de ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte de energia, retirando-os do néctar de flores e frutos e/ou de seivas de plantas. O hábito hematofágico restringe-se às fêmeas, necessário à maturação de seus ovos. Essa característica os inclui dentro de um grupo de vetores de importância epidemiológica (Forattini 1973, Brazil & Brazil 2003; Alexander *et al.* 1992). Os flebotomíneos praticam a hematofagia em diversas espécies de animais silvestres, tais como: gambá, tatu, preguiça, tamanduá, paca e outros roedores silvestres. Porém com a invasão e devastação da mata pelo homem, existem indícios de que animais domésticos como o cão e o cavalo podem ser infectados e servir como fonte de infecção para os flebotomíneos (Falqueto *et al.* 1986, 1987; Rangel *et al.* 1990; Yoshida *et al.* 1988).

Nos insetos hematófagos, a saliva cumpre papel essencial na inibição dos mecanismos de homeostasia do hospedeiro, induzindo a vaso dilatação e a inibição de coagulação sanguínea, ações que facilitam o repasto. Para isso, é necessário que o

inseto, no momento da alimentação, apresente as glândulas salivares desenvolvidas e com a reserva de secreção suficiente para o repasto (Brazil & Brazil 2003).

Na saliva dos flebotomíneos foi observada a presença de anticoagulantes e de um peptídeo, denominado maxadilan, um potente vasodilatador, que auxilia uma formação de poças de sangue que surgem dos pequenos vasos dilacerados pela probóscida do inseto, que não é longa o suficiente para atingir vasos sanguíneos de maior calibre, como fazem os culicídeos e os triatomíneos. Nos flebotomíneos, o repasto sanguíneo das fêmeas pode ocorrer 24 horas após a emergência do adulto. Entretanto, observações em laboratório, de *Lu. longipalpis*, demonstraram que um número maior de fêmeas inicia essa atividade após 48 horas, o que pode estar associado ao amadurecimento das glândulas salivares e ao endurecimento das peças bucais (Brazil & Brazil 2003).

A importância dos flebotomíneos para o homem e para os animais deve-se, sobretudo, a seu papel como vetores de doenças, porém às vezes, tornam-se importantes porque afetam diretamente as pessoas, com suas picadas dolorosas e causadoras de reações alérgicas (Young & Duncan 1994).

1.7 – Complexo *Lu. Longipalpis*

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) é o principal vetor da *Leishmania (Leishmania) infantum* no Brasil, onde possui ampla distribuição geográfica. Foi colonizando gradualmente os ambientes rurais, e no final dos anos 1980, que esta espécie iniciou sua introdução no ambiente urbano, encontrado principalmente no intra e peridomicílio nas periferias das grandes cidades (Lainson & Rangel 2005; Brazil 2013).

É a espécie que mais atende aos critérios de competência vetorial, destacando a antropofilia correspondendo à distribuição espacial dos casos humanos, assim como a infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Deane 1956; Killick-Kendrick 1990; Rangel & Vilela 2008).

Sua adaptabilidade ao ambiente urbano ou antropicamente modificado é relatada por diversos autores em várias localidades brasileiras. Geralmente, esta espécie apresenta elevada densidade em áreas urbanas e baixa densidade em áreas silvestres (Oliveira et al. 2003; Pinheiro et al. 2013; Carvalho et al. 2010).

O primeiro relato de variações em exemplares de *Lu. longipalpis* foi observado por Mangabeira (1969), que verificou diferenças morfológicas nos machos de duas populações dos estados do Pará e do Ceará. Insetos coletados no Pará apresentavam um par de pintas claras, localizadas no quarto segmento abdominal (fenótipo chamado de 1S) enquanto que machos coletados no estado do Ceará apresentavam dois pares de pintas (fenótipo chamado de 2S) no terceiro e quarto segmento abdominal. Essas diferenças fenotípicas (Figura 1.7) junto ao fato das duas formas serem encontradas em condições ecológicas distintas levaram o autor a propor que *Lu. longipalpis* pudesse ser um complexo de espécies.

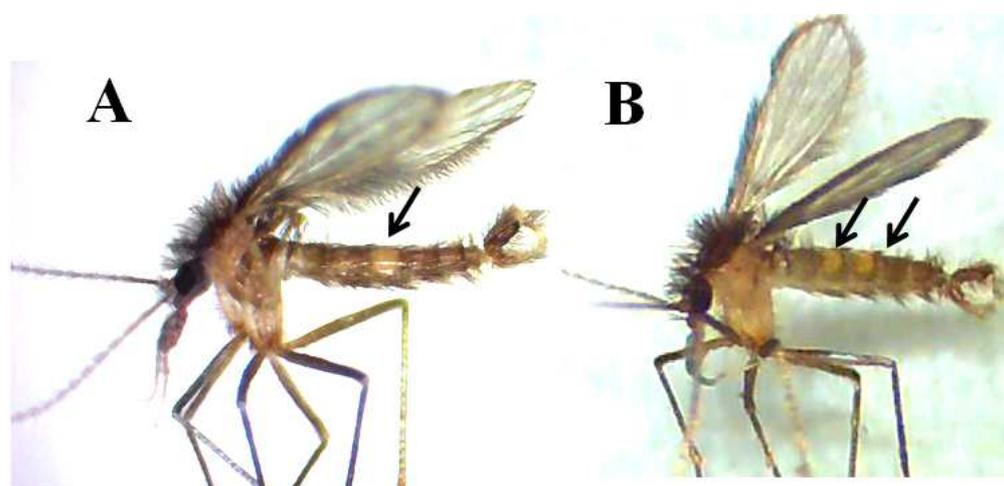


Figura 1.7: Machos de *Lutzomyia longipalpis* com um par de pintas (A) e dois pares de pintas (B) nos tergitos abdominais. Fonte: Gonzalez 2013

Desde então vários estudos apontam diferenças morfológicas entre as populações deste complexo. Em 2008, Souza e colaboradores, realizaram novos experimentos de cruzamento entre populações alopátricas, de insetos oriundos de Lapinha (MG), Sobral (CE) e Natal (RN), como também entre populações simpátricas de Sobral (CE), e seus resultados mostraram que as pintas não poderiam ser utilizadas como caráter de diferenciação taxonômica. Porém, foi visto que o fenótipo de pintas poderia ser útil para distinguir duas espécies simpátricas no complexo *Lutzomyia longipalpis*. Situação verificada em Sobral (CE), onde coexistem populações com machos apresentando ambos os tipos (1S e 2S), no entanto, uma população está isolada reprodutivamente da outra (Ward 1983, 1988; Souza et al. 2008). Estudos em outros países comparando amostras da América Central com a América do Sul também

sugeriram que *Lu. longipalpis* seja um complexo de espécies (Lanzaro 1993; Arrivillaga 2003).

Marcadores moleculares, também foram utilizados para a diferenciação entre as populações destes flebotomíneos, utilizando uma sequência do gene *period* (*per*), homólogo ao gene de especiação de *Drosophila*. Bauzer et al (2002a e 2002b) estudaram populações de *Lu. longipalpis*, simpátricas e alopátricas, de diferentes localidades e observaram que estas apresentaram diferenciações genéticas (Bauzer et al.2002c).

Diversas vertentes de estudos sustentam as idéias sobre a existência ou não de mais de uma espécie entre as populações brasileiras de *Lu. longipalpis*. Segundo alguns autores, em análises de isoenzimas e de genes mitocondriais não foram detectados um grau de divergência suficiente que suporte a separação taxonômica entre as populações (Mukhopadhyay 1998; Mutebi 1999; Azevedo 2000). No entanto, outras pesquisas utilizando diferentes tipos de análises, incluindo marcadores moleculares (genes envolvidos com o comportamento sexual e microssatélites) como sinais acústicos, indicam a possibilidade de separação de espécie (Souza et al. 2004; Maingon et al. 2003, 2008; Bauzer et al. 2007; Souza et al. 2008; Lins et al. 2008; Araki et al. 2009; Vigoder et al. 2010, 2015).

Outros aspectos também são utilizados para diferenciar populações de *Lu. longipalpis*, como os sons de cópulas e os feromônios sexuais produzidos pelos espécimes machos (Vigoder et al. 2010). Esses estudos mostraram diferenças que poderiam apontar uma separação entre as populações desses insetos.

1.8- Leishmanioses e seus reservatórios

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

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

As investigações com mamíferos para identificar possíveis reservatórios de *Leishmania* vêm sendo desenvolvidas desde as primeiras décadas do século XX e muitos relatos têm sido documentados, como a presença de *Leishmania* em roedores silvestres, marsupiais, edentados e canídeos silvestres (Nery Guimarães et al., 1968; Sherlock et al., 1984; Oliveira et al., 2005; Quaresma et al., 2011).

As primeiras evidências da atuação de canídeos domésticos e silvestres como reservatórios dos agentes etiológicos de *Leishmania* no Continente Americano, iniciaram-se pelo diagnóstico de infecção natural por *Le. (L.) infantum* em *Canis familiaris* e *Dusicyon vetulus*. Este último, depois foi verificado tratar-se de *Cerdocyon thous* (Deane e Deane, 1955, 1962; Courtenay et al. 1996, 2002).

Seguiram-se, então, outros achados de animais desta ordem naturalmente infectados no Brasil: *Cerdocyon thous*, “lobinho” (Lainson et al., 1969; Silveira et al., 1982; Courtenay et al.; 1996; Silva et al., 2000; Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008), *Speothos venaticus*, “cachorro-vinagre” (Figueireido et al. 2008; Luppi et al., 2008), *Lycalopex vetulus*, “raposinha do campo” e *Chrysocyon brachyurus*, “lobo-guará” (Luppi et al., 2008).

Várias espécies de roedores silvestres também já foram encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania*, dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, em ambiente silvestre no Continente Americano, com detecção de parasitos com preferência por células cutâneas (Forattini et al., 1960; 1973; Lainson e Shaw, 1969; Falqueto et al., 1985; Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005) ou por órgãos viscerais (Travi et al., 1998; Oliveira et al., 2005).

Marsupiais são considerados reservatórios silvestres não canídeos de *Leishmania (Leishmania) infantum*, a partir do isolamento e caracterização do parasito em *Didelphis albiventris* na Bahia (Sherlock et al., 1984) e, posteriormente, em *D. aurita* no Rio de Janeiro, em Barra de Guaratiba (Carreira et al. 2012). Bem como hospedeiros naturais, de outras espécies de *Leishmania*, causadoras de lesões tegumentares (Arias

et al., 1981; Arias e Naiff, 1981; Brandão-Filho et al., 2003; Dedet et al., 1989; Lainson et al., 1981; Sherlock et al., 1988; Schallig et al., 2007; Van Wynsberghe et al., 2009).

Os carnívoros domésticos (caninos e felinos) e perissodáctilos (*Equus asinus*, *Equus caballus* e muares, híbridos de *E. caballus* e *E. asinus*) também demonstram lesões tegumentares causadas *L. (V.) braziliensis*, mas por não serem capazes de manter o ciclo epidemiológico em um ecótopo, são considerados hospedeiros secundários ou acidentais (Pessoa e Barreto, 1948 apud Falqueto e Ferreira, 2005; Lainson e Shaw, 1998; Madeira et al., 2003; Schubach et al., 2004; MS, 2007).

Também foram relatadas infecções ocasionais por *L. (L.) amazonensis* em caninos (Tolezano et al., 2007) e felinos (De-Souza et al., 2005), em São Paulo, e infecção mista por *Le. (L.) infantum* e *Le. (V.) braziliensis* em canino no Rio de Janeiro (Madeira et al., 2006).

Relatos mais recentes ocorreram em regiões endêmicas para LV no Rio de Janeiro (Barra de Guaratiba) em felinos domésticos (Silva et al., 2008) e em Mato Grosso (Cuiabá) em felídeos cativos, *Puma concolor*, “suçuarana” e *Panthera onca*, “onça-pintada” (Dahroug et al., 2010), sugerindo a participação destes mamíferos na cadeia de transmissão deste agente, porém, mais estudos são necessários para afirmar tal hipótese.

1.9 – Diagnóstico molecular de infecção por *Leishmania spp.*

Os flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e a identificação correta da *Leishmania* infectando uma determinada espécie são de importância no estudo epidemiológico e vetorial da leishmaniose (Tesh *et al.* 1984; Killick-Kendrick 1990) e também na adoção de medidas de prevenção e controle desta parasitose.

O método mais comum para investigar a infecção em flebotomíneos é a dissecação do trato digestivo do inseto e o exame do parasito *in loco*, seguido do exame microscópico direto entre lâmina e lamínula. Neste caso, a positividade das amostras deve ser confirmada das seguintes formas: com o isolamento do parasito em meio de cultura, frequentemente susceptível à contaminação, ou por meio de inoculação em animais de laboratório. Tal confirmação é essencial, uma vez que os flebotomíneos são também hospedeiros de outros flagelados, tais como espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, os quais passam por um estágio de promastigota indistinguível das

leishmânias, dificultando o diagnóstico microscópico e o isolamento em cultura (Rodríguez *et al.* 1994; Tesh & Modi, 1984). Entretanto, deve ser ressaltado que a prevalência de *Leishmania* no vetor é geralmente baixa (<1%) e sua estimativa requer a dissecação de um grande número de flebotomíneos (Martín-Sánchez *et al.* 2006 Tesh *et al.* 1984; Miranda *et al.* 2002; Galati, 1996). Além de consumir muito tempo, requer grande habilidade técnica, devido principalmente ao tamanho reduzido dos flebotomíneos (Rodríguez *et al.* 1994; Tesh & Modi 1984 Oliveira-Pereira *et al.* 2006).

Considerando essas limitações na identificação, da década de 80 em diante, técnicas de biologia molecular vêm sendo desenvolvidas para a detecção e identificação precisa desses parasitos, seja em amostras clínicas humanas, isolamento em cultura, em flebotomíneos, e em amostra de tecido ou sangue de mamíferos (Michalsky *et al.*, 2002; Quaresma *et al.*, 2009; Margonari *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Quaresma *et al.*, 2011; Saraiva *et al.*, 2010).

Com o intuito de se aferir a real frequência do encontro de flebotomíneos naturalmente infectados, outras estratégias foram introduzidas. O uso de anticorpos monoclonais específicos em radioimunoensaio e em ensaios de imunofluorescência indireta mostrou ser um teste rápido para a identificação imediata da espécie de *Leishmania* que está infectando o vetor, e a possibilidade da avaliação simultânea de um grande número de exemplares de flebotomíneos (Adini *et al.* 1998). Intensas pesquisas foram feitas para obter marcadores genéticos apropriados na identificação de *Leishmania* (Guevara *et al.* 1992; Ellis & Crampton, 1988). Sondas moleculares específicas baseadas no DNA do cinetoplasto, ou kDNA de *Leishmania*, foram usadas em ensaios de hibridização para a detecção e identificação de parasitos em vetores flebotomíneos (Ready *et al.* 1988).

Os primeiros trabalhos de aplicação da PCR com flebotomíneos foram descritos no Novo Mundo (de Bruijn & Barker 1992) e na Índia (Mukherjee *et al.* 1997). A tecnologia de PCR representa um método alternativo para a detecção e identificação de *Leishmania spp* em estudos de campo, que visam avaliar a competência vetorial de flebotomíneos e tem revelado valores distintos de sensibilidade e especificidade (Rodríguez *et al.* 1999; Silva & Grunewald 1999; Aransay *et al.* 2000; Córdoba-Lanús *et al.* 2006; Paiva *et al.* 2006; Pita-Pereira *et al.* 2008, 2009; Marcondes *et al.* 2009). Amostras entomológicas provenientes de distintas regiões geográficas têm sido

analisadas por meio da técnica da PCR, porém, outros métodos se fazem necessários para a posterior caracterização molecular das espécies de *Leishmania* detectadas nos flebotomíneos. Assim, produtos amplificados contendo DNA de *Leishmania* podem ser submetidos a diversos procedimentos para genotipagem molecular do parasito, tais como, as análises de polimorfismos de tamanho dos fragmentos obtidos por enzimas de restrição (RFLPs), hibridização com sondas específicas para subgênero/complexo/espécie, sequenciamento ou até mesmo a realização de um segundo ensaio de PCR com iniciadores espécie-específicos (Azizi *et al.* 2006; Pita-Pereira *et al.* 2005; Jorquera *et al.* 2005; Martin-Sánchez *et al.* 2006).

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

1.10 Avaliação da fonte alimentar em flebotomíneos

O conhecimento do padrão alimentar dos insetos hematófagos é de grande importância para o entendimento de sua biologia, além de possuir valor fundamental para a Saúde Pública, é uma informação importante para o estabelecimento de estratégias de controle de vários agravos transmitidos por esses insetos (Ngumbi *et al.*, 1992; Savage *et al.*, 1993; Duarte, 1997).

Através dos estudos de fonte alimentar, o comportamento dos insetos hematófagos torna-se possível. Principalmente quando esses se encontram sob circunstâncias variadas, uma vez que já foi observado que tal comportamento pode se modificar, segundo as alterações do meio e de acordo com a oferta alimentar existente (Bheham & Garret-Jones 1973, Duarte 1997).

Métodos imunológicos, como de precipitação e imunoenzimáticos, assim como outros (cristalização da hemoglobina, cortes histológicos, PCR) já foram utilizados para a identificação de fontes de alimentação nos insetos (Dias *et al.*, 2003; Afonso *et al.*, 2012). Técnicas sorológicas como ELISA são usadas (Bongiorno *et al.*, 2003; Afonso *et al.*, 2012), mas recentemente, sendo substituídos por ferramentas moleculares de maior precisão (Mukabana *et al.*, 2002; Haouas *et al.*, 2007; Kent, 2009; Maleki-Ravasan *et*

al., 2009). O sequenciamento do DNA tem sido amplamente usado para estudar as preferências sanguíneas dos flebotomíneos e de outros vetores, como mosquitos ou carrapatos (Kirstein & Gray, 1996; Danabalan et al., 2014). Deste modo, diferentes alvos moleculares têm sido empregados para identificar a origem do repasto sanguíneo de insetos vetores, tais como, citocromo b (*cyt*), citocromo oxidase I (*COI*) e prepronociceptina (*PNO*) (Kocher et al., 1989; Haoaus et al., 2007; Abassi et al., 2009; Penã et al., 2012; Anaguano et al., 2015)

1.11 Educação em Saúde

A educação em saúde é um conjunto de saberes e práticas direcionados para a prevenção de doenças e promoção da saúde (Costa & López, 1996 in Alves 2005). É a utilização de um recurso que o conhecimento cientificamente produz no campo da saúde, intermediado pelos profissionais de saúde, que atinge a vida cotidiana das pessoas, uma vez que a compreensão das etapas do processo saúde-doença oferece subsídios para a aquisição de novos hábitos e condutas de saúde (Alves 2005).

A educação em saúde tradicional, inicialmente chamada de Educação Sanitária, surge no Brasil a partir da necessidade do Estado brasileiro de controlar as epidemias de doenças infecto-contagiosas que ameaçavam a economia agroexportadora do país durante a República Velha, no começo do século XX. Nesse período a população brasileira era atingida por doenças como a varíola, febre amarela, tuberculose e sífilis, que estavam relacionadas às péssimas condições sanitárias e socio-econômicas em que o povo vivia (Kwamoto, 1995; Andrade 2001 in Dias & Marjorie, 2009).

A população, nesse período, não era persuadida ou sensibilizada sobre os benefícios da vacina ou sobre higiene, ela tinha que acatar as ordens. Os lares e os corpos eram violados para se fazer a vacina obrigatória, sem respeito aos valores de ordem moral da população, já que as mulheres e os filhos ficavam sozinhos em casa enquanto o marido estava no trabalho e o lar era invadido por estranhos (Carvalho, 2004 in Dias & Marjorie, 2009)

A Educação Popular em Saúde constitui-se como um processo de formação e capacitação que se dá dentro de uma perspectiva política de classe e que faz parte ou se vincula à ação organizada do povo para alcançar o objetivo de construir uma

sociedade nova de acordo com seus interesses. Ela é caracterizada como a teoria a partir da prática e não a teoria sobre a prática como ocorre na educação em saúde tradicional (Hurtado, 2007 in Dias & Marjorie, 2009)

Esse modelo de educação em saúde tem por objetivo o diálogo bi-direcional entre as duas partes envolvidas no processo educativo, profissional de saúde e comunidade (Alvez, 2005).

Por essas características percebe-se que esse modelo se enquadra às demandas do atual sistema de saúde, o SUS, uma vez que essas características coincidem com as diretrizes desse sistema, como o controle social e a autonomia (Dias & Marjorie, 2009).

A educação em saúde é um campo multifacetado, para o qual convergem diversos conceitos, das áreas tanto da educação, quanto da saúde, as quais espelham diferentes compreensões do mundo, demarcadas por distintas posições político-filosóficas sobre o homem e a sociedade. Uma educação em saúde ampliada inclui políticas públicas, ambientes apropriados e reorientação dos serviços de saúde para além dos tratamentos clínicos e curativos, assim como propostas pedagógicas libertadoras, comprometidas com o desenvolvimento da solidariedade e da cidadania, orientando-se para ações cuja essência está na melhoria da qualidade de vida e na 'promoção do homem' (Shall & Struchiner, 1999)

2- JUSTIFICATIVA

Este estudo faz parte do Plano Brasil sem Miséria, programa do Governo Federal, criado para superar a extrema pobreza no país, tendo em vista que a pobreza não se resume a uma questão de renda. Também se manifestando na segurança alimentar e nutricional, educação, saúde, acesso a água e energia elétrica, moradia, qualificação profissional e melhora da inserção no mundo do trabalho (MDS 2015).

Dentro dos objetivos estipulados por esse programa, nosso estudo se encaixa na articulação e geração de conhecimentos com a elaboração de propostas para aplicação de medidas sociais e educacionais capazes de atender o público do Plano Brasil Sem Miséria, com especial atenção às doenças associada à pobreza – Leishmanioses.

As leishmanioses, considerada um conjunto de doenças tropicais, e sendo as mais negligenciadas no mundo, estão associadas à pobreza e a fatores ecológicos, que podem aumentar o risco de transmissão do parasito neste meio.

Estão relacionadas entre as doenças mais complexas e diversas transmitidas por vetores, sua ecologia e epidemiologia, engloba diversas espécies de reservatórios, diferentes espécies de flebotomíneos vetores e parasitos.

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma zoonose, em franca expansão, e uma doença multifatorial quanto ao risco (habitação, dieta, antecedentes genéticos, etc). Além disso, em comunidades periurbanas marginais onde a associação com animais domésticos, principalmente os cães, pode estar relacionado à proximidade da mata e animais sinantrópicos certamente ampliam essas probabilidades (Bern. et al. 2005; Bern et al. 2000; Alexander et al. 2002; Reithinger et al. 2003; Oliveira et al. 2013). O mesmo se aplica a leishmaniose tegumentar, onde animais silvestres e sinantrópicos atuam como reservatórios do parasito ampliando a incidência nestas comunidades (Herwaldt, 1999; Oliveira et al. 2003).

A LV canina coexiste com a LV humana em todos os focos conhecidos e ela precede a ocorrência de casos humanos (Kumar et al. 1999; Barnett et al. 2005; Bern et al. 2005). Neste caso, o cão doméstico, principal fonte de infecção, pode apresentar alto parasitismo cutâneo o que facilita a infecção dos flebotomíneos (Thakur 2000; Adhikari & Maskay 2003), exercendo papel fundamental na introdução da doença em áreas novas (Badaro et al. 1986; Anoop Sharma et al. 2006)

Hoje, nos municípios de Niterói e Maricá (RJ), a área mais afetada pela LV canina está situada junto à encosta do Parque Estadual da Serra da Tiririca. O Parque (PESET) inserido entre estes dois municípios, representa uma das poucas áreas com resíduos de mata atlântica tão próxima da área urbana. Área de preservação recentemente criada, por movimentação da própria população, devido a grande especulação imobiliária. Dentro desta área de preservação, encontrou-se pequenas comunidades inseridas e a população ali residente, mantem-se de pequenas plantações, de recursos naturais da própria reserva e também de pequenas criações mantidas no peridomicílio, como criação de galinha, porcos e outros. Além de possuírem animais domésticos, como cães, que interagem com animais sinantrópicos próprios da região. Esses fatores chamam a atenção para o estudo das Leishmanioses na área, na tentativa de elucidar o ciclo de transmissão do parasito e a relação dos fatores ecológicos, dos flebotomíneos, reservatórios e seres humanos que ali convivem.

3- OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Avaliar os aspectos das leishmanioses e o papel epidemiológico dos flebotomíneos em relação às leishmanioses em comunidades carentes da área do Parque Estadual da Serra da Tiririca em Niterói e Maricá, RJ, através da pesquisa da fonte alimentar, infecção natural e avaliação dos animais domésticos e sinantrópicos da região.

3.2 – Objetivos Específicos

- Levantamento das espécies de flebotomíneos em áreas modificadas e não modificadas no Parque Estadual da Serra da Tiririca, ampliando resultados obtidos anteriormente (mestrado);
- Pesquisa de infecção natural por *Leishmania spp.* nas fêmeas de flebotomíneos, capturados nas áreas modificadas (área de comunidade) e área não modificada;
- Pesquisa de infecção por *Leishmania spp.* em animais silvestres e sinantrópicos (pequenos mamíferos);
- Pesquisa da fonte alimentar de fêmeas de flebotomíneos, capturadas nas áreas modificadas (área de comunidade) e área não modificada;
- Educação em Saúde - Esclarecimentos sobre as Leishmanioses, para as comunidades/escolas locais, através de palestras e oficinas;

4– MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Estudo de Área – Parque Estadual da Serra da Tiririca

A Serra da Tiririca¹ está inserida entre os municípios de Niterói e Maricá no estado do Rio de Janeiro (22°48'; 23°00' S e 42°57'; 43°02' W) (Fig. 4.1), na porção litorânea da Serra do Mar. Em Niterói localiza-se nos bairros do Engenho do Mato, Itaipu, Itacoatiara, Várzea das Moças e em Maricá, pertencentes ao Distrito de Inoã (Barros, 2008). É formada por um conjunto de montanhas com altitude média aproximada em torno de 250 m. Apresenta sete Morros: Telégrafo (387 m), Alto Mourão (412 m), Catumbi (344 m), Serrinha (277 m), Cordovil (256 m), Costão de Itacoatiara (217 m) e Penha (128 m) que constituem o Parque Estadual da Serra da Tiririca (PEST) (Fig. 4.2) (Barros & Seoane, 1999 apud Barros, 2008). Recentemente, em 2008, foi incluído na área do Parque o Morro das Andorinhas (196 m) e parte do entorno da laguna de Itaipu.

O Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET) foi criado pela Lei Estadual nº. 1.901, de 29 de novembro de 1991 (das Unidades de Conservação da região metropolitana do Rio de Janeiro, o PESET é o único que nasceu da vontade popular, por meios de movimentos comunitários organizados). Essa medida teve o intuito de proteger remanescentes da Mata Atlântica que se encontravam extremamente ameaçados pela especulação imobiliária, entre outras formas de atividades antrópicas (Barros, 2008). O Parque teve os limites provisórios descritos pelo Decreto Estadual nº. 18.598, de 19 de abril de 1993. Publicado em Diário Oficial, no dia 17/04/2008, sua ampliação através do Decreto nº. 41.266, com uma área de 2.260 hectares. Recentemente, o parque recebeu mais uma ampliação pelo Decreto Estadual nº 43.913, de 29 de outubro de 2012, com a inclusão de 1.241 hectares. Totalizando uma área de aproximadamente 3.493 hectares. (<http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/BIODIVERSIDADEEAREASPROTEGIDAS/UnidadesdeConservacao>) (Fig. 4.3).

¹ O nome Tiririca está relacionado com a passagem de tropas de burro que atravessavam a Serra em direção a Região dos Lagos por um caminho cheio de tiriricas. Tiriricas são plantas do gênero *Cyperus* (família Cyperaceae), comumente encontradas em áreas desmatadas, como beiras de caminho (BARROS & SEOANE, 1999 apud BARROS, 2008).

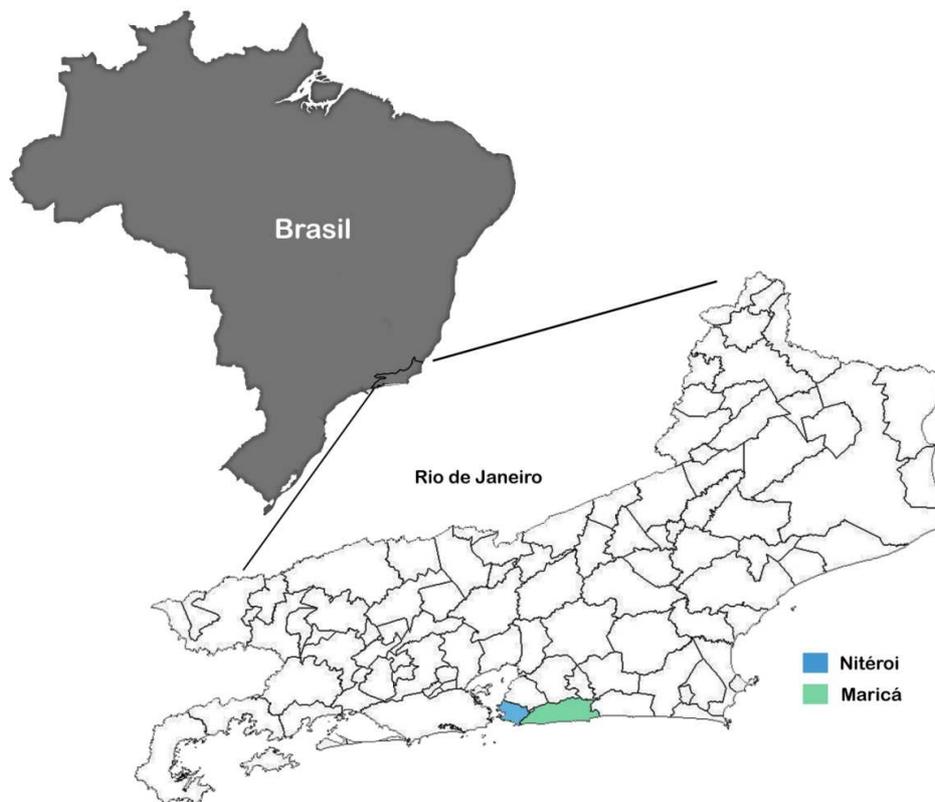


Figura 4.1 – Mapa da divisão do Estado do Rio de Janeiro em municípios. Os municípios em destaque representam as áreas onde foi realizado o trabalho. Fonte: Fuzari, 2013.



Figura 4.2 - Foto aérea do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ mostrando, em especial, o Morro do Telégrafo, Morro do Elefante e o Alto Mourão ao fundo (SEMADS 2001). Fonte: BARROS, 2008

Na região, a formação florestal ocorre entre 50 e 500m de altitude, sendo classificada por Veloso *et al.* (1991) como floresta ombrófila densa submontana. As regiões mais degradadas são encontradas nas áreas com até 150m. Ocorre também vegetação de afloramentos rochosos, e grande parte da fisionomia desses ambientes é constituída por plantas das famílias Bromeliaceae e Cactaceae (Barros, 2008). Sua geomorfologia é similar ao relevo característico do litoral do Rio de Janeiro, com costões de granito-gnáissicos alternados com as planícies arenosas holocênicas de origem marinha-continental.

O clima da região é influenciado pela presença das massas de ar Equatorial Continental no verão e Tropical Atlântico durante o restante do ano, além da passagem freqüente de frentes polares, principalmente durante a primavera. É enquadrado na zona climática das planícies e maciços costeiros com precipitação média entre 1.000 e 1.500 mm/ano (Barbière & Coe-Neto 1999). Segundo esses mesmos autores, na área dos maciços costeiros a quantidade de chuva aumenta gradualmente na direção Sudeste-Nordeste, principalmente para regiões mais interioranas, onde ocorrem os primeiros sinais do clima tropical (http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/BIODIVERSIDADEEAREASPROTEGIDAS/UnidadesdeConservacao/INEA_008600#/PlanodeManejo).

A área do presente estudo se insere justamente na transição pluviométrica entre a planície costeira e o maciço costeiro. O clima é quente e úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno (maio e junho). A estação chuvosa inicia-se na primavera, culminando no verão nos meses de dezembro e janeiro, quando ocorre intensa precipitação pluviométrica. Em fevereiro há uma queda no volume das chuvas. Contudo em março, devido à chegada de massas frias, registram-se chuvas intensas. A menor precipitação se dá nos meses de julho e agosto, quando fica abaixo de 60mm. A temperatura média está em torno de 23°C, sendo janeiro e fevereiro os meses mais quentes e o mais frio em junho. O vento predominante é o nordeste (Bernardes, 1952; http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/BIODIVERSIDADEEAREASPROTEGIDAS/UnidadesdeConservacao/INEA_008600#/PlanodeManejo).

O Parque Estadual da Serra da Tiririca possui uma Sede Administrativa, localizada em Itaipuaçu, dotada de auditório, laboratório para pesquisadores e Núcleo de Prevenção a Incêndios Florestais - NuPIF. A sub-sede, localizada em Itacoatiara,

conta com Centro de Recepção aos visitantes (cerca de 60.000 por ano) que percorrem as trilhas abertas ao turismo, hoje considerado um pólo de ecoturismo e lazer de Niterói e Maricá. Com 3.493 hectares, o parque tem como objetivos básicos: manter e proteger a biodiversidade e os recursos genéticos do território; promover a sustentabilidade do entorno para o uso dos recursos naturais, estimulando o desenvolvimento integrado da região com auxílio da educação ambiental; preservar e conservar o sistema hidrográfico local, bem como favorecer a recarga natural do lençol freático; contribuir com a amenização climática; minimizar os riscos de erosão na região onde está inserido proteger todas as espécies vegetais e animais, bem como os ecossistemas a que pertencem, as belezas cênicas das paisagens, monumentos naturais, sítios arqueológicos e outros ativos culturais; estimular e auxiliar as pesquisas científicas do patrimônio natural, material e imaterial e favorecer o uso recreativo e cultural do parque, de forma adequada, pela sociedade (<http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/BIODIVERSIDADEEAREASPROTEGIDAS/UnidadesdeConservacao>).

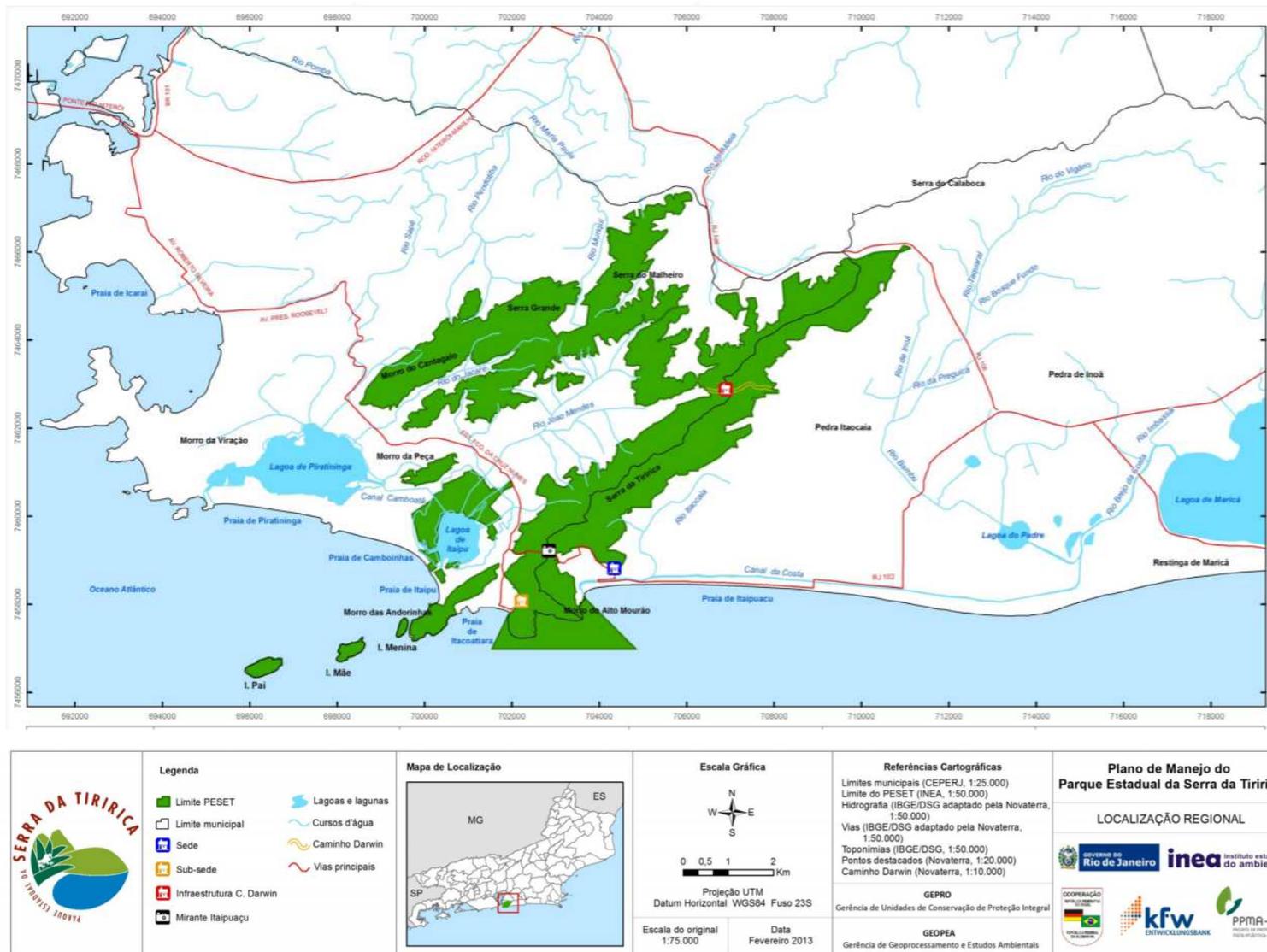


Figura 4.3: - Localização regional do PESET e principais vias de acesso à UC. Fonte: Plano de manejo PESET



Figura 4.4 - Diferentes localidades do Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET), Niterói e Maricá, RJ. A. Morro do Alto Mourão – vista da estrada sentido Maricá - Niterói; B. Alto Mourão - Pedra do Elefante, Itacoatiara, Niterói; C. Mirante de Itaipuaçu – vista da baixada litorânea de Maricá e praia de Itaipuaçu; D. Mirante do Alto Mourão – vista das praias oceânicas de Niterói e das Lagoas de Itaipu e Piratininga; E. Sede Administrativa do PESET, Itaipuaçu, Maricá; F. Posto de recepção ao visitante, Itacoatiara, Niterói.

4.2- Captura e montagem de Flebotomíneos

As capturas dos flebotomíneos foram realizadas no período de junho de 2013 a abril de 2016, em média, uma vez ao mês. Para a coleta dos insetos foram utilizadas armadilhas luminosas HP alimentadas com baterias de 6 Volts cada (Pugedo et al 2005). Esta armadilha é uma variação da armadilha luminosa CDC - Center on Disease Control) desenvolvida por Sudia & Chamberlain (1962).

As armadilhas CDC, modelo HP, foram adaptadas para serem usadas com potes de plástico (capacidade 200 mL) ao invés das gaiolas de pano. Os potes plásticos contendo álcool a 80%, eram presos à armadilha por um pedaço (20 cm) de meia fina de seda fixada por elásticos de borracha na base da armadilha. Assim, os insetos eram atraídos pela luz, sugados pela ventilação e caíam direto no álcool (Fuzari et al. 2013) (Fig.4.6). Esta modificação visou preservar os insetos para a montagem e posterior identificação. No presente estudo, foram utilizadas 34 armadilhas modelo HP, 22 distribuídas em quatro áreas de acordo com tabelas (Tabelas 4.1 e 4.2).

A área 1, um sítio localizado dentro da área do parque, localidade denominada de Mirante, pois o acesso ao sítio fica próximo ao Mirante da estrada que liga Niterói a Maricá (Estr. de Itaipuaçu). (Fig. 4.7) Nesta área, encontramos um ambiente de mata e também um ambiente peridomiciliar, como uma residência, plantações, animais domésticos e seus anexos.

A área 2, um ambiente de mata, na subsele do parque, em Itacoatiara. Nesta localização, encontram-se a maioria das trilhas abertas ao público e ao turismo do Parque Estadual da Serra da Tiririca. Entretanto, para o nosso estudo, escolhemos o lado da mata que não possuía trilhas abertas, tentando reduzir ao mínimo o efeito das alterações e influência antrópicas. (Fig. 4.7)

Na área 3, foram selecionados ambientes de peridomicílio em três “residências”, essas não possuíam uma demarcação de limites, ou seja, uma divisão do terreno. Também encontramos animais domésticos soltos, anexos, poucas plantações, árvores frutíferas, muito lixo e entulhos acumulados. Todos esses ambientes estão limítrofes com a área de conservação do parque. Esta área contempla casas dos bairros de Engenho do Mato (localidades conhecidas como Mangueirão e Quilombo do Grotão) e Itaipú (Vale Feliz). (Fig. 4.7)

A área 4, localiza-se no Morro das Andorinhas, onde foram escolhidas 6 residências, sendo apenas uma fora dos limites da área de parque. Nesta localidade, também observamos algumas plantações, animais domésticos, anexos (como galinheiros), lixo e entulhos acumulados. (Fig. 4.7)

Na tabela 4.2, segue descrição das áreas trabalhadas, suas localidades e o ambiente, com seus respectivos pontos (cada ponto de coleta foi utilizada uma armadilha) e anotado as coordenadas geográficas.

As armadilhas foram instaladas durante o dia (a partir das 10h) e retiradas a partir das 10h após dois dias, permanecendo ligadas no ambiente por, no mínimo, 48 horas (tabela 4.1). Durante todas as coletas, no momento de instalação e retirada das armadilhas, foram anotados alguns dados específicos, como: hora, temperatura, umidade relativa do ar e observações do local e do clima. Para a medição de temperatura e umidade foi utilizado um termohigrômetro (Instrutemp – Instrumentos de medição).

Durante as coletas de pequenos mamíferos, foram instaladas duas armadilhas HP por trilha (uma no início e outra no final de cada trilha), que permaneceram em atividade por 4 dias. Toda manhã, no momento da vistoria das armadilhas de mamíferos, as HP's eram também vistoriadas e se houvesse necessidade, trocava-se os potes ou completava-se com álcool. Totalizando 12 armadilhas por coleta.



Figura 4.5 – Fotos das armadilhas luminosas modificadas: A – armadilha instalada na mata do ponto 1 (Itaipuaçu); B – armadilha instalada no galinheiro (ponto 5) da residência em Itaipu.

Tabela 4.1: Descrição dos períodos de coletas em cada área de trabalho.

	Período	Total coletas	Número de armadilhas	Total de horas por armadilha
Mirante (Área 1)	nov 2013 a abr 2016	20	4	960
Mata Itacoatiara (Área 2)	jun 2013 a abr 2016	24	3	1152
Peridomicílio (Área 3)	jun 2013 a jun 2014	12	7	576
Morro das Andorinhas (Área 4)	mai 2015 a abr 2016	5	8	240
Trilhas - Coletas Mamíferos	ago 2014 e dez 2015	2	12	96

Após as coletas, os potes com os insetos foram encaminhados para o Laboratório de Doenças Parasitárias – IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro, onde foram submetidos a uma triagem. Cada armadilha foi examinada, sendo retirado todo e qualquer material capturado. Deste, foram selecionados somente os flebotomíneos, espécie de interesse do estudo.

Os flebotomíneos capturados foram montados entre lâmina e lamínula, seguindo técnicas de montagem de rotina do Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos do Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, onde os espécimes serão depositados. Dando prosseguimento ao estudo, as lâminas foram examinadas no microscópio óptico (Biosystems – Medilux, modelo L2000C) para a identificação das espécies de flebotomíneos.

O protocolo utilizado na montagem dos flebotomíneos foi o seguinte: após triagem, os insetos permaneceram, em média, 16 horas no hidróxido de potássio (KOH) a 10%, para clarificação. Para neutralizar o processo de clarificação foram transferidos para ácido acético a 10% por 15 a 20 minutos. Logo após, passaram por uma desidratação seriada: álcool 70% - 10 minutos, álcool 90% - 10 minutos, álcool 95% - 10 minutos e álcool 100% - 10 minutos. Em seguida, colocados no Eugenol por no mínimo 24 horas, para a diafanização das estruturas (Fuzari 2011).

Após finalização do processo acima descrito, cada inseto foi colocado na lâmina sob uma gota de bálsamo do Canadá, e com o auxílio de dois estiletes de pontas finas,

separou-se a cabeça, o tórax e o abdômem dos espécimes fêmeas, a fim de visualizar as espermatecas. Os exemplares machos foram montados inteiros. Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre o exemplar, e a lâmina levada à estufa (37°C) para secagem e após 72 horas, colocou-se esmalte incolor em volta da lamínula para sua impermeabilização (Fig. 4.6)

Tabela 4.2: Áreas trabalhadas, localidades e o ambiente, com descrição de todos os pontos de coletas de flebotomíneos (cada ponto de coleta = 1 armadilha) e suas coordenadas geográficas.

Área	Ambiente	Localidade	Pontos de coletas	Coordenadas geográficas
Área 1	Sítio	Mirante	JHP1	S 22°57'41,07" W 43°10'23,89"
			JHP2	
			JHP3	
			JHP4	
Área 2	Mata	Itacoatiara	SSP1	S 22°58'22.9" O 43°1'33.7"
			SSP2	S 22°58'24.0" O 43°1'33.7"
			SSP3	S 22°58'22.6" O 43°1'34.0"
Área 3	Peridomicílio	Mangueirão (Eng. do Mato)	MP3	S 22°55'38.0"
			MP3EX	O 43°00'05.5"
			MP4	S 22°55'40.0" O 43°00'10.5"
		Quilombo do Grotão	QP5	S 22°56'27.5"
			QP6	O 43°00'19.1"
		Vale Feliz (Itaipu)	VFP7	S 22°56'46.9" O 43°0'52.9"
VFP8	S 22°56'46.8" O 43°0'53.0"			
Área 4	Peridomicílio	Morro da Andorinha	MA1	S 22°58'16.61"
			MAB1	O 43° 2'22.20"
			MA2	S 22°58'17.5" W 43°02'23.8"
			MA3	S 22°58'17.9"
			MAB3	W 43°02'29.5"
			MAB2	S 22°58'17.00" W 43° 2'25.01"
			MA4	S 22°58'18.6"
			MAB4	W 43°02'32.1"

Para identificação em nível de gênero, subgênero e espécie foram utilizados os artigos referentes às descrições de espécies disponíveis na literatura e chave taxonômica de Galati, 2003, 2015.

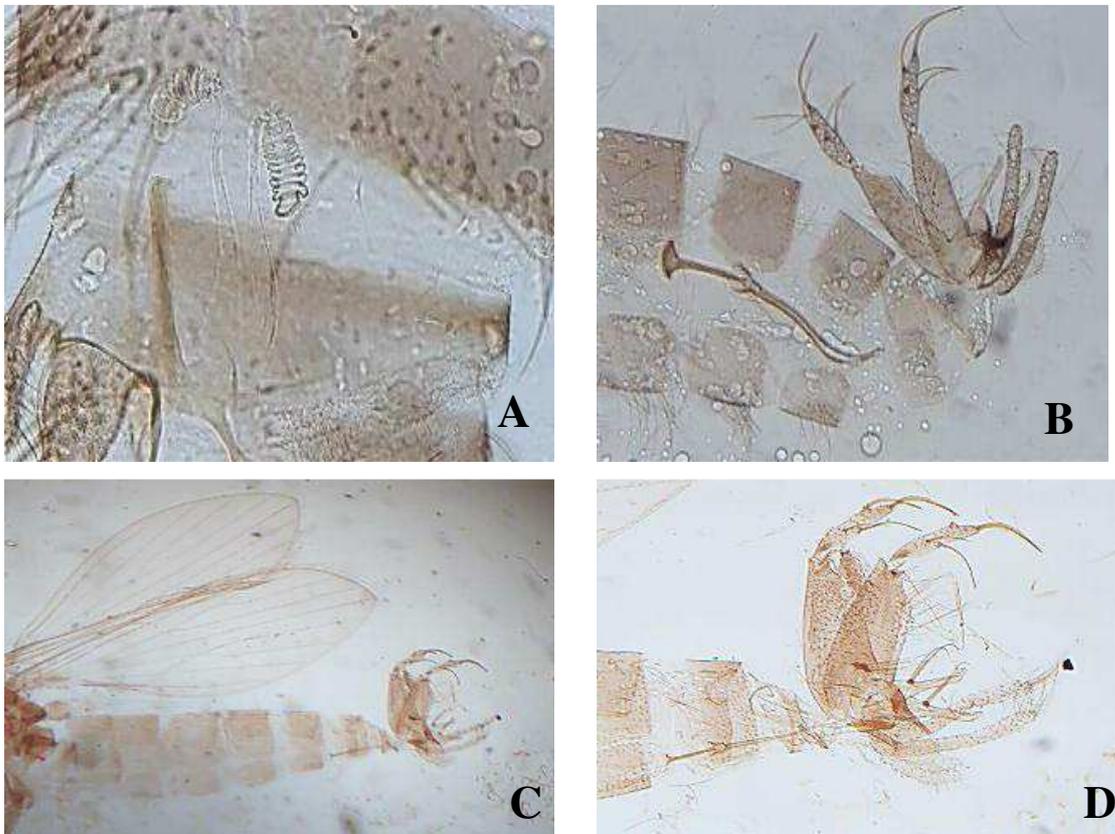


Figura 4.6: Fotos de flebotomíneos montados entre lâmina e lamínula, visualizados ao microscópio óptico. A – Espermateca *Ny. intermedia* (40x) B – Genitália masculina *Ny. intermedia* (10x); C – *Lu. longipalpis* macho (4x); D - Genitália masculina *Lu. longipalpis* (10x).
Fonte: Fuzari, 2011.

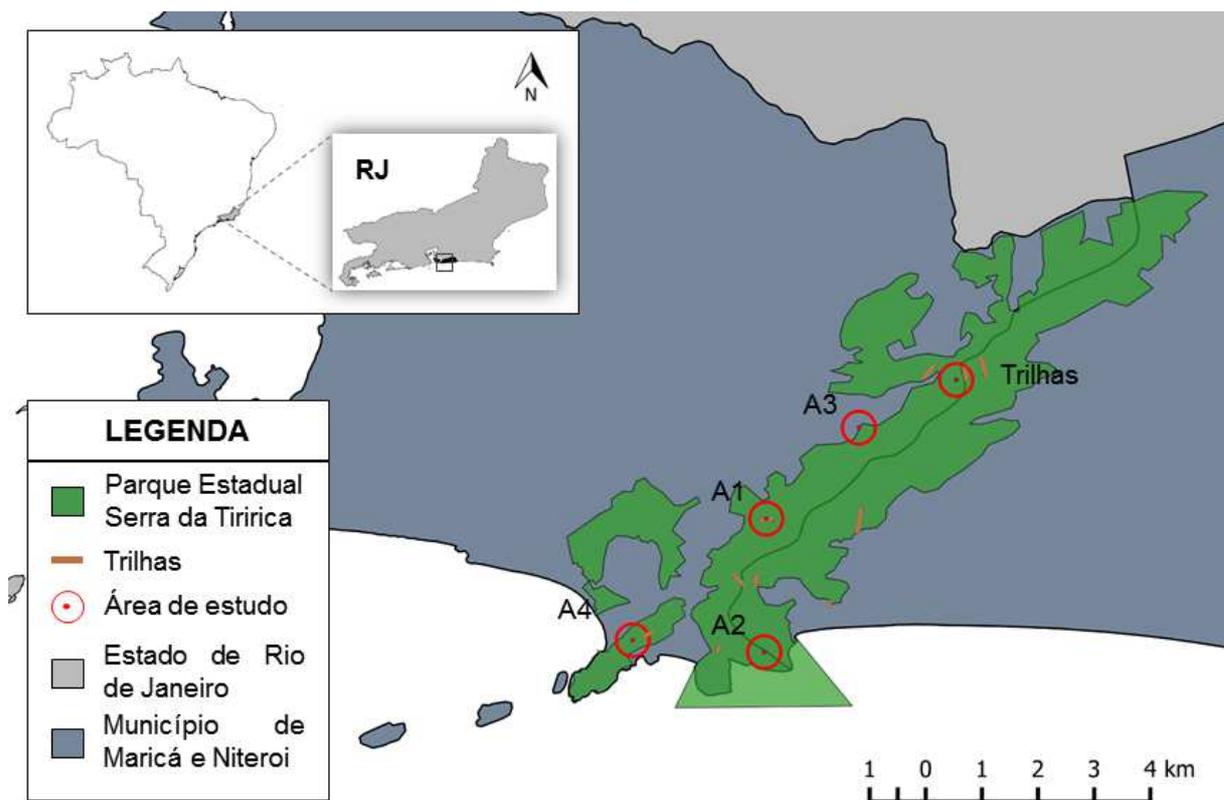


Figura 4.7: Mapa mostrando parte da região do Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET) e as quatro áreas de trabalho em destaque: Área 1 – Mirante de Itapuaçu, Maricá; Área 2 – Subsede do PESET, Itacoatiara, Niterói; Área 3 – Peridomicílio (Engenho do Mato, Quilombo e Itaipú), Niterói; Área 4 – Morro das Andorinhas, Itaipú, Niterói; Trilhas – transectos utilizados nas coletas de pequenos mamíferos, em diferentes localidades.

4.3- Captura de pequenos mamíferos

Para o estudo dos mamíferos, foram estabelecidos 06 transectos lineares com 15 estações de captura ao longo das trilhas, com espaçamento de 20 metros entre cada uma delas. Em cada estação de captura foram dispostas armadilhas do tipo live-trap, uma do modelo Tomahawk® (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) e uma do modelo Sherman® (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm), apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3 Kg. Adicionalmente, em cada trilha, seis pontos tiveram armadilhas estabelecidas no sub-bosque. Nestes pontos apenas uma armadilha de cada tipo foi estabelecida, totalizando então três armadilhas do modelo Sherman e três do modelo Tomahawk. O termo sub-bosque utilizado aqui, refere-se à porção superior das árvores, aonde encontra-se alguma bifurcação de galhos e cipós, e que geralmente fica a altura dos nossos olhos.

Foram dispostas 36 armadilhas por trilha, totalizando 216 armadilhas por coleta. Duas expedições foram realizadas ao longo de 16 meses, uma em agosto/2014 e outra em dezembro/2015, período seco e período chuvoso, respectivamente, sendo que cada expedição teve duração de cinco noites, totalizando um esforço de captura de 1080 armadilhas por expedição.

Em cada armadilha foi utilizada uma isca, que foi composta por uma mistura de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim.

As trilhas foram identificadas por letras sequenciais. Na primeira expedição, foram denominadas trilhas de A a F. Nas trilhas A, B, C e F, foram registrados problemas quanto à questão de segurança, como o sumiço de muitas armadilhas, interferência de algumas pessoas da comunidade local e até mesmo ocorrências policiais, o que nos levou a estabelecer outros transectos na segunda expedição. Para esta, foram denominadas as trilhas D, E, G, H, I e SS (Tabela 4.3).

Os transectos foram percorridos diariamente pela manhã para verificar a presença de animais capturados. Nestas vistorias, foram utilizados equipamentos de biossegurança (máscara e luvas específicas). As armadilhas contendo os animais foram armazenadas em sacos plásticos pretos, fechados e transportados, imediatamente após sua remoção, para a base laboratorial de campo, localizada nas dependências do Parque Estadual da Serra da Tiririca, na primeira expedição. E na segunda expedição, em um local alugado, próximo ao PESET. Nesses laboratórios os animais foram processados e as amostras coletadas segundo normas de biossegurança, onde toda a equipe estava paramentada com equipamentos de nível 3 de segurança (filtros motorizados, máscaras com pressão positiva, e demais acessórios). (Fig. 4.8) dessa maneira, foi garantida a segurança dos membros da equipe de campo contra zoonoses de transmissão por aerossóis.

Na base laboratorial de campo, os animais foram anestesiados, conforme orientação veterinária, e tiveram seus dados coletados (sexo, peso corpóreo e medidas de corpo e cauda), A idade dos animais foi estimada da seguinte forma: nos marsupiais, pelo estágio de desenvolvimento da dentição (condição do terceiro pré-molar e número de molares eclodidos) e nos roedores, pelo peso corpóreo relativo. Dos espécimes capturados foram coletados sangue em papel filtro e coágulos, para estudo de infecção natural por *Leishmania* através de técnicas moleculares. Amostras de baço, fígado e de

tecido (pedaços de orelha e cauda) foram coletados apenas na segunda expedição, para posterior tentativa de isolamento do parasita e análises moleculares, entretanto não fizeram parte dos resultados deste estudo (Fig. 4.8).

Nesta última expedição, investigadores de diferentes projetos e instituições trabalharam em colaboração, no sentido de se aproveitar e ter o máximo rendimento de todo o material ali coletado.

Em alguns animais, foram inseridos chips/anelhas de marcação e soltos novamente no mesmo local de captura, para que na expedição posterior ao serem capturados saber se já haviam sido manipulados. Como exemplo, indivíduos jovens e filhotes, onde a probabilidade de infecção é pequena, e também fêmeas prenhas, para não ter uma baixa populacional (D'Andrea et al., 1994).

A identificação taxonômica dos pequenos mamíferos capturados foi baseada, inicialmente, na morfologia externa. Assim, todos os espécimes foram identificados por gênero, sendo possível apenas para algumas espécies a identificação específica. Na maioria dos indivíduos, a identificação específica, foi realizada através de análise cariotípica e através de cultura de medula óssea e quando necessário complementadas com análise da morfometria craniana. A técnica de cariotipagem visa determinar o número cromossômico diplóide e fundamental, com objetivo de descrever e associar cada complemento cromossômico à espécie confirmando a identificação morfológica. A metodologia é aplicada segundo Bonvicino (2011).

Amostras de fígado foram também fixadas e preservadas em etanol para posteriores estudos moleculares filogenéticos dos animais.

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

Os espécimes coletados serão depositados como material testemunho na coleção temporária do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC/FIOCRUZ e, após o término das análises, depositados na Coleção de Mastozoologia do Museu Nacional/UFRJ (Rio de Janeiro, Brasil).

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

Tabela 4.3: Distribuição dos transectos utilizados nas expedições para captura de pequenos mamíferos, suas localidades e as coordenadas geográficas.

Expedição	Transectos	Local	Ponto inicial		Ponto final	
			S	O	S	O
1	Trilha A	Itaipu	22°57'8,21"	43°1'7,35"	22°57'08.00"	43°1'00.70"
	Trilha B	Eng. do Mato	22°55'45,10"	42°59'25,30"	22°55'38,76"	42°59'19,34"
	Trilha C	Estr. Barrinha/Maricá	22°55'45,90"	42°58'58,90"	22°55'40,60"	42°59'00,39"
	Trilha D	Mirante - Sítio	22°57'45,40"	43°1'18,50"	22°57'41,07"	43°1'23,89"
	Trilha E	Mirante - estrada	22°57'45,65"	43°10'10,73"	22°57'40,75"	43°10'10,57"
	Trilha F	Estr. Barrinha/Maricá	22°55'44.05"	42°58'46.84"	22°55'34.49"	42°58'49.29"
2	Trilha D	Mirante - Sítio	22°57'45,40"	43°1'18,50"	22°57'41,07"	43°1'23,89"
	Trilha E	Mirante - estrada	22°57'45,65"	43°10'10,73"	22°57'40,75"	43°10'10,57"
	Trilha G	Morro das Andorinhas	22°58'15.71"	43° 2'20.29"	22°58'13.58"	43° 2'15.79"
	Trilha H	Sede PESET/Maricá	22°57'57.60"	43° 0'24.70"	22°57'56.41"	43° 0'24.52"
	Trilha I	Haras/Maricá	22°57'15.19"	43° 0'7.17"		
	Trilha SS	Subsede PESET/Itacoatiara	22°58'24.20"	43° 1'34.28"	22°58'22.19"	43° 1'33.20"



Figura 4.8: Atividades realizadas no laboratório montado em campo: A - Triagem e classificação dos mamíferos; B - Manipulação e dissecação de roedor.

4.4- Estudo de Infecção natural por *Leishmania spp.*

Para detecção de *Leishmania spp.*, foram utilizadas como fonte de DNA, as fêmeas de flebotomíneos não ingurgitadas (sem resíduos de sangue em seu abdômen) e amostras de sangue coletas de animais silvestres e sinantrópicos.

A identificação taxonômica das fêmeas de flebotomíneos destinadas à análise de infecção natural, foi realizada através da dissecação da cabeça e dos dois últimos segmentos abdominais, sobre uma gota de solução salina (0,15M) em lâmina de microscopia e com o auxílio de agulhas descartáveis, para visualização do cibário e espermateca, respectivamente, possibilitando a identificação taxonômica no nível de espécie de acordo com Galati (2015). O restante do corpo do inseto foi acondicionado

em microtubos de polipropileno de 1,5 ml (tipo *ependorf*) contendo 100µL de álcool etílico 95% e rotulados de acordo com a área de coleta, espécie e sexo. Os tubos contendo os flebotomíneos foram mantidos à temperatura em torno de 2°C (parte superior da geladeira). Os machos que não foram utilizados como controles negativo passaram pelo processo de clarificação e diafanização, e posterior montagem entre lâmina e lamínula para identificação taxonômica.

As amostras de sangue dos pequenos mamíferos, foram coletadas em papel de filtro (FTA classic card – Whatman), identificadas de acordo com a numeração de identificação de cada animal e armazenados à temperatura de - 4°C.

A detecção e monitoramento da carga parasitária por *Leishmania* spp. nas amostras foi realizada através das estratégias de diagnóstico molecular propostas a seguir. Os flebotomíneos foram analisados individualmente.

4.4.1 - Obtenção do Extrato total dos flebotomíneos

O DNA utilizado na PCR foi obtido a partir de um extrato de amostras individuais de flebotomíneos machos (como controle negativo) e fêmeas, em 100 µL de tampão de lise: 10 mM Tris-HCl pH 9,2 contendo 10 mM de EDTA e 100 µg/mL de proteinase K (USBiological). Os lisados foram mantidos em tubos *Eppendorf*® e incubados (2 a 3 horas, 56 °C) com agitações periódicas. No final da incubação, o material foi centrifugado (9.800g, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante coletado, foi aquecido (15 minutos, 95 °C). Em seguida, as amostras foram mais uma vez centrifugadas (9.800g, 40 segundos, 4 °C) (Miranda et al., 2002). Os volumes das preparações foram ajustados para 200 µL com TE 0,1X e estocadas (- 20 °C) até o momento da extração do DNA total.

4.4.2 - Extração de DNA

A extração de DNA a partir dos lisados de flebotomíneos foi realizada utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega), segundo as especificações do fabricante, e o DNA eluído em 50 µL TE 0,1X foi posteriormente estocado a - 20 °C até o momento de uso. Todas as etapas para a extração de DNA foram monitoradas pela inclusão de amostras controle negativo (insetos machos de colônias de laboratório). A inclusão de machos determina um controle para possíveis

contaminações, pois essas amostras não podem conter DNA de *Leishmania* spp. Os fluxos laminares utilizados, são exclusivos para extração de DNA, assim como todo o material utilizado nesta etapa foram devidamente descontaminados com a utilização de cloro e exposição a raios UV.

4.4.3 - Reação em Cadeia da Polimerase – *Hot-start PCR multiplex*.

Para a PCR foram utilizados dois pares de iniciadores que amplificam simultaneamente na mesma reação, um produto de 120 pb referente ao DNA de *Leishmania* (no caso de amostras de fêmeas positivas) e outro de 220 pb correspondente ao DNA de flebotomíneo (todas as amostras de machos e fêmeas). O primeiro par amplifica a região constante do minicírculo do kDNA; primer A [5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3'] e primer B [5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3'] (Figura 4.9) (Passos et al., 1996); o segundo par amplifica um gene constitutivo específico de flebotomíneos (*cacophony*): 5Llcac [5'GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3'] e 3Llcac [5'CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3'] (LINS et al., 2002). A inclusão deste segundo par de iniciadores (gene *cacophony*) confere a confiabilidade do material extraído, evitando possíveis resultados falso negativos, pois todas as amostras (machos e fêmeas) constituídas por flebotomíneos deveriam amplificar o produto referente a esse alvo.

As reações ocorreram em um volume final de 100 µL, consistindo de solução tampão da PCR 1X (100mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM de KCl - solução PCR 10X, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4,5 mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP (Invitrogen), 0,2 µM de cada primer, 1,25 U Taq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems), 10 µL de DNA e H₂O (ultra pura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e realizada no aparelho modelo Gene Amp® PCR Sytem 9700, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 seg, 94 °C), anelamento (30 seg, 55 °C) e extensão (30 seg, 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (12 min, 94 °C) para ativação da enzima (*Hot Start*) e após os 36 ciclos inclui-se um passo de extensão final (10 min, 72 °C).

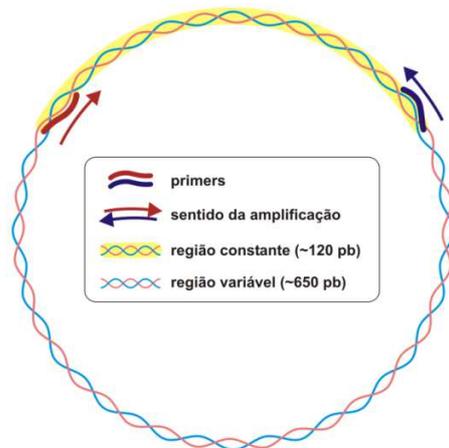


Figura 4.9: Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de *Leishmania* sp. (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação

4.4.4 - Extração de DNA em papel de filtro – Amostras de sangue de mamíferos

A extração de DNA de possíveis reservatórios de *Leishmania* spp. a partir de amostras de sangue coletadas em papel de filtro, foi realizada utilizando o protocolo de Purificação do kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®) segundo as especificações do fabricante, e o DNA eluído em 50 µL TE 0,1X foi posteriormente estocado a - 20 °C até o momento de uso.

4.4.5 - Reação em Cadeia da Polimerase – Amostras de sangue de mamíferos

Utilizou-se a amplificação do gene da β-globina como controle interno da extração o que confere a confiabilidade do material extraído, evitando possíveis resultados falso negativos. Os *primers* utilizados foram PC03 5' [ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC] 3', e PC4 5' [CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC] 3' (Wincker et al. 1994).

As reações ocorreram em um volume final de 100 µL, consistindo de solução tampão da PCR 1X (100mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM de KCl - solução PCR 10X, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4,5 mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP (Invitrogen), 0,2 µM de cada primer, 1,25 U Taq Platinum DNA polimerase (Applied Biosystems), 10 µL de DNA e H₂O (ultra pura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de dois ciclos e realizada no aparelho modelo Gene Amp® PCR Sytem 9700, com a seguinte programação: dois ciclos: desnaturação (1 min, 98 °C), anelamento (2 min, 64 °C) seguido de 38 ciclos:

desnaturação (1 min, 94 °C), anelamento (1 min, 64 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (3 min, 94 °C) para ativação da enzima (*Hot Start*) e após os 38 ciclos foi incluído um passo de extensão final (10 min, 72 °C).

Uma segunda reação de PCR foi realizada, conforme o protocolo já descrito de PCR multiplex, porém utilizou-se apenas o primeiro par de *primers* que amplifica a região constante do minicírculo do kDNA para detecção de *Leishmania* spp.

Em caso de amostras positivas, foi utilizado o protocolo de PCR para identificação de espécies de *Leishmania* seguido de clonagem e sequenciamento.

4.4.6 - Eletroforese em gel de agarose

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal, em géis de agarose (Seakem e NuSieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) a 2,0%, com dimensões de 12,5 x 20 cm, preparados em TBE 1X (0,89 M Tris-HCl; 0,89 M ácido bórico; 0,024M EDTA, pH 8,3 - TBE 10X). Após a imersão do gel solidificado em tampão TBE, alíquotas contendo 10 µL do produto da PCR foram misturadas a 1 µL do tampão de aplicação de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida por 2 horas a 70 V. O peso molecular dos *amplicons* foi determinado pela inclusão nos géis do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder – Invitrogen Life Technologies). O gel é corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain (Sigma®)*. Os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

4.4.7 - Reação em Cadeia da Polimerase – Identificação de espécies de *Leishmania*

Após a confirmação da detecção de *Leishmania* (seja em flebotomíneos ou em sangue de mamíferos), o DNA recuperado foi submetido a um novo ensaio de PCR desta vez direcionado para o alvo de 234 pb do gene *hsp 70 primer forward* 5'[GGA CGAGATCGAGCGCATGGT]3', *primer reverse* 5'[TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG]3' (da Graça et al., 2012).

As reações ocorreram em um volume final de 50 µL, consistindo de Gotaq® Green Master Mix (Promega®) 1X, 0,2 µM de cada primer, 5 µL de DNA e H₂O (ultra

pura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e realizada no aparelho modelo Gene Amp® PCR Sytem 9700, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 seg, 95 °C), anelamento (30 seg, 55 °C) e extensão (30 seg, 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (5 min, 95 °C) para ativação da enzima e após os 36 ciclos, foi efetuada a inclusão de um passo de extensão final (5 min, 72 °C).

Este procedimento é realizado em duas etapas de PCR (Primeira etapa usando DNA extraído positivo para *Leishmania* spp. e a segunda etapa utilizando o produto de PCR da primeira), após a visualização dos produtos em gel de agarose e purificação dos fragmentos, estes são submetidos à clonagem.

4.4.8 - Clonagem

Da mesma forma como descrito acima, amostras de DNA de cada fêmea de flebotomíneo confirmadamente positiva para infecção por *Leishmania* sp., foram re-amplificadas por PCR a partir do DNA extraído utilizando-se os iniciadores para o gene *hsp70* para posterior clonagem e sequenciamento do produto amplificado.

4.4.8.1 - Preparo de células competentes

A metodologia foi iniciada com uma semeadura da cultura de *Escherichia coli* linhagem DH5α em placa contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido sem antibiótico, com crescimento *overnight* a 37 °C. Uma colônia foi retirada e transferida para um frasco Erlenmeyer de 200 mL contendo LB líquido sem antibiótico, com forte agitação a 37 °C. Depois de 1h foi iniciada a leitura da D.O. (Densidade Ótica) a 550 nm e posteriormente, em intervalos de 20 – 30 minutos até atingir o valor de D.O. = 0.5 (fase log). A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos em tubos cônicos de 50 mL estéreis. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão cuidadosamente em 25 mL de CaCl₂ a 100 mM, em gelo. Uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente ressuspensão em 25 mL de CaCl₂ estéril a 100 mM. Após centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi, delicadamente, ressuspensão em 2 mL de CaCl₂ estéril a 100 mM acrescido de 10 % de glicerol. Foram feitas alíquotas de 100 µL das células em tubos eppendorf® de 1,5 mL mantendo-as no gelo. Em seguida, as células foram submetidas

ao choque térmico com nitrogênio líquido ou gelo seco em álcool por 1 minuto e rapidamente estocadas em freezer - 70 °C até o momento de uso.

Com a finalidade de testar a competência dessas células, incubou-se uma alíquota da colônia bacteriana em 5 mL de meio de cultura LB acrescido do antibiótico seletivo para células contendo o plasmídeo PUC19 (ampicilina 100 µg/ mL), e posteriormente foi realizada uma reação de transformação com plasmídeos controle (PUC19).

4.4.8.2 - Clonagem

Para os experimentos de clonagem foi utilizado o vetor pGEM T-Easy Vector kit Promega®, segundo as recomendações do fabricante.

Para a reação de ligação foram utilizados 5 µL do tampão de ligação rápida T4 ligase 2X; 1 µL do vetor de clonagem pGEM Easy Vector (50 ng); 3 µL de produto de PCR; 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (3 U/µL); e água *nuclease-free* para um volume final de 10 µL. A reação foi gentilmente homogeneizada e incubada *overnight* a 4° C.

Após a etapa de ligação do produto amplificado de *Leishmania* sp. no vetor pGEM, foram adicionados 2 µL do produto de ligação em um tubo *Eppendorf*® de 1,5 mL contendo previamente as células competentes de *E. coli* linhagem TOP10 e homogeneizados levemente. As células foram incubadas em gelo por 15 minutos e, em seguida, foi realizado o choque térmico a 42° C por 1 minuto. Posteriormente, foi acrescentado 1 mL de LB sem antibiótico ao mesmo tubo *Eppendorf*®, e as células foram incubadas à 37 °C por 50 minutos concluindo, dessa forma, a etapa de transformação.

Placas de LB sólido contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/ mL foram subsequentemente utilizadas, tendo sido adicionados 40 µL de X-Gal em cada placa a fim de selecionar as bactérias que continham o plasmídeo com a região de resistência a ampicilina. O X-Gal indica se a bactéria expressa a enzima β-galactosidase, codificada pelo gene *LacZ* (colônia azul); bactérias contendo o plasmídeo recombinante formam colônias brancas (devido ao gene *LacZ* com a enzima β-galactosidase inativada pela inclusão do inserto no quadro aberto de leitura).

Após selecionarmos as colônias brancas com auxílio de um palito previamente autoclavado, cada palito carreando uma colônia bacteriana, este foi introduzido em um tubo *eppendorf*® e a colônia foi diluída em 10 µL de água estéril autoclavada para a etapa subsequente de PCR de colônia.

4.4.8.3 - PCR de Colônia

A PCR de Colônia foi utilizada com a finalidade de ampliar a quantidade de inserto das colônias obtidas. Para isso foram empregados os iniciadores que flanqueiam o inserto M13 *forward* (GTTGTAAAACGACGGCCAGT) e M13 *reverse* (CAGGAAACAGCTATGACC). As reações ocorreram em um volume final de 50 µL nas seguintes condições: tampão PCR 1X [100mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM Invitrogen), iniciadores (0,2 µM), Taq Gold (Applied Biosystems; 0,05 U/µL) e 10 µL do contendo o inserto. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e realizada no aparelho modelo Gene Amp® PCR Sytem 9700, com a seguinte programação, por ciclo (40 ciclos): desnaturação (1 min 95 °C), anelamento (1,5 min 55 °C) e extensão (1 min 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (5 min, 95 °C) para ativação da enzima (*Hot Start*) e após os 40 ciclos realizou-se a extensão final (5 min, 72 °C). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose, como descrito no item 3.3 - 4.1, e purificados utilizando o kit comercial *Wizard® SV gel PCR clean- Up system*, seguindo as especificações do fabricante.

4.4.9 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram processadas com o *kit Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) segundo as especificações do fabricante, e os dados gerados foram armazenados no *software* de análise de sequências de DNA (Plataforma de Sequenciamento PDTIS/IOC/Fiocruz).

4.4.10 Análise das Sequências

4.4.10.1 Avaliação da qualidade das sequências geradas.

Os eletroferogramas gerados no sequenciamento dos clones de DNA foram inicialmente analisados pelo programa Phred (Ewing et al., 1998), que avaliou a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada, conferindo um valor de qualidade a cada uma. Para esta análise foram estabelecidos os parâmetros de aceitação das sequências baseados na probabilidade de 0,02% de erro estimado para uma determinada base.

4.4.10.2 - Agrupamento das sequências

As regiões com boa qualidade de sequências foram submetidas à montagem utilizando o programa CAP3(Huang & Madan, 1999).

4.4.10.3 Retirando a sequência do vetor

A retirada da região da sequência referente ao vetor foi realizada utilizando o programa Vector Screen do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html> /)

4.4.10.4 Busca no Banco de Dados

Após os procedimentos acima foi realizada uma busca na base de dados do Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

4.5 - Estudo de fonte alimentar dos flebotomíneos

Nesta etapa do estudo, foram utilizadas apenas fêmeas ingurgitadas (alimentadas), portanto que possuíam resíduos de sangue no abdômen. Estas foram submetidas as técnicas de dissecação e identificação taxonômica descritas do item 4.4 (detecção de infecção natural por *Leishmania*). As amostras foram analisadas através das técnicas de PCR e sequenciamento, de forma a identificar a qual espécie animal pertence o DNA do sangue encontrado no abdômen da fêmea de flebotomíneo.

Antes da PCR foi realizado a extração de DNA das amostras de fêmeas alimentadas. A metodologia empregada na extração foi a mesma utilizada para extração na verificação de infecção por *Leishmania* spp., metodologia já descrita anteriormente.

4.5.1 - Extração de DNA

As fêmeas de flebotomíneos, ingurgitadas, foram identificadas e armazenadas individualmente em microtubos de polipropileno de 1,5 ml (tipo eppendorfs), contendo 100µL de álcool etílico 95%, e mantidas à temperatura de 2 °C até o momento da extração de DNA.

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

especificadas pelo fabricante.

As amostras foram maceradas, com ajuda de um pistilo estéril e descartável, em seguida adicionado 100µL de solução de lise celular, contendo 1µL de proteinase K. Dando seguimento, os microtubos foram incubados em banho-maria a 55 °C overnight. Após esse período, foi adicionado 1µL de RNase e o conteúdo homogeneizado. Em seguida, colocados em banho-maria a 37 °C por 1 hora, depois incubados por 1 min no gelo e adicionados 100µL de solução de precipitação de proteína.

Em seguida, os microtubos foram centrifugados (3 minutos a 14.000 rpm) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, estéril e identificado, contendo 300µL de isopropanol (100%). Estes foram homogeneizados e, novamente, centrifugados (5 minutos a 14.000 rpm). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionados 300µL de etanol (70%) e 30µL de acetado de sódio (10%) em cada amostra. Estas foram levadas ao freezer – 80 °C por 1 hora e, posteriormente, centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. Ao término da centrifugação, descartou-se o sobrenadante e os microtubos foram invertidos em papel absorvente para a evaporação do etanol.

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

Toda extração ocorreu dentro de fluxo laminar, tomando todas as medidas e cuidados para que não houvesse contaminação com DNA humano. Durante a extração foram utilizadas três amostras como controle contendo água livre de DNA (Fig. 4.10).



Figura 4.10: Manipulação de amostras para extração de DNA de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas (com sangue no tubo digestório) para detecção de fonte alimentar. Fonte: Andressa Fuzari

4.5.2 – Reação em Cadeia da Polimerase – Detecção da fonte alimentar de flebotomíneos

O DNA extraído foi submetido à técnica de PCR para amplificação do gene citocromo B e o indicador utilizado foi Cyt B (FOR5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' e REV5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb (Steuber *et al.*, 2005).

O DNA extraído foi submetido a PCR do gene CytB para amplificação de um fragmento de aproximadamente 400pb solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen) e 5 µl de DNA molde, em um volume final de 50µL. A amplificação foi realizada alternando-se 32 ciclos de desnaturação a 95^oC por 20seg, anelamento a 53^oC por 30seg e extensão a 72^oC por 1min em equipamento termociclador automático de DNA (MaxyGene Gradient - AXYGENE®).

4.5.3 - Eletroforese em gel de agarose.

O perfil da banda amplificada foi analisada em gel de agarose 2% corado com GelRed™, concentração utilizada: GelRed 10.000X em 500µl de água livre de contaminações (1:500), foi aplicado 1µL de GelRed™ diluído, 01µL de tampão de carregamento e 5µL de produto amplificado na PCR, e comparados com amostras amplificadas de extração de DNA de sangue de cão e roedor como controle positivo.

4.5.4 - Sequenciamento

As amostras que apresentaram perfil de banda de aproximadamente 400pb foram enviadas para sequenciamento na empresa MacroGen® (Seul, Coréia), onde foi utilizado o sequenciador automático (Applied Biosystems 3730XL), cada amostra teve seu DNA sequenciado nas duas direções. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando o programa Sequencher®4.1.4.

4.5.5 – Análise de sequências

Após as sequências alinhadas foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando como algoritmo Blast (Basic Local Alignment Search Tool), que consiste em uma ferramenta de busca de similaridade em sequências biológicas (DNA ou aminoácidos), para verificar a identidade entre espécies depositadas no Genbank (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) e as sequências amplificadas das amostras de fêmeas alimentadas.

4.6 – Análises estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas e as análises descritivas e quantitativas foram registradas no programa Microsoft Excel® (Office 2007).

A frequência das espécies encontradas foi calculada através do Índice de Constância (Dajoz, 1973; Matos et al. 1999). Este parâmetro indica a percentagem de uma determinada espécie em relação a todos os levantamentos realizados.

Fórmula: $IC = P \times 100 / N$

Onde: P = número de coletas que a espécie apareceu e N = número total de coletas.

A Constância de uma espécie poderá ser classificada da seguinte forma:

- Espécies constantes – presentes em mais de 50% dos levantamentos;
- Espécies acessórias – presentes entre 25–50% dos levantamentos;
- Espécies Acidentais – Presentes em menos de 25% dos levantamentos

A diversidade e uniformidade das espécies de flebotomíneos nas diferentes áreas foram estimadas pela utilização do índice de diversidade de Shannon (H') e equabilidade ou uniformidade de Pielou (J). Para esses cálculos foi utilizado o programa MVSP (Multi Variete Statistical Package).

Índice de Shannon (H), na base logaritmica natural (Matos *et al.* 1999).

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Onde:

p_i - a abundância relativa de cada espécie, calculada pela proporção dos indivíduos de uma espécie pelo número total dos indivíduos na comunidade: $\frac{n_i}{N}$

n_i - o número dos indivíduos em cada espécie; a abundância de cada espécie

S - o número de espécies. Chamado também de riqueza

N - o número total de todos os indivíduos: $\sum_{i=1}^S n_i$

A uniformidade de Pielou (J) pode ser calculada como a razão entre a diversidade obtida e a diversidade máxima (H'max), a qual seria possível em uma situação onde todas as espécies fossem igualmente abundantes. O valor de J varia entre 0 e 1 com 1 representando uma situação em que todas as espécies são igualmente abundantes (Matos *et al.* 1999).

$$J = \frac{H'}{H_{\max}'}$$

$$H_{\max}' = \text{Log } s$$

Foram construídos mapas temáticos da abundância relativa de flebotomíneos por área de coleta, visando identificar padrões de distribuição das espécies presentes no Parque Estadual da Serra da Tiririca. Primeiramente, analisaram-se as espécies mais abundantes e posteriormente as espécies de maior importância em saúde pública.

Comportamento sazonal foi analisado a partir da distribuição proporcional dos flebotomíneos segundo meses de captura e variáveis climáticas: temperatura (°C), pluviosidade (%) e umidade (mm). Essa temática tem sido explorada em diferentes estudos, sendo que as variáveis climáticas frequentemente correlacionadas à ocorrência de flebotomíneos são temperatura (Andrade-Filho *et al.*, 1998; Mayo *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1980; Salomón *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007),

pluviosidade (Salomón et al., 2002; Dias et al., 2007) e umidade relativa do ar (Andrade-Filho et al., 1998; Gomes et al., 1980; Saraiva et al., 2006; Dias et al., 2007). Essas variáveis são utilizadas na busca de se entender e explicar o comportamento das populações de flebotomíneos e, conseqüentemente, a variação na ocorrência de casos humanos. Os dados referentes à pluviosidade foram obtidos na página eletrônica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (<http://www.inmet.gov.br/portal/>).

4.7 – Educação em Saúde

As atividades de educação em saúde foram planejadas para acontecer no final do presente estudo. O público escolhido para realização deste tópico foram os alunos do ensino fundamental de escolas municipais próximas à região de estudo.

Em nosso cronograma essas atividades aconteceriam em outubro, no entanto, dependíamos da autorização da Secretaria de Educação de Niterói e Maricá, além de datas disponíveis na grade de atividades das escolas escolhidas, e infelizmente não conseguimos agendar a atividade para este ano. Ficou marcado para março de 2017, no início do ano letivo.

Essas atividades de educação em saúde, já acontecem com rotina, por uma equipe de nosso laboratório (Lab. Doenças Parasitárias – LDP, Setor de estudo de Leishmanioses e Flebotomíneos - SELF). Os técnicos responsáveis são: Wagner Lança Passos e André Barbosa, contando com a participação de alunos do laboratório.

As atividades acontecerão em espaço físico disponibilizados pelas escolas e a metodologia utilizada será a seguinte:

- um dia de Fera de Ciências na Escola; onde serão expostos baners, cartazes, animais empalhados e caixas entomológicas (Fig. 4.11; 4.14);
- será realizada uma apresentação/palestra sobre os Flebotomíneos e Leishmanioses, direcionada ao público infantil, portanto somente com informações básicas; que será elaborada e apresentada por mim;
- jogos e brincadeiras - onde os alunos poderão interagir com os materiais expostos e utilizar as informações apresentadas; nestas atividades contaremos

com a participação da equipe do LDP – SELF (Fig. 4.13, 4.14);

- distribuição de folder educativo (produto gerado do presente estudo) para todos os participantes da atividade;



Figura 4.11: Materiais utilizados para as Feiras de Ciências realizada pela equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias – SELF/INERU – IOC.



Figura 4.12: Equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias – SELF/INERU – IOC atuando nos eventos de Educação em Saúde

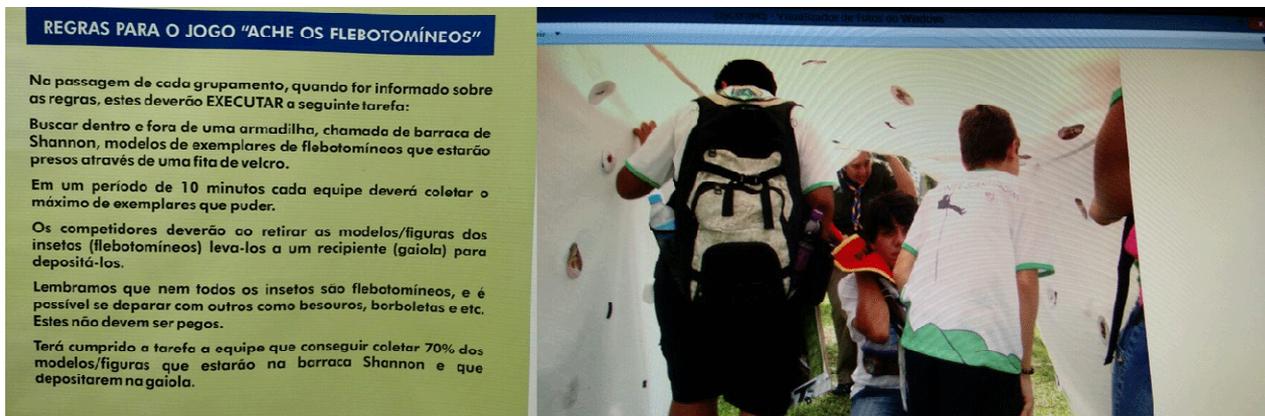


Figura 4.13: Regras e estrutura do Jogo "Ache os Flebotomíneos"



Figura 4.14: Baners e estrutura da “Caverna Itinerante”

4.8 - Aspectos éticos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as seguintes licenças:

Anexo 1: Licença do Instituto Estadual do Ambiente (Inea) – **Nº autorização: 017/2010**

Anexo 2: Licença Sisbio – **Nº autorização : 32669-4**

Anexo 3: Licença CEUA – **LW-26/14**

Anexo 4: Parecer Plataforma Brasil

Anexo 5: Licença permanente para coleta de material zoológico – Sisbio/ICMBio - **Nº
autorização : 13373-1**

Anexo 6: Sisbio/ICMBio - Registro de expedição – **Nº: 7695-1**

Anexo 7: Esboço Nota Técnica

Anexo 8: Modelo Ficha de Campo

5 - RESULTADOS

5.1 – Fauna de flebotomíneos

No período de junho de 2013 a abril de 2016, foi coletado um total de 4.402 espécimes de flebotomíneos nas áreas de estudo, localizadas na Serra da Tiririca, nos municípios de Niterói e Maricá. (Tabela 5.1)

Os flebotomíneos foram identificados e distribuídos, de acordo com a classificação de Galati 2015, em 11 espécies dos seguintes gêneros: *Brumptomyia* França & Parrot, 1921; *Evandromyia* Mangabeira, 1941; *Lutzomyia* França, 1924; *Migonemyia* Galati, 1995; *Micropygomyia* Barretto, 1962; *Nyssomyia* Barretto, 1962; *Pintomyia* Costa Lima 1932; *Psathyromyia* Barreto, 1962 (Fig. 5.4)

As espécies capturadas foram: *Br. cunhai* (Mangabeira, 1942), *Br. nitzulescui* (Costa Lima, 1932), *Ev. cortelezzii* (Brèthes, 1923), *Ev. edwardsi* (Mangabeira, 1941), *Ev. tupynambai* (Mangabeira, 1942), *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Mg. migonei* (França, 1920), *Mi. schreiberi* (Martins, Falcão & Silva, 1975), *Ny. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912); *Ps. pelloni* (Sherlock & Alencar, 1959), *Pi. bianchigalatae* (Andrade-Filho, Aguiar, Dias & Falcão, 1999) (Tabela 5.1; Fig. 5.5).

Dentre os flebotomíneos coletados, 1.934 eram fêmeas (43,9%) e 2.468 machos (56,1%), sem diferença significativa na abundância entre os sexos. (Fig. 5.1). Os machos e parte das fêmeas foram montados e identificados de acordo com metodologia tradicional (Tabela 5.2). E outra parte das fêmeas, foram separadas e direcionadas para o diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* e para detecção de fonte alimentar, estas foram montadas e identificadas utilizando uma técnica diferenciada (Tabela 5.2).

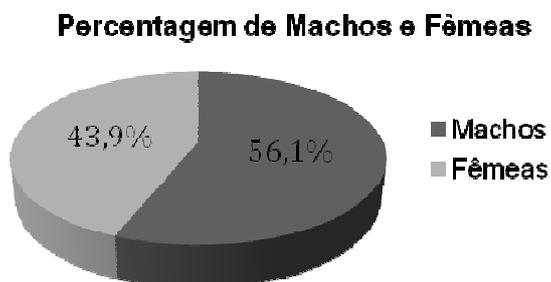


Figura 5.1 – Percentual de machos e fêmeas de flebotomíneos coletados no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Tabela 5.1: Número de flebotomíneos, por espécies, distribuídos por sexo (fêmeas e machos) coletados nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Especies	Fêmeas		Machos		Total	
	Qtd.	%	Qtd.	%	Qtd.	%
<i>Mg. migonei</i>	422	21,82	1212	49,11	1634	37,12
<i>Ev. tupyngambai</i>	508	26,27	356	14,42	864	19,63
<i>Mi. schreiberi</i>	261	13,50	411	16,65	672	15,27
Ainda não identificado	302	15,62	0	0,00	302	6,86
<i>Br. cunhai</i>	76	3,93	150	6,08	226	5,13
<i>Br. nitzulescui</i>	43	2,22	100	4,05	143	3,25
<i>Ny. intermedia</i>	70	3,62	63	2,55	133	3,02
<i>Ev. cortelezii</i>	54	2,79	56	2,27	110	2,50
<i>Lu. longipalpis</i>	25	1,29	68	2,76	93	2,11
<i>Ev. edwardsi</i>	43	2,22	39	1,58	82	1,86
<i>Ev. ssp</i>	73	3,77	0	0,00	73	1,66
<i>Br. ssp</i>	44	2,28	0	0,00	44	1,00
<i>Ps. pellowi</i>	4	0,21	13	0,53	17	0,39
<i>Pi. bianchigalatiae</i>	9	0,47	0	0	9	0,20
Total geral	1934	100,00	2468	100,00	4402	100,00

Ainda restam 302 fêmeas para serem processadas, sendo que a maior parte delas, foram direcionadas para o diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* sp. No entanto, por optarmos pelo diagnóstico individual das fêmeas, o número de amostras foi grande para a demanda da Plataforma de Sequenciamento PDTIS/IOC/Fiocruz e portanto não foi possível cumprir cronograma. Ao perceber que não haveria condições para finalizar todas as análises, achamos prudente interromper e focar no material já encaminhado. Porém, todas essas amostras estão em processamento e na espera para o sequenciamento. Dentre amostras, as direcionadas para detecção de fonte alimentar, foram coletadas em galinheiros, já indicando a possível fonte alimentar. Sendo assim, para redução de custos e melhor aproveitamento das amostras, optamos por não fazer todas no presente momento (Tabela 5.2).

Os resultados, referente à fauna de flebotomíneos, foram apresentados em quatro áreas de trabalho, numeradas de 1 a 4, onde a pesquisa foi realizada somente com os insetos, além de outra área adicional, denominada “Trilhas Coletas Mamíferos”, onde o objeto de estudo eram os mamíferos e não apenas os insetos. Os resultados serão apresentados por área de trabalho e também por comparações entre as mesmas. Os números de coletas estabelecidos para cada localidade não foram os mesmos, mas de acordo com a curva de acumulação de espécies ou curva de coletor (Fig.5.2), as

capturas realizadas foram suficientes para a representatividade da fauna local, com exceção da área denominada “Trilhas Coleta de Mamíferos”, cuja a curva foi ascendente (Marchiori & Linhares 1999; Martins & Santos 1999; Barros 2007; Schilling & Batista 2008).

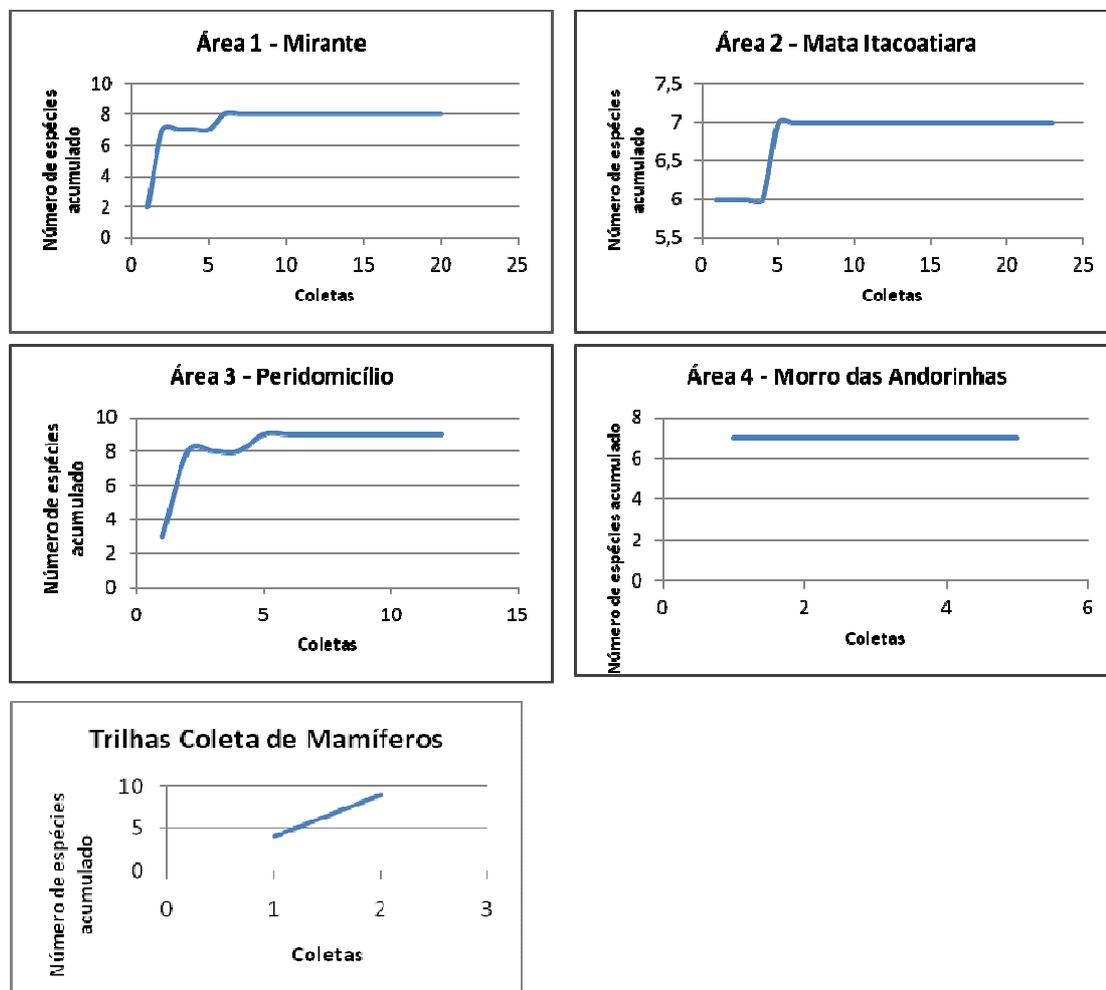


Figura 5.2: Demonstração da curva de acumulação de espécies de flebotomíneos para cada área estabelecida no trabalho, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nas áreas de capturas nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Foram capturados 676 flebotomíneos na área 1 (Mirante), 1335 na área 2 (Itacoatiara), 89 no peridomicílio, 1659 na área 4 (Morro da Andorinha) e 341 nas trilhas durante as coletas de mamíferos, totalizando os 4.100 espécimes identificados (Tabela 5.3). Observamos que os gêneros foram distribuídos da seguinte forma: *Migonemyia* (39,85%), *Evandromyia* (27,54%), *Micropygomyia* (16,39%), *Brumptomyia* (10,07%), *Nyssomyia* (3,24%), *Lutzomyia* (2,27%), *Psathromyia* (0,41%) e *Pintomyia* (0,22%) (Fig. 5.4).

Tabela 5.2: Distribuição e quantificação de fêmeas de flebotomíneos, por espécie, utilizadas em cada técnica molecular

Espécies	Fêmeas				Total
	Dissecção/ montagem e identificação diferenciada	Fonte alimentar	Infecção natural	Montagem e Identificação tradicional	
Ainda não identificado	273	29	0	0	302
<i>Brumptomyia cunhai</i>	15	0	17	44	76
<i>Br. nitzulescui</i>	8	0	17	18	43
<i>Br. spp</i>	30	0	13	1	44
<i>Evandromyia cortelezzi</i>	0	0	23	31	54
<i>Ev. edwardsi</i>	18	0	7	18	43
<i>Ev. spp</i>	40	1	30	2	73
<i>Ev. tupynambai</i>	217	7	160	124	508
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	7	1	0	17	25
<i>Migonemyia migonei</i>	2	69	180	171	422
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	112	0	49	100	261
<i>Nyssomyia intermedia</i>	0	0	0	70	70
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	0	0	3	6	9
<i>Psathyromyia pelli</i>	0	0	1	3	4
Total	722	107	500	605	1934

As espécies mais abundante durante as capturas foram *Mg. migonei* (39,85%), *Ev. tupynambai* (21,07%), *Mi. schreiberi* (16,39%) e *Br. cunhai* (5,51%) (Fig. 5.3 e Fig. 5.5) As demais apresentaram as seguintes proporções: *Br. nitzulescui* (3,49%), *Ny. intermedia* (3,24%), *Ev. cortelezzi* (2,68%), *Lu. longipalpis* (2,27%), *Ev. edwardsi* (2%), *Ev. spp* (1,78%), *Br. spp* (1,07%), *Ps. pelli* (0,41%) e *Pi. bianchigalatae* (0,22%). (Fig. 5.5)

As espécies encontradas na área 1 (Mirante) foram: *Mi. schreiberi* 44,67% (302), *Ev. tupynambai* 29,73% (201), *Mg migonei* 14,94% (101), *Br. cunhai* 3,25% (22), *Ev. edwardsi* 2,22% (15), *Ev. spp* 1,78% (12), *Br. nitzulescui* 1,33% (9), *Br.spp* 1,33% (9), *Lu. longipalpis* 0,30% (2), *Pi. bianchigalatae* 0,30%(2) e *Ps. Pelloni* 0,15% (1). (Fig. 5.6; Quadro 5.1) Na mata de Itacoatiara (área 2), subsede do PESET, foram registradas: *Ev. tupynambai* 42,47% (567), seguida de *Mi. schreiberi* 20,00% (267), *Br. cunhai* 11,16% (149), *Br. nitzulescui* 9,36% (125), *Lu. longipalpis* 6,74% (90), *Ev. edwardsi* 4,27% (57), *Ev. spp* 3,37% (45), *Br.spp* 2,55% (34) e *Mg. migonei* 0,07% (1). (Fig. 5.7; Quadro 5.1)

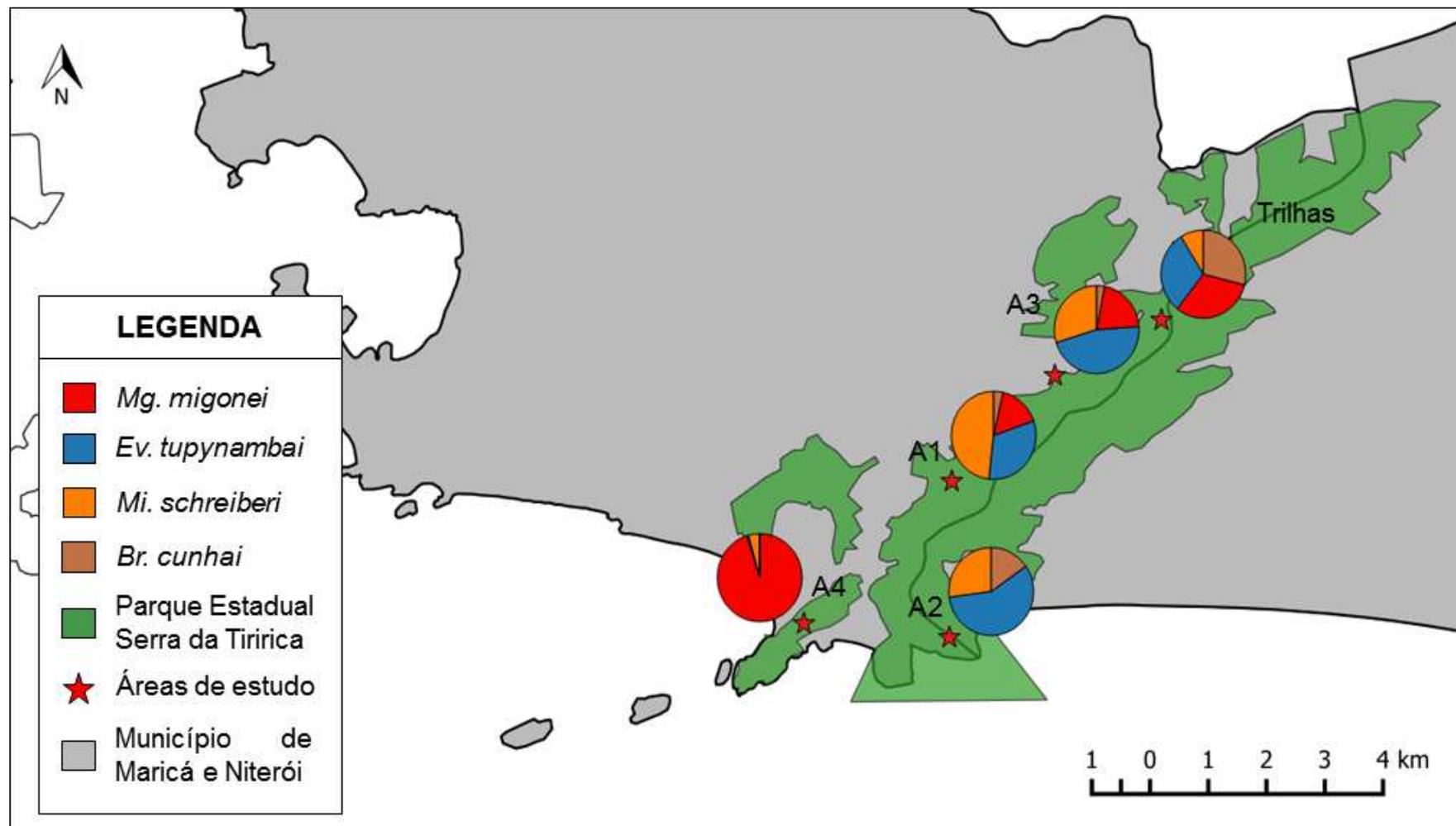


Figura 5.3: Espécies mais abundantes durante as capturas de flebotomíneos, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nas áreas de trabalho, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ. Área 1 – Mirante de Itapuaçu, Maricá (sítio localizado dentro da área do parque, ambiente de peridomicílio dentro da mata); Área 2 – Subsede do PESET, Itacoatiara, Niterói (ambiente de mata, próximo às trilhas abertas ao público); Área 3 – Peridomicílio (Engenho do Mato, Quilombo e Itaipú), Niterói (residências, onde foi observado, animais domésticos soltos, anexos, poucas plantações, árvores frutíferas, muito lixo e entulhos acumulados/ambientes limítrofes com a área de conservação do parque); Área 4 – Morro das Andorinhas, Itaipú, Niterói (residências, sendo apenas uma fora dos limites da área de parque, também com plantações, animais domésticos, anexos (como galinheiros), lixo e entulhos acumulados); Trilhas – transectos utilizados nas coletas de pequenos mamíferos, em diferentes localidades.

Tabela 5.3: Número de espécimes de flebotomíneos por espécie encontrados nas áreas de mata e peridomicílio nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Espécies	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4		Total
	Mirante	Mata Itacoatiara	Peridomicílio	Morro das Andorinhas	Trilhas Coleta Mamíferos	
<i>Pitomyia bianchigalatae</i>	2	0	2	4	1	9
<i>Psathyromyia pelloni</i>	1	0	10	0	6	17
<i>Brumptomyia spp</i>	9	34	1	0	0	44
<i>Evandromyia spp</i>	12	45	2	6	8	73
<i>Ev. edwardsi</i>	15	57	2	0	8	82
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2	90	0	1	0	93
<i>Ev. cortelezii</i>	0	0	0	110	0	110
<i>Nyssomyia intermedia</i>	0	0	1	0	132	133
<i>Br. nitzulescui</i>	9	125	4	0	5	143
<i>Br. cunhai</i>	22	149	2	1	52	226
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	302	267	20	66	17	672
<i>Ev. tupynambai</i>	201	567	31	10	55	864
<i>Migonemyia migonei</i>	101	1	14	1461	57	1634
Total	676	1335	89	1659	341	4100

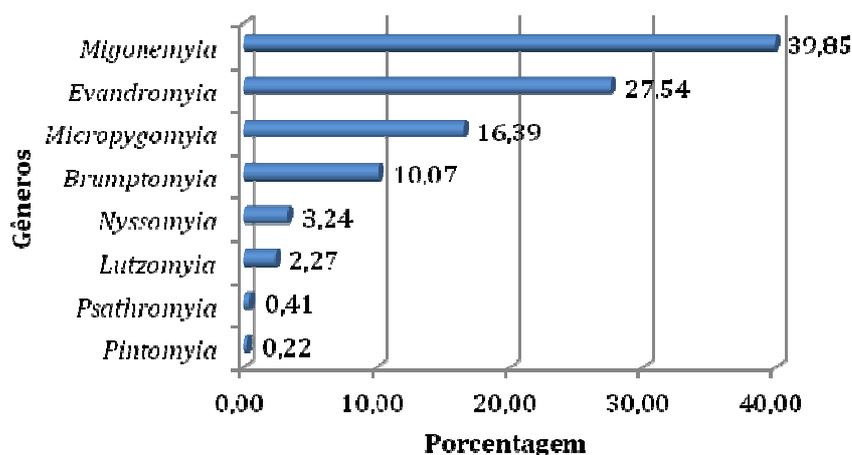


Figura 5.4 – Porcentagem dos gêneros de flebotomíneos encontrados, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nas áreas de capturas nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Tabela 5.4: Índices de diversidade e equitabilidade por áreas de coleta nos municípios de Niterói e Maricá, RJ, no período de junho de 2013 a abril de 2016.

Índices	Locais de coletas				
	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Trilhas
Índice Shanon (H)	1,43	1,68	1,82	0,50	1,73
Equitabilidade (J)	0,69	0,86	0,83	0,26	1,54

Tabela 5.5: Número total de flebotomíneos por espécie e Índice de constância (IC) por espécie encontrados nas áreas de estudo, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ

Espécie	Área 1 Mirante			Área 2 Mata Itacoatiara			Área 3 Peridomicílio			Área 4 Morro das Andorinhas		
	Total	IC		Total	IC		Total	IC		Total	IC	
		(%)	Classificação		(%)	Classificação		(%)	Classificação		(%)	Classificação
<i>Br. cunhai</i>	22	30,0	Assessório	149	91,3	Constante	2	16,7	Acidental	1	20	Acidental
<i>Br. nitzulescui</i>	9	20,0	Acidental	125	87,0	Constante	4	16,7	Acidental	0		
<i>Br. ssp</i>	9			34			1			0		
<i>Ev. cortelezzii</i>	0			0			0			110	100	Constante
<i>Ev. edwardsi</i>	15	55	Constante	57	78,3	Constante	2	16,7	Acidental	0		
<i>Ev. ssp</i>	12			45			2			6		
<i>Ev. tupynambai</i>	201	100	Constante	567	95,7	Constante	31	75,0	Constante	10	80	Constante
<i>Lu. longipalpis</i>	2	5,0	Acidental	90	47,8	Assessório	0			1	20	Acidental
<i>Mg. migonei</i>	101	55,0	Constante	1	4,3	Acidental	14	33,3	Assessório	1461	100	Constante
<i>Mi. schreiberi</i>	302	100,0	Constante	267	95,7	Constante	20	58,3	Constante	66	100	Constante
<i>Ny. intermedia</i>	0			0			1	8,3	Acidental	0		
<i>Pi. bianchigalatae</i>	2	10,0	Acidental	0			2	16,7	Acidental	4	60	Constante
<i>Ps. pelli</i>	1	5,0	Acidental	0			10	33,3	Assessório	0		
Total	676			1335			89			1659		

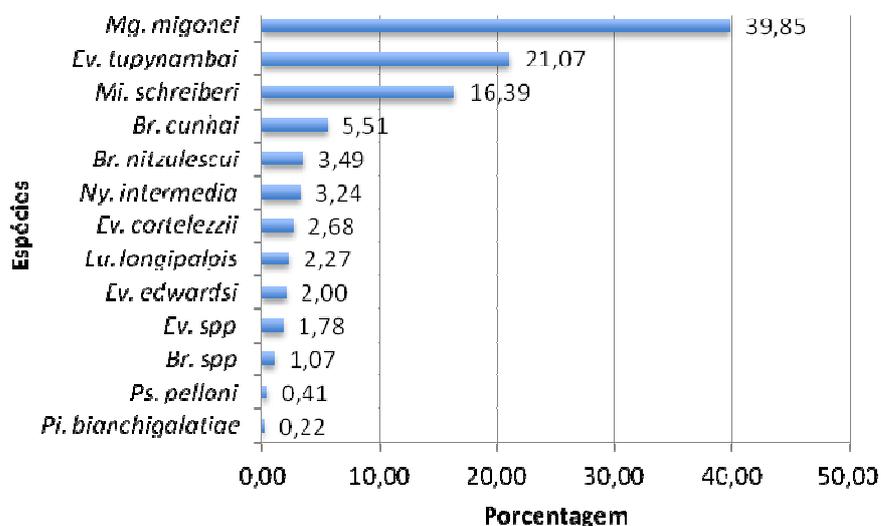


Figura 5.5: Porcentagem de espécimes de flebotomíneos por espécie capturados, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

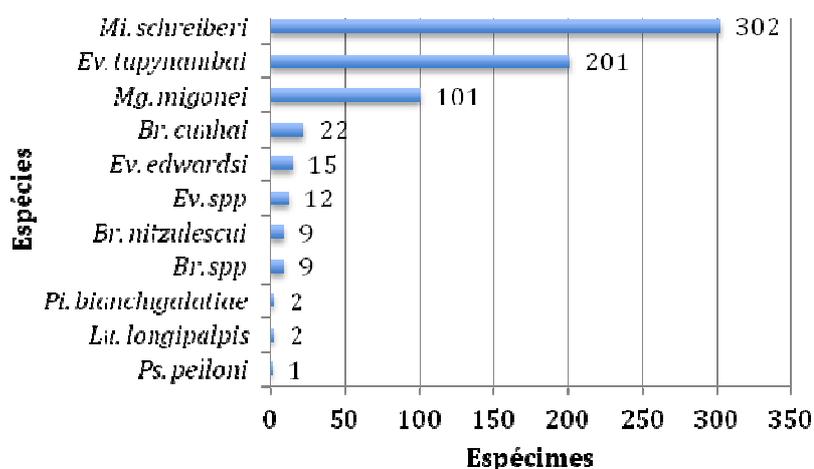
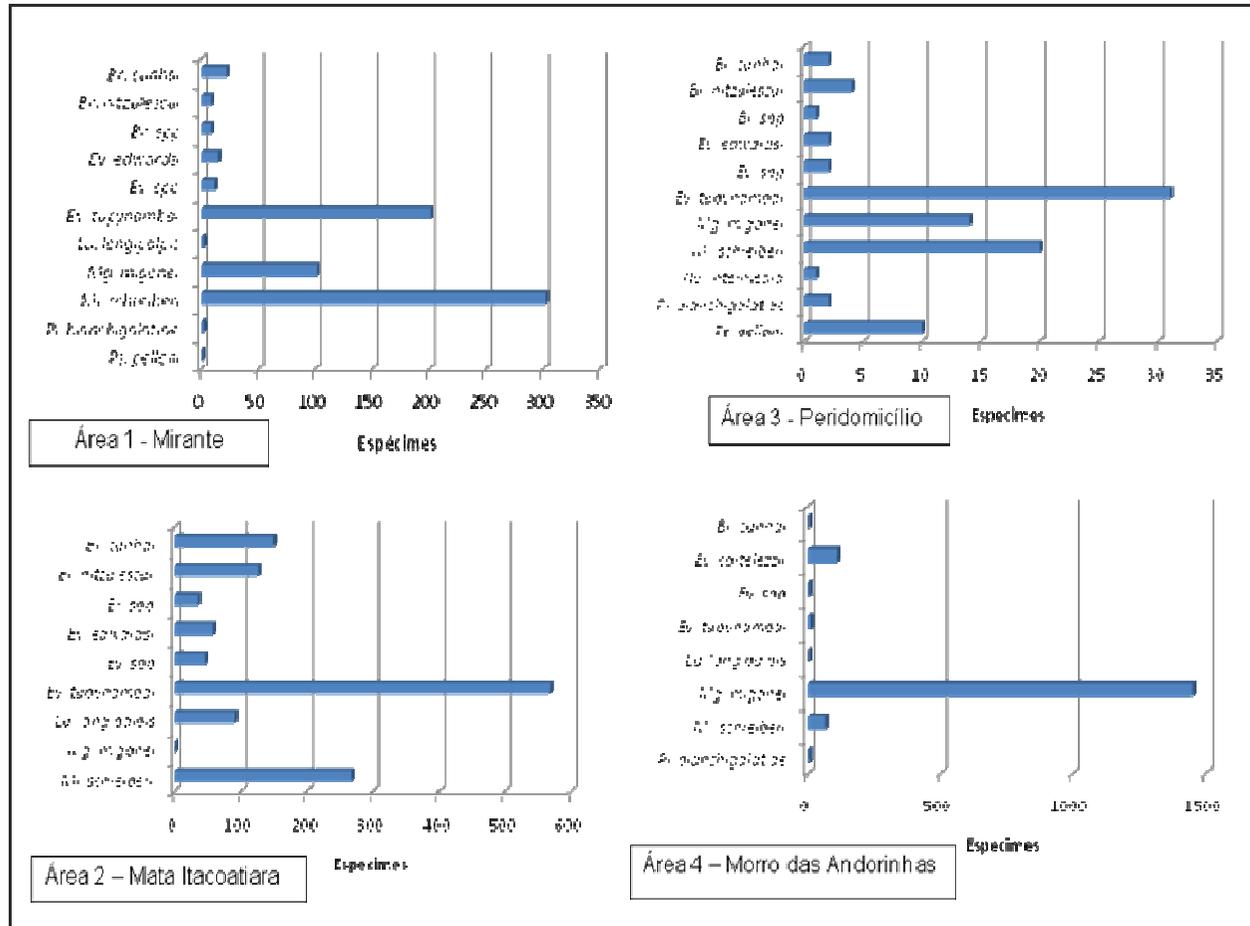


Figura 5.6 – Espécies de flebotomíneos capturadas na localidade Mirante (área 1), ambiente de mata/peridomicílio, em Itaipuaçu, Maricá, no período de junho de 2013 a abril de 2016.

Quadro 5.1: Quadro comparativo dos gráficos das espécies de fleboromíneos capturadas nas localidades Mirante (área 1), Mata de Itacoatiara (área 2), peridomicílio (área 3) e Morro das Andorinhas (área 4), em Niterói e Maricá, no período de junho de 2013 a abril de 2016.



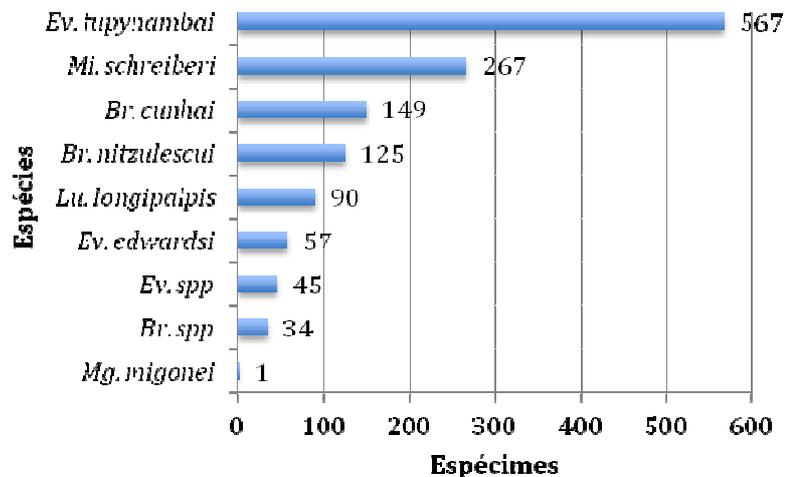


Figura 5.7 – Espécies de flebotomíneos capturadas na subseleção do PESET (área 2), ambiente de mata, em Itacoatiara, Niterói, no período de junho de 2013 a abril de 2016.

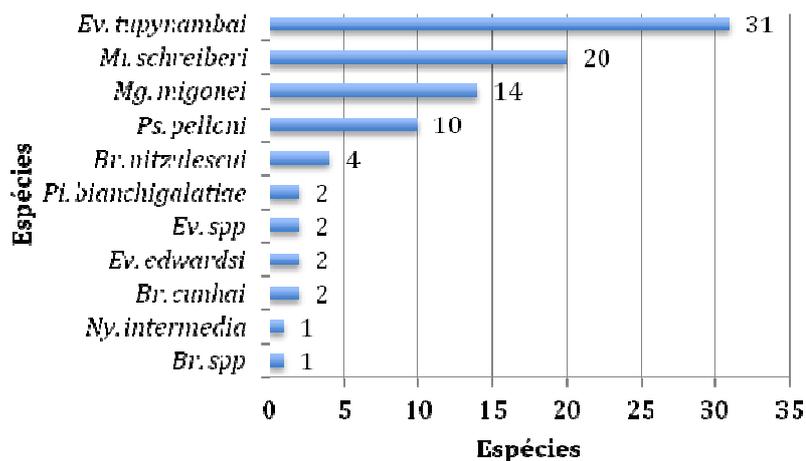


Figura 5.8 – Espécies de flebotomíneos capturadas peridomicílio (área 3), nas localidades de Engenho do Mato, Quilombo e Itaipu, Niterói, no período de junho de 2013 a abril de 2016.

Como mostra a Figura 5.8, no peridomicílio (área 3), as espécies mais frequentes foram: *Ev. tupyambai* 34,83% (31), *Mi. schreiberi* 22,47% (20), *Mg. migonei* 15,73% (14), *Psathyromyia pelloni* 11,24% (10), *Br. nitzulescui* 4,49% (4). Já as espécies *Pi. bianchigalatae*, *Ev. edwardsi*, *Br. cunhai* e *Ev. spp*, tiveram a mesma proporção, 2,25% (2) e as demais espécies somaram 2,24% (Quadro 5.1). Na área 4 (Morro das Andorinhas) as espécies mais frequentes foram: *Mg. migonei* 87,94% (1451), *Ev. cortelezii* 6,67% (110) e *Mi. schreiberi* 4% (66), *Ev. tupyambai* 0,61% (10), as demais totalizaram 0,72% da amostra. (Figura 5.9; Quadro 5.1)

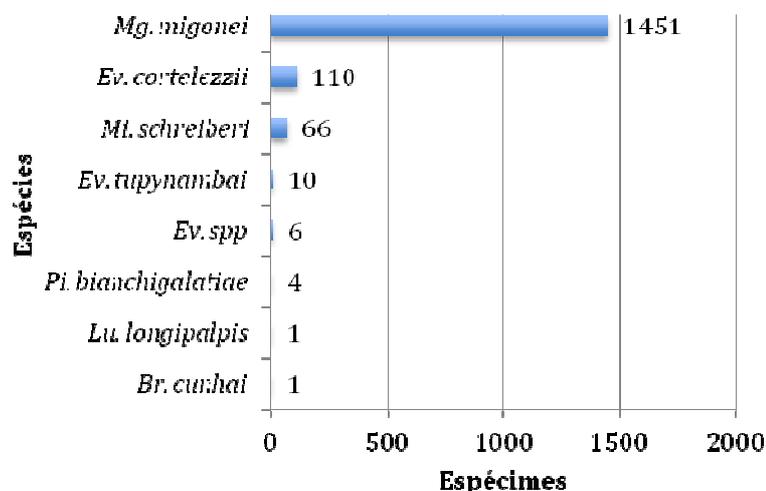


Figura 5.9 – Espécies de flebotomíneos capturadas no Morro das Andorinhas (área 4), ambiente de peridomicílio, em residências inseridas dentro da área do PESET, em Itaipu, Niterói, no período de junho de 2013 a abril de 2016.

As espécies de flebotomíneos encontradas nas duas coletas de pequenos mamíferos totalizaram 341 indivíduos, distribuídos da seguinte forma, *Ny. intermedia* 38,71% (132), *Mg. migonei* 16,72% (57), *Ev. tupyngambai* 16,13% (55), *Br. cunhai* 15,25% (52), *Mi. schreiberi* 4,69% (16), *Ev. spp* e *Ev. edwardsi*, ambas com 2,35% (8), *Ps. pelloni* 1,76% (6) e as demais espécies totalizaram 1,76%. (Figura 5.10)

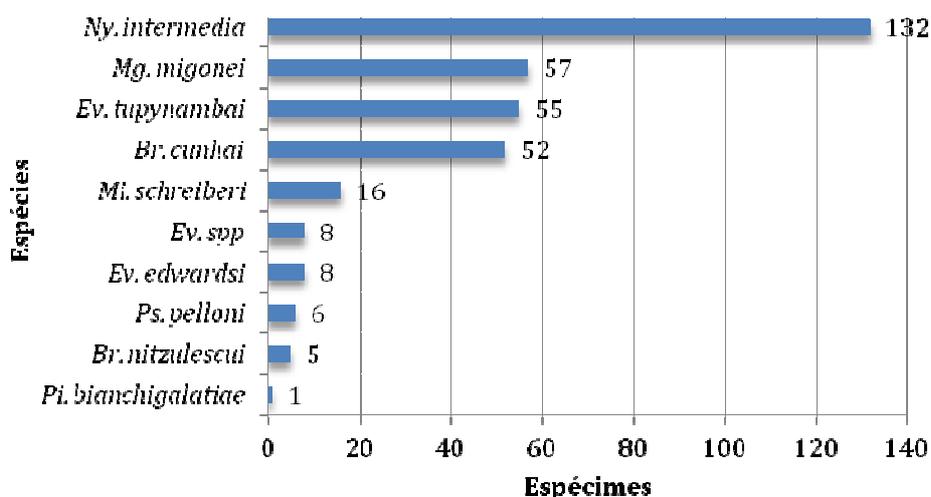


Figura 5.10 – Espécies de flebotomíneos capturadas nas trilhas utilizadas nas coletas de pequenos mamíferos, agosto/2014 e dezembro/2015, em Niterói e Maricá, RJ.

De acordo as análises estatísticas, a área 3 foi a de maior diversidade de espécies, enquanto a área 4 foi a mais baixa. Quanto ao equilíbrio entre as espécies, a área 2 foi a de maior equilíbrio. (Tabela 5.4) O índice de Constância (IC) revelou que, as espécies *Ev. tupyambai*, *Mi. schreiberi*, estão dentro da categoria Constante, quando as espécies estão presentes 50% ou mais durante as capturas. *Mg. migonei* também foi classificada com Constante nas áreas 1 e 4, como Assessória na área 3 e na área 2, considerada Acidental. Uma espécie é categorizada como Assessória, quando a espécie aparece entre 25% a 50% durante as capturas, também estão nesta categoria as espécies *Br. cunhai*, na área 1, *Ps. pelloni* na área 3 e *Lu. longipalpis* na área 2. Já uma espécie é dita como Acidental, quando aparecem menos de 25% durante as capturas, como foi verificado para algumas espécies dependendo da área analisada. (Tabela 5.5)

Durante todo o período de estudo, foram encontradas as espécies *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei* e *Ny. intermedia*, que já são reconhecidas como importantes transmissoras de *Leishmania*, em outras localidades. (Fig. 5.11; 5.12) *Mg. migonei* foi encontrada em todas as áreas de capturas; na área 4 (Morro das Andorinhas) foi a espécie dominante, nesta localidade existem várias casas, moradores e anexos de animais. (Fig. 5.13)

Lu. longipalpis foi registrado na mata, em Itacoatiara, onde foram coletados 90 espécimes (Fig. 5.7). Porém, também foi encontrado em duas outras áreas, no Mirante e no Morro das Andorinhas, em número bastante reduzido. (Figuras 5.6; 5.9; 5.13)

As espécies *Ev. tupyambai* e *Mi. schreiberi* além de serem encontradas em grande quantidade na maioria das áreas estudadas (Fig. 5.5 e Tabela 5.3), também estiveram presentes em praticamente todas as coletas. (Figura 5.14)

Analisando os valores de precipitação durante o período dos estudos, observamos que o período de maior quantidade de chuva registrado, foi no final do verão (em março) de 2016, quando atingiu 205 mm de chuva no mês. Houve uma queda significativa na precipitação em agosto/2015 quando foi registrado 4,1mm de chuva, seguidos dos meses de agosto/2013 e abril/2016, quando a precipitação chegou a 5,6mm e 5,7mm, respectivamente. (Fig. 5.15)

A temperatura média, durante todo no período das coletas, foi de 26,0°C, sendo janeiro/2014 (32,5°C) e março/2014 (33,3°) os meses mais quentes. Neste mesmo ano, também foi registrado a temperatura média mais baixa, em julho com 19,2°C. A umidade relativa do ar esteve em média de 60%. Teve a sua máxima marcada em maio//2015, quando atingiu 76,5% e a mais baixa em março/2014, com 40,9% (Fig. 5.15) As medidas de precipitação foram obtidas através do banco de dados SINDA (Sistema Nacional de Dados Ambientais) do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/Ministério da Ciência e Tecnologia) sendo o valor da precipitação total mensal, no período de junho de 2013 a abril de 2016.

A figura 5.16, mostra a quantidade de flebotomíneos capturados e as medidas de temperaturas, umidades e precipitações aferidas ao longo do trabalho.

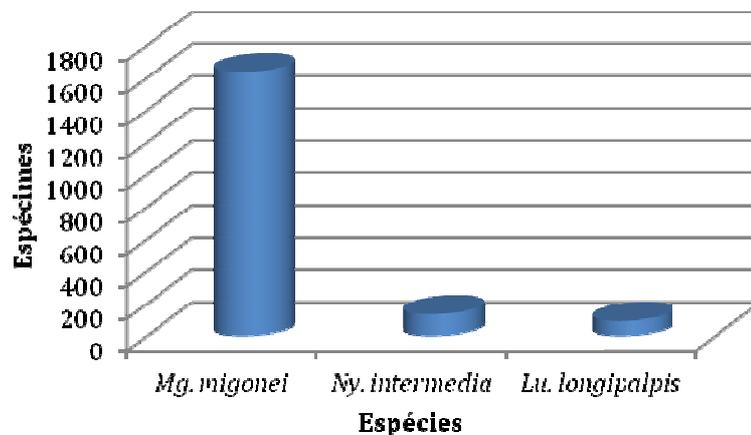


Figura 5.11: Número total de indivíduos por espécies de flebotomíneos, capturadas durante as coletas, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ. Espécies essas, que já são reconhecidamente vetores de *Leishmania sp.* em outras localidades.

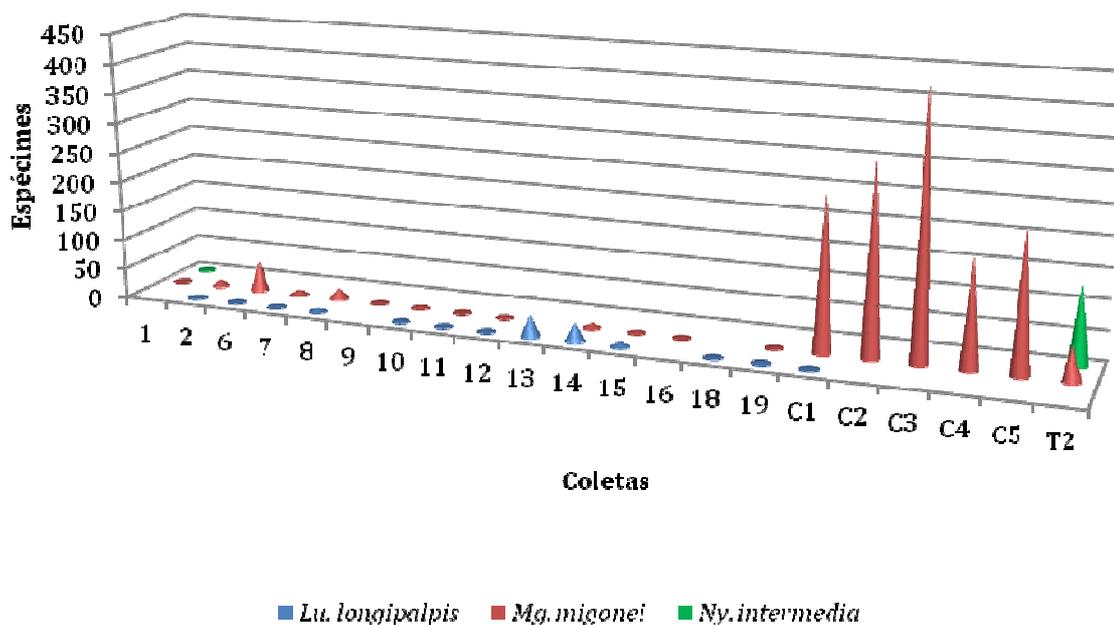


Figura 5.12: Espécies de flebotomíneos distribuídas por coletas, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ. Espécies essas, que já são reconhecidamente vetores de *Leishmania sp.* em outras localidades.

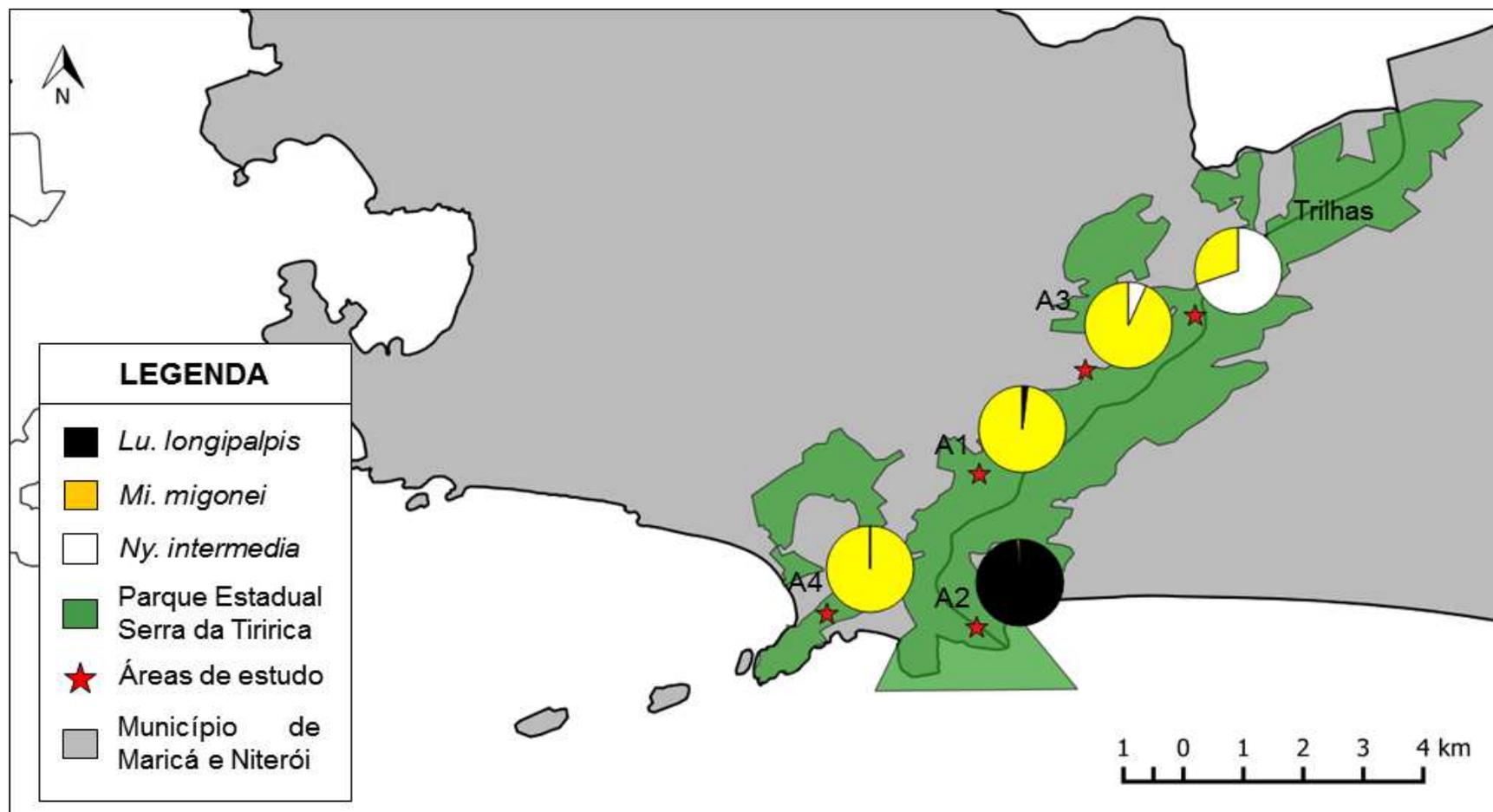


Figura 5.13: Espécies reconhecidamente vetores de *Leishmania sp.*, distribuídas por áreas de estudo, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ. Área 1 – Mirante de Itapuaçu, Maricá (sítio localizado dentro da área do parque, ambiente de peridomicílio dentro da mata); Área 2 – Subsede do PESET, Itacoatiara, Niterói (ambiente de mata, próximo às trilhas abertas ao público); Área 3 – Peridomicílio (Engenho do Mato, Quilombo e Itaipú), Niterói (residências, onde foi observado, animais domésticos soltos, anexos, poucas plantações, árvores frutíferas, muito lixo e entulhos acumulados/ambientes limítrofes com a área de conservação do parque); Área 4 – Morro das Andorinhas, Itaipú, Niterói (residências, sendo apenas uma fora dos limites da área de parque, também com plantações, animais domésticos, anexos (como galinheiros), lixo e entulhos acumulados); Trilhas – transectos utilizados nas coletas de pequenos mamíferos, em diferentes localidades

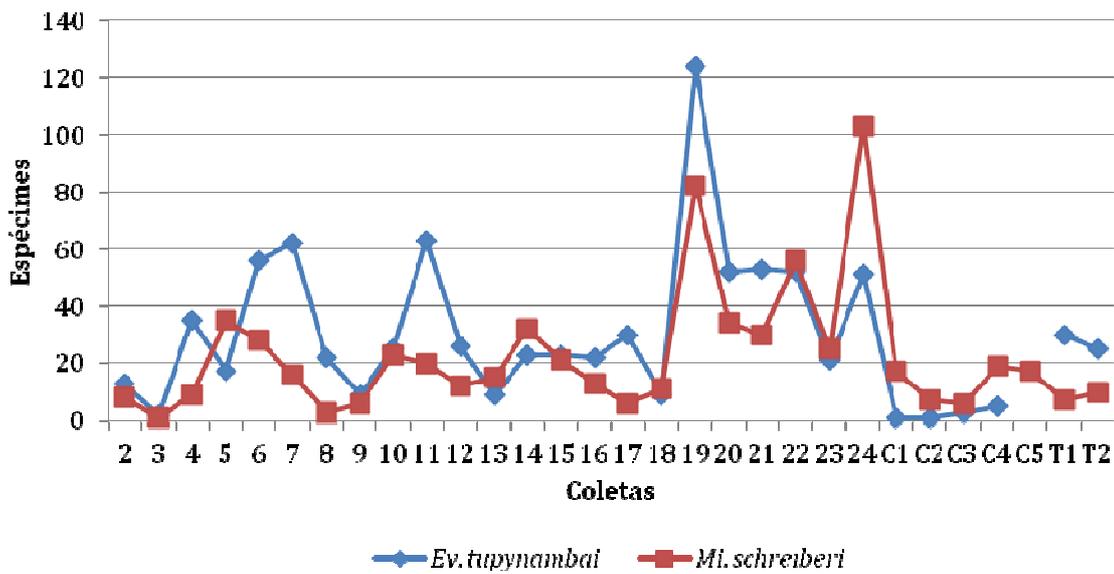


Figura 5.14: Distribuição dos espécimes de *Ev. tupynambai* e *Mi. schreiberi* em cada coleta realizada no no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

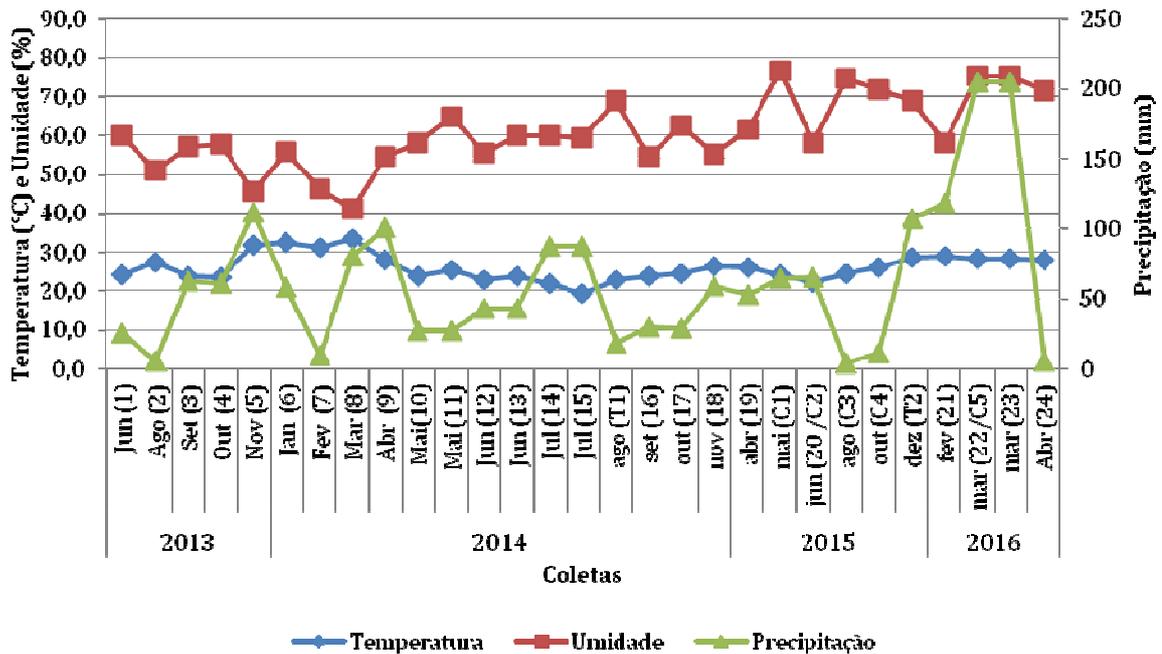


Figura 5.15 – Temperatura e umidade relativa do ar registradas durante as capturas de flebotomíneos. As medidas de precipitação mensal foram obtidas através do banco de dados (BDMET) do INMET, durante o período de junho de 2013 a abril de 2016, no município de Niterói, RJ. Fonte: Dados da Rede do INMET (<http://www.inmet.gov.br/portal>)

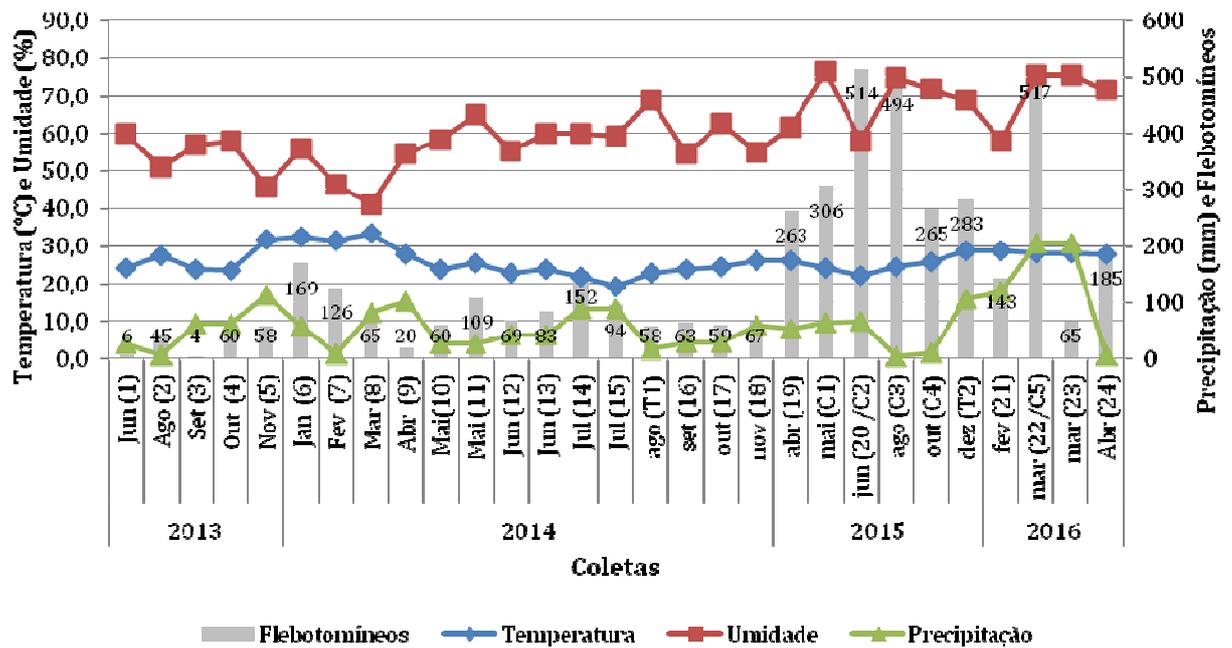


Figura 5.16: Temperatura, umidade relativa do ar e precipitação registradas durante as capturas em relação ao número de flebotomíneos coletados durante o período de junho de 2013 a abril de 2016.

5.2 - Estudo da infecção natural por *Leishmania sp.* nas fêmeas de flebotomíneos

A pesquisa de infecção natural por *Leishmania sp.* foi realizada em 500 fêmeas, não alimentadas, de flebotomíneos coletados durante o período do estudo. A investigação foi efetuada através da reação de PCR, observando o gel de agarose (Figura 5.17), onde foi detectado infecção natural por *Leishmania sp.* em quatro amostras da área 2 (mata de Itacoatiara) (Tabela 5.6). As espécies positivas foram *Ev. tupymanbai*, *Ev. spp.* e *Mi. schreiberi*, cuja taxa de infecção foi de 1,25%, 3,33% e 2,04%, respectivamente. Nesta área, só foram encontradas duas espécies do gênero *Evandromyia*, sendo as fêmeas da espécie *Ev. tupymanbai*, mais fáceis de identificação. Portanto, provavelmente, a espécie identificada com *Ev. spp.* na tabela 5.6, seja um exemplar da espécie *Ev. edwardsi*. A Figura 5.18 mostra o gel para a identificação específica de *Leishmania*, apesar do resultado ter sido negativo, iremos proceder a repetição da reação.

Tabela 5.6: Espécies de flebotomíneos com infecção por *Leishmania spp.* na mata de Itacoatiara e taxa de infecção, no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Espécies	Localidade	Nº de espécimes examinadas	Nº de espécimes infectadas	Espécie de <i>Leishmania</i>	Taxa de Infecção (%)
<i>Ev. tupymanbai</i>	Mata Itacoatiara	160	2	<i>Leishmania spp.*</i>	1,25
<i>Ev. spp.**</i>	Mata Itacoatiara	30	1	<i>Leishmania spp.*</i>	3,33
<i>Mi. schreiberi</i>	Mata Itacoatiara	49	1	<i>Leishmania spp.*</i>	2,04
Total		239	4		

*Ainda em identificação – repetição do diagnóstico

** Identificação não foi possível devido a problemas na montagem

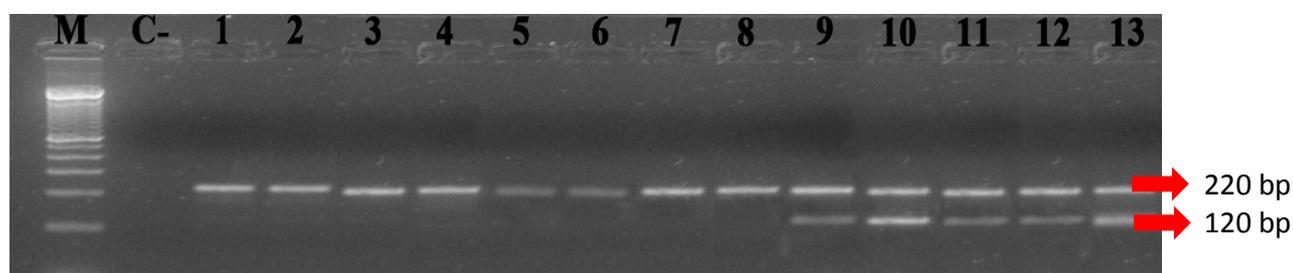


Figura 5.17: Eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para avaliação de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos por *Leishmania sp.*. M: Marcador de peso molecular 100 pb; C-: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 1-2: Controles negativos - DNA extraído de flebotomíneos machos; 3-8: Fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular que se apresentaram negativas para *Leishmania spp.*; 9-12: Fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular que se apresentaram positivas para *Leishmania spp.*; 13: Controle positivo.

diagnóstico molecular revelando positividade das amostras 13: Controle positivo da reação (DNA de um único flebotomíneo macho misturado com DNA de *Le. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).

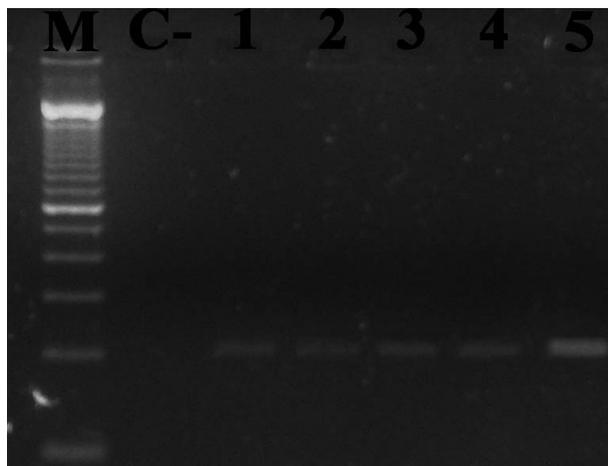


Figura 5.18: Eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para identificação das espécies de *Leishmania* proveniente dos DNAs de flebotomíneos positivos na análise de infecção natural e re-amplificados com o fragmento do gene hsp70 (234pb) M: Marcador de peso molecular 100 pb; C-: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 1- 4: segundo round – DNA de Fêmeas de flebotomíneos positivas para *Leishmania* spp. 5: Controle positivo da reação (DNA de *Le. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).

5.3 - Estudo de fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneos

O objetivo principal das análises de fonte alimentar desenvolvidos no presente estudo, foi indicar os possíveis reservatórios de *Leishmania* spp., ou as espécies que ajudam a manter o ciclo de vida dos vetores. Com esse intuito foram realizadas a PCR para amplificação do gene CyT B em 78 fêmeas de flebotomíneos alimentadas. (Tabela 5.7) Após o sequenciamento e as análises de identidade realizadas junto ao Genbank, foram verificados material amplificado de apenas duas espécies diferentes de aves, *Gallus gallus* (Galinha) e *Cairina moschata* (pato-do-mato).

Tabela 5.7: Identificação de fonte alimentar em fêmeas de flebotomíneo naturalmente alimentadas coletadas no período de junho de 2013 a abril de 2016, nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Espécies flebotomíneos	Coleta	Fonte Alimentar	Similaridade (%)	Localidade			Total
				Mata Itacoatiara	Mirante	Morro da Andorinha	
<i>Ev. ssp</i>	11	<i>Gallus gallus</i>	99		1		1
<i>Ev. tupynambai</i>	7	<i>Gallus gallus</i>	100	1			1
<i>Ev. tupynambai</i>	19	<i>Gallus gallus</i>	98-99	3			3
<i>Ev. tupynambai</i>	20	<i>Gallus gallus</i>	98		1		1
<i>Ev. tupynambai</i>	21	<i>Gallus gallus</i>	100	1			1
<i>Ev. tupynambai</i>	22	<i>Gallus gallus</i>	100		1		1
<i>Lu. longipalpis</i>	6	<i>Gallus gallus</i>	100		1		1
<i>Mg. migonei</i>	6	<i>Gallus gallus</i>	99		6		6
<i>Mg. migonei</i>	7	<i>Gallus gallus</i>	99		2		2
<i>Mg. migonei</i>	C2	<i>Gallus gallus</i>	95-99			13	13
<i>Mg. migonei</i>	C3	<i>Cairina moschata</i>	96			1	1
<i>Mg. migonei</i>		<i>Gallus gallus</i>	96-100			30	30
<i>Mg. migonei</i>	C4	<i>Gallus gallus</i>	99-100			10	10
<i>Mg. migonei</i>	C5	<i>Cairina moschata</i>	96			1	1
<i>Mg. migonei</i>		<i>Gallus gallus</i>	98-100			6	6
Total geral				5	12	61	78

5.4– Fauna de pequenos mamíferos

Nos estudos dos pequenos mamíferos foram coletados um total de 32 espécimes, distribuídos da seguinte forma: 18 animais capturados na primeira coleta, realizada em agosto de 2014, distribuídos em cinco gêneros, sendo quatro gêneros de marsupiais (ordem Didelphimorphia) e uma espécie de roedor (ordem Rodentia). Na segunda coleta, em dezembro de 2015, mais 13 animais foram coletados, sendo quatro gêneros de marsupiais e dois gêneros de roedores (Fig. 5.19).

As espécies predominantes foram *Trinomys eliasi* 31,25% (9), *Didelphis aurita* 28,12% (9), *Philander frenatus* 18,75% (6), *Metachirus nudicaudatus* 6,25% (2), *Trinomys sp.* 6,25% (2) e *Oligoryzomys nigripes*, *Monodelphis gr. americana*, *Gracilinanus microtarsus* com 3,13% (1) cada. (Tabela 5.8, Figura 5.20)

O sucesso de captura foi praticamente o mesmo, na coleta 1, foi obtido 1,67% enquanto que o sucesso de captura na coleta 2 foi de 1,3%, já a diversidade e riqueza de espécies foi maior.

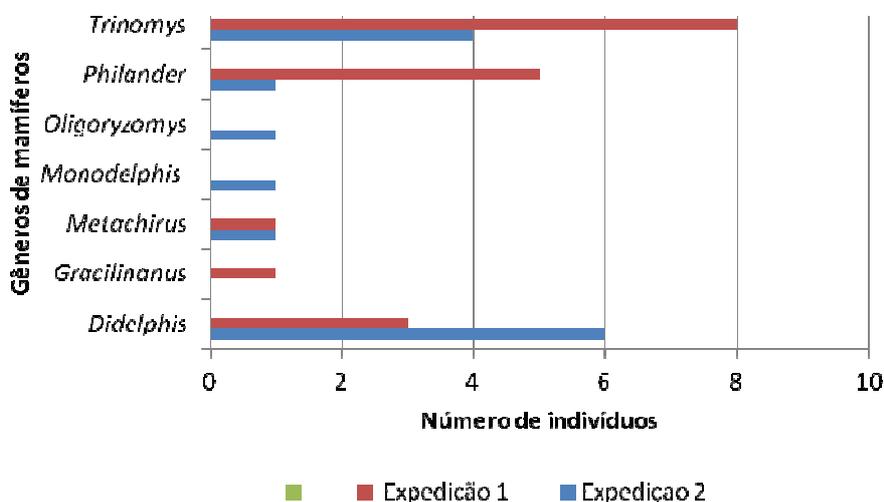


Figura 5.19: Distribuição por gêneros, dos espécimes de pequenos mamíferos (Roedores e Marsupiais) capturados na expedição 1 (ago/2014 - estação seca) e na expedição 2 (dez/2015 - estação chuvosa), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

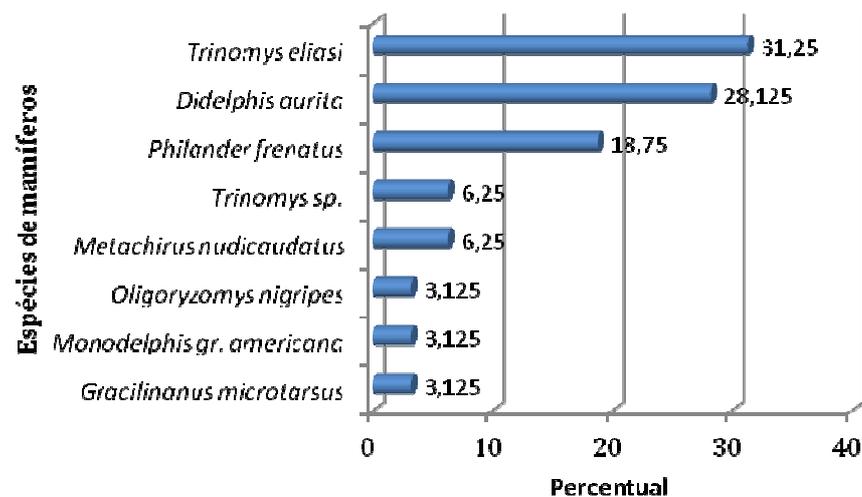


Figura 5.20: Percentual das espécies de Marsupiais (ordem Didelphimorphia) e Roedores (ordem Rodentia) capturadas nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

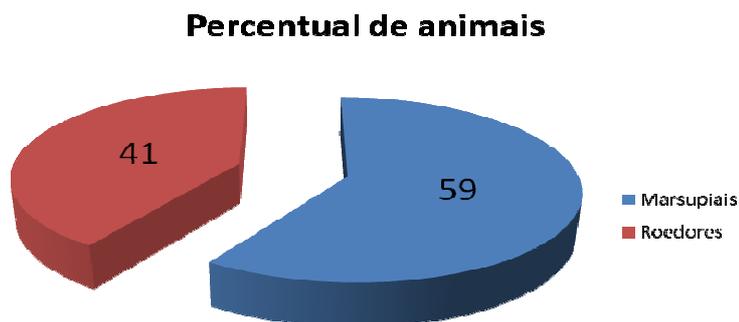


Figura 5.21: Percentual de animais Marsupiais (ordem Didelphimorphia) e Roedores (ordem Rodentia) capturados nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Tabela 5.8: Espécies de mamíferos capturados nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Coleta	Espécie	Trilha	Localidade	Armadilha	Material	Sexo
Agosto 2014	<i>Didelphis aurita</i>	TBP13	Várzea das Moças/Niterói	Tomahawk	solto	Macho
	<i>Trinomys eliasi</i>	TBP11	Várzea das Moças/Niterói	Tomahawk	solto	Macho
	<i>Trinomys eliasi</i>	TAP4	Itaipu/Niterói	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Trinomys eliasi</i>	TAP8	Itaipu/Niterói	Sherman	solto	Fêmea
	<i>Trinomys eliasi</i>	TAP8	Itaipu/Niterói	Tomahawk	solto	Macho
	<i>Trinomys sp.</i>	TAP11	Itaipu/Niterói	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Philander frenatus</i>	TDP11	Mirante (sítio)/Maricá	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Didelphis aurita</i>	TBP4	Várzea das Moças/Niterói	Tomahawk	solto	Macho
	<i>Trinomys eliasi</i>	TBP11	Várzea das Moças/Niterói	Tomahawk	c	Fêmea
	<i>Trinomys sp.</i>	TBP11	Várzea das Moças/Niterói	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Trinomys eliasi</i>	TAP9	Itaipu/Niterói	Sherman	solto	Fêmea
	<i>Philander frenatus</i>	TAP12	Itaipu/Niterói	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Philander frenatus</i>	TEP14	Mirante (descida)/Maricá	Sherman	solto	Fêmea
	<i>Didelphis aurita</i>	TBP7	Várzea das Moças/Niterói	Tomahawk	solto	Macho
	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	TBP14	Várzea das Moças/Niterói	Tomahawk	solto	Macho
	<i>Philander frenatus</i>	TAP12	Itaipu/Niterói	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	TDP10	Mirante (sítio)/Maricá	Sherman	solto	Macho
	<i>Philander frenatus</i>	TDP6	Mirante (sítio)/Maricá	Tomahawk	solto	Fêmea
Dezembro 2015	<i>Trinomys eliasi</i>	TDP8	Mirante (sítio)/Maricá	Tomahawk	pce	Fêmea
	<i>Trinomys eliasi</i>	TDP14	Mirante (sítio)/Maricá	Tomahawk	pce	Macho
	<i>Trinomys eliasi</i>	TEP5	Mirante (descida)/Maricá	Sherman	pce	Fêmea
	<i>Didelphis aurita</i>	TGP3	Morro das Andorinhas/Niterói	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Philander frenatus</i>	TEP4	Mirante (descida)/Maricá	Tomahawk	pce	Macho
	<i>Didelphis aurita</i>	TGP13	Morro das Andorinhas/Niterói	Tomahawk	solto	Macho
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	THP15	SedePESET/Maricá	Sherman	pce	Fêmea
	<i>Trinomys eliasi</i>	TEP5	Mirante (descida)/Maricá	Sherman	pce	Macho
	<i>Didelphis aurita</i>	TGP5	Morro das Andorinhas/Niterói	Tomahawk	solto	
	<i>Didelphis aurita</i>	THP13	SedePESET/Maricá	Tomahawk	solto	Fêmea
	<i>Monodelphis gr. americana</i>	TIP9	Haras/Maricá	Sherman	pce	Macho
	<i>Didelphis aurita</i>	TGP3	Morro das Andorinhas/Niterói	Tomahawk	c	Fêmea
	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	TDP15	Mirante (sítio)/Maricá	Tomahawk	solto	Fêmea
<i>Didelphis aurita</i>	TIP1	Haras/Maricá	Tomahawk	solto	Fêmea	

Obs: a coluna material indica se o espécime foi conservado em meio líquido (ml), ou como pele, crânio e esqueleto (pce), ou solto

Dentre todos os pequenos mamíferos coletados, 59,4% foram da ordem Didelphimorphia e 40,6% foram da ordem Rodentia (Fig. 5.21). Entre os marsupiais, cinco espécies de cinco gêneros diferentes foram identificadas (Fig. 5.22) e apenas três espécies de dois gêneros de roedores. (Fig. 5.23)

As trilhas em que mais foram coletados espécimes, foram as trilhas A (7) e B (7), na expedição 1. Estas ficam localizadas nos bairros de Itaipu e Engenho do Mato, enquanto que nas trilhas C e F, não foi capturado nenhum espécime. (Tabela 5.9). Em apenas duas trilhas, não foram coletados flebotomíneos, nas trilhas D e I. Porém, na trilha I, em um acesso ao início da trilha, onde havia um galinheiro, foi instalada uma armadilha luminosa HP, que capturou 199 flebotomíneos (Tabela 5.9). Na expedição 2, a trilha com maior número de espécimes capturados foi a D (4), localizada no Morro das Andorinhas, e na trilha SS não foi capturado nenhum espécime. Não houve registro de flebotomíneos nas trilhas D, e SS.

Quanto às análises de infecção natural por *Leishmania spp.* nos espécimes de pequenos mamíferos capturados, não foi detectado nenhuma espécie de *Leishmania sp.* (Fig. 5. 20)

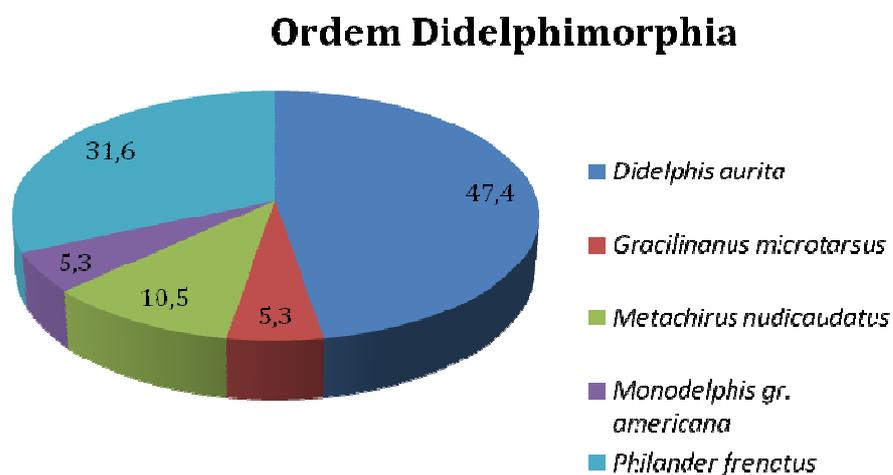


Figura 5.22: Resultado em percentual (%) das espécies da ordem Didelphimorphia capturados nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ

Ordem Rodentia

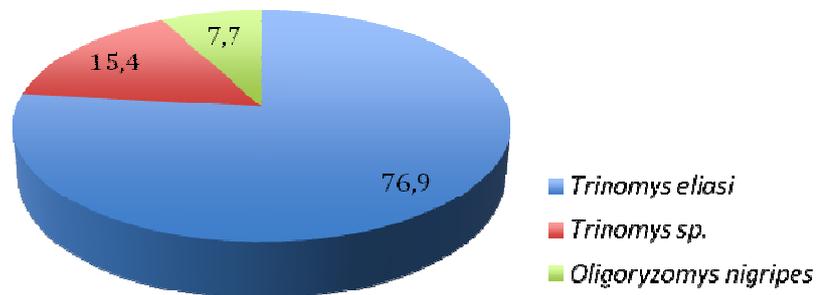


Figura 5.23: Resultado em percentual (%) das espécies da ordem Rodentia capturados nas expedições 1 e 2 (agosto/2014 e dezembro/2015 respectivamente), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ

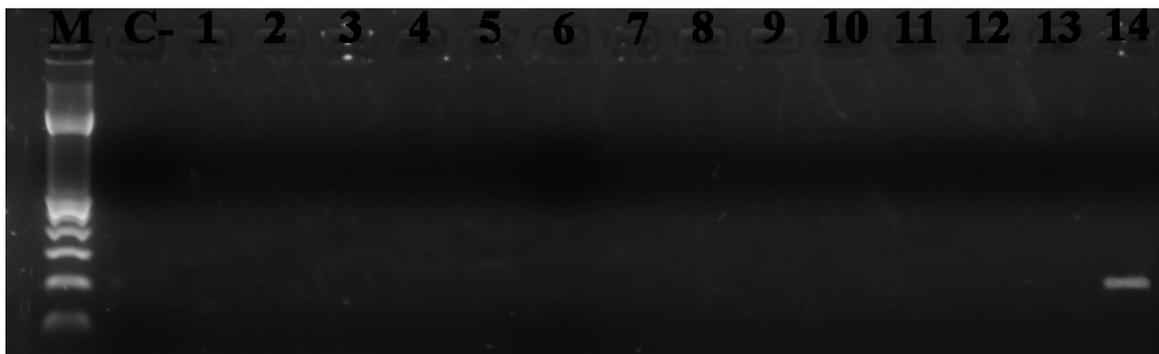


Figura 5.24: Eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para avaliação de infecção natural de reservatórios por *Leishmania* sp.. M: Marcador de peso molecular 100 pb; C-: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 1-13: DNA extraído de sangue (coletado em papel de filtro) de possíveis reservatórios de *Leishmania* spp. revelando negatividade das amostras 14: Controle positivo da reação (DNA de *Le. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).

Trinomys dimidiatus.



Oligoryzomys microtis.



Didelphis aurita. Photo by H.G.Bergallo.

Figura 5.25: Exemplos dos mesmos gêneros de roedores e espécie de marsupial encontrados nas coletas realizadas nos municípios de Niterói e Maricá, RJ. (Fonte: MS 2002; Modesto et al. 2008)

Tabela 5.9: Relação das espécies de pequenos mamíferos e de flebotomíneos capturados nas trilhas, durante a expedição 1 (ago/2014 - estação seca) e a expedição 2 (dez/2015 - estação chuvosa), nos municípios de Niterói e Maricá, RJ.

Espécies Mamíferos	Trilhas Expedição 1 (T1)							Trilhas Expedição 1 (T2)							Total T2	Total geral
	A	B	C	D	E	F	Total T1	D	E	G	H	I	I gal*	SS		
<i>Didelphis aurita</i>		3					3			4	1	1			6	9
<i>Gracilinanus microtarsus</i>				1			1								0	1
<i>Metachirus nudicaudatus</i>		1					1	1							1	2
<i>Monodelphis gr. americana</i>							0					1			1	1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>							0				1				1	1
<i>Philander frenatus</i>	2			2	1		5		1						1	6
<i>Trinomys eliasi</i>	4	2					6	2	2						4	10
<i>Trinomys sp.</i>	1	1					2								0	2
Total	7	7	0	3	1	0	18	3	3	4	2	2		0	14	32
Espécies Flebotomíneos																
<i>Br. cunhai</i>					11		11		40		1				41	52
<i>Br. nitzulescui</i>							0		1		4				5	5
<i>Ev. edwardsi</i>				1	1		2		4	2					6	8
<i>Ev. ssp</i>	1	4	1		2		8								0	8
<i>Ev. tupynambai</i>	4	2	6	1	12	5	30		16	1	1		7		25	55
<i>Mg. migonei</i>							0		3				54		57	57
<i>Mi. schreiberi</i>	2				5		7		5	5					10	17
<i>Ny. intermedia</i>							0						132		132	132
<i>Pi. bianchigalatae</i>							0			1					1	1
<i>Ps. pelloni</i>							0						6		6	6
Total	7	6	7	2	31	5	58	0	69	9	6	0	199	0	283	341

*Armadilha luminosa HP instalada em anexo situado a 10m do início da trilha I.

6– DISCUSSÃO

6.1 – Fauna de flebotomíneos

Este trabalho é continuidade dos estudos iniciados no mestrado (2009-2011) em área de reserva ambiental, no Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET), situado nos municípios de Niterói e Maricá. No presente estudo, a fauna flebotomínica apresentou 11 espécies, de 8 gêneros e todas as espécies já haviam sido registradas em nossos trabalhos anteriores na área, mostrando que os resultados apresentados revelam uma consistência ecológica. Outros estudos já haviam assinalado a presença das espécies em outras regiões do estado do Rio de Janeiro (Aguiar *et al.* 1986, 1993; Rangel *et al.* 1986, 1990; Brazil *et al.* 1991; De Oliveira *et al.*, 1995; Souza *et al.* 2003; Pita-Pereira *et al.* 2005; Afonso *et al.* 2007; Alves 2007; Cardoso *et al.* 2009; Brazil *et al.* 2011, Fuzari *et al.* 2013, Carvalho *et al.* 2013, Souza *et al.* 2015).

A nomenclatura taxônoica utilizada foi a proposta por Galati (2003, 2015), que relata a existência de 517 espécies descritas de flebotomíneos no continente americano, divididas em 29 gêneros. Mais da metade ocorrem em território brasileiro, e destas, 51 espécies já foram registradas no estado do Rio de Janeiro.

Somente lembrando, no Novo Mundo, a subfamília Phlebotominae se divide em duas tribos: Hertigiini, mais primitiva e sem espécies de interesse médico e Phlebotomiini, mais numerosa e que inclui espécies de importância médica e veterinária. A tribo Phlebotomiini é dividida em seis subtribos das quais, quatro ocorrem no Brasil. São elas: Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina. As duas primeiras, possuem, cada uma, somente um gênero encontrado no estado do Rio de Janeiro (gêneros *Brumptomyia* e *Micropygomyia*, respectivamente) e Lutzomyiina e Psychodopygina, já possuem mais gêneros descritos no estado. (Shimabukuro, 2007; Galati, 2015).

No entanto, somente os gêneros *Lutzomyia*, *Evandromyia*, *Migonemyia* e *Pintomyia*, pertencem à subtribo Lutzomyiina, bem como os gêneros *Psathyromyia* e *Nyssomyia* pertencentes à subtribo Psychodopygina, além dos gêneros *Brumptomyia* e *Micropygomyia* relatados acima, estiveram presentes no atual trabalho

Considerando uma análise geral dos resultados aqui apresentados, dentre os gêneros encontrados, *Migonemyia* foi o mais abundante, com 39, 85% dos espécimes

capturados, porém não foi o mais frequente, seguido de *Evandromyia* (27,54%), *Micropygomyia* (16,39%) e *Brumptomyia* (10,07%), os quais compreendem as espécies mais abundantes do estudo.

Em nosso estudo, *Mg. migonei*, foi a única espécie representante do gênero e a mais abundante. Apresenta-se amplamente distribuída em todas as regiões do Brasil, e no estado do Rio de Janeiro, foi registrada em praticamente em todo o território fluminense (Rangel *et al.* 1986; Rangel *et al.* 1990; Brazil *et al.* 1991; Souza *et al.* 2001; Souza *et al.* 2002; Souza *et al.* 2003; de Souza *et al.* 2003; Da Costa *et al.* 2004; Pita-Pereira *et al.*, 2005; Afonso *et al.* 2007; Brazil *et al.* 2011, Fuzari *et al.* 2013, Carvalho *et al.* 2013, Souza *et al.* 2015). A espécie revelou-se constante em todas as áreas trabalhadas, no entanto, na área 4 (Morro das Andorinhas) foi a de maior abundância e predominância. No peridomicílio (área 3), no Mirante (área 1) e nas trilhas, foi considerada constante. Na área 2, em Itacoatiara, houve apenas o registro de um espécime, sendo considerada acidental, de acordo com o índice de constância. Fuzari *et al.* (2013) reportaram, a alta densidade de *Mg. migonei* no ambiente peridomicílio. Em estudo realizado no município de Saquarema, foi uma das espécies mais abundantes no peridomicílio (Brazil *et al.* 2011). Corroborando com o relato de Rangel & Lainson (2003), denota um com notável grau de antropofilia, sugando ainda animais domésticos, como cães e galinhas, o que está em concordância com a situação observada no ambiente da área 4.

Mg. migonei já encontrada naturalmente infectada em São Paulo (Pessoa & Pestana, 1940; Pessoa & Coutinho, 1941), em Baturité no estado do Ceará por *L. (V.) braziliensis* (Azevedo *et al.* 1990; Azevedo & Rangel 1990; de Queiroz *et al.* 1991) e em Pernambuco, por *L. infantum* (Carvalho *et al.* 2010). Também foram registrados casos autóctones de LV, na cidade de La Banda, Argentina (Salomón *et al.* 2010), e em São Vicente Ferrer, no Brasil, onde se constatou a presença de *Mg. migonei* e a ausência de *Lu. longipalpis*. Em São Vicente Ferrer, foi comprovada a infecção natural de *Mg. migonei* por *Leishmania infantum chagasi* (Carvalho *et al.* 2010). Em Fortaleza, *Mg. migonei*, possivelmente, compartilha com *Lu. longipalpis* o papel de vetor da LV (Silva *et al.* 2014).

No Rio de Janeiro, Rangel *et al.* (1986 e 1990) mostraram que *Mg. migonei* foi a segunda espécie mais encontrada, em trabalhos realizados em Vargem Grande e

Mesquita, respectivamente, sendo que na primeira localidade foi a espécie que mais sugou o cão, o que levou os autores a sugerirem o possível papel desta espécie na participação da transmissão da leishmaniose tegumentar canina naquela área.

Em trabalho anterior, na região da Serra da Tiririca, sugerimos que a espécie *Mg. migonei* poderia estar assumindo o papel de espécie vetora de leishmaniose tegumentar na região (Fuzari et al. 2013). Em virtude dos recentes relatos de casos de leishmaniose visceral canina na região do presente estudo (Nunes 2015), podemos aventar a possibilidade de ter um papel relevante como vetor na área do presente estudo.

Dentre os diferentes gêneros de flebotomíneos encontrados, *Evandromyia* foi o segundo mais abundante nas coletas, representado pelas espécies *Ev. cortelezii*, *Ev. edwardsi*, *Ev. tupynambai*, e esteve presente em todas as áreas estudadas, sendo que esta última representou 21,07% do total das espécies coletadas no presente trabalho.

Ev. tupynambai foi descrita por Mangabeira (1942) e tem seu holótipo com espécimes capturados no município de Campos, Rio de Janeiro e segundo o autor está associada a roedores silvestres. Sua distribuição geográfica restringe-se a poucos estados das região Nordeste e em toda região Sudeste, com exceção apenas de SP (Galati, 2015). No estado do Rio de Janeiro, já foi encontrada no Parque Nacional de Itatiaia, em Petrópolis, Ilha Grande (Afonso et al. 2007; Souza et al. 2002, Carvalho et al. 2013) e foi registrada pela primeira vez nos municípios de Niterói e Maricá, em 2010 (Fuzari et al. 2013). Desde então, essa espécie vem se mostrando presente tanto nas armadilhas localizadas em ambientes de mata (ambientes silvestres) como em áreas dos peridomicílios. De acordo com o Índice de Constância, foi considerada Constante em todos os locais de captura. Isso nos leva a reforçar, como foi sugerido em Fuzari 2013, que é uma espécie com frequência no ambiente silvestre, estando em processo de adaptação a outros ambientes e se mostrando eclética quanto a sua fonte alimentar. A referida espécie foi encontrada, em algumas armadilhas no peridomicílio, dentro de galinheiros (Fig. 5.6 e 5.7); e sua antropofilia já havia sido observada por Mayrink et al. (1979) em Minas Gerais. No presente estudo, observamos um número maior de fêmeas capturadas comparado ao de machos, mesmo considerando a existência de fêmeas ainda não identificadas, o que revela a representatividade quantitativa da espécie (Tabela 5.1) contrariamente foi observado por Aguiar et al. (1985), onde *Ev. tupynambai*

nas coletas com armadilhas luminosas o número de machos atraídos foi mais representativo.

Em relação à segunda espécie do gênero, *Ev. edwardsi* (Mangabeira, 1941), a espécie foi descrita pela primeira vez em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro e tem sua distribuição geográfica mais restrita às regiões Sudeste e Sul, e nos estados da Bahia e Maranhão (Galati, 2015). Em nosso estudo representou 2,0% do total das espécies coletadas e foi considerada na categoria Constante nas áreas 1 e 2, e nas trilhas. Na área 2 (mata Itacoatiara), esteve presente em todas as armadilhas deste ambiente, apenas com 2 espécimes na área 3 e não mostrou frequência nas armadilhas da área 4. Nestes últimos ambientes descritos com característica peridomiciliares, estão em concordância os encontrados na Serra do Mar por Aguiar *et al.*, (1993). No estado do Rio de Janeiro, *Ev. edwardsi* foi registrada em praticamente todos os municípios (Aguiar *et al.* 1996; Afonso *et al.* 2007; Souza *et al.* 2003; Rangel *et al.* 1990; Souza *et al.* 2002; Souza *et al.* 2001; Fuzari *et al.* 2013).

A terceira espécie representante deste gênero no presente estudo, *Ev. cortelezzii*, juntamente com *Ev. sallesi* e *Ev. corumbaensis* formam o complexo *cortelezzii*. São espécies semelhantes morfológicamente e muitas vezes confundidas, gerando erros em sua identificação (Carvalho *et al.* 2009). Apenas a fêmea de *Ev. corumbaensis* pode ser facilmente separada das demais espécies desse complexo (Carvalho *et al.* 2009).

Ev. cortelezzii possui uma ampla distribuição no território brasileiro, atingindo alguns estados de todas as regiões do país (Galati, 2015); no Rio de Janeiro é registrada em Petrópolis, Lage de Muriaé, Mesquita e no bairro de Jacarépagua na cidade do Rio de Janeiro (Rangel *et al.* 1990; Pita-Pereira *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2009; Fuzari *et al.* 2013; Peres-Dias *et al.* 2016). No atual estudo, representou 2,68% dos espécimes capturados, mas somente foi encontrado na área 4 (Morro das Andorinhas) em ambiente de peridomicílio e classificado dentro da categoria Constante.

Recentemente, foi designada a importância epidemiológica atribuída às espécies *Ev. cortelezzii* e *Ev. sallesi*, devido ao registro de infecção natural por *Leishmania* em Minas Gerais (Carvalho *et al.* 2008, Saraiva *et al.* 2009; Saraiva *et al.* 2015).

Micropygomyia foi o terceiro gênero mais abundante (Fig. 5.2), representado apenas pela espécie *Mi. schreiberi*. Sua distribuição geográfica restringe-se às regiões

Sudeste e Nordeste (Galati, 2015). No estado do Rio de Janeiro, já teve seu registro em alguns municípios (Rangel et al. 1986; de Aguiar et al. 1993; De Oliveira et al. 1995; Aguiar et al. 1996; Souza et al. 2003; Fuzari et al. 2013; Peres-Dias et al. 2016). No bairro de Santa Cruz, cidade do Rio de Janeiro sua frequência foi de 80% dos flebotomíneos capturados (Oliveira et al. 1995).

A espécie *Mi.schreiberi* atingiu 16,39% de representatividade entre os espécimes coletados, e esteve presente em todas as áreas avaliadas neste estudo. Foi a espécie mais abundante na área 1 (Mirante), porém também revelou grande representatividade nas outras áreas, sendo classificada como espécie constante em todas elas, de acordo com as análises efetuadas. Estudos anteriores, mostraram a frequência de *Mi.schreiberi* em ambientes de floresta, no intra e peridomicílio (De Oliveira et al. 1995; Souza et al. 2003), assim como foi observado por Fuzari (2013), em estudo realizado na mesma região; esteve presente no peridomicílio (galinheiro), em área de transição de ecótopos, e nas matas. De acordo com Aguiar et al. (1996), *Mi.schreiberi* apresentou atração por roedores em capturas efetuadas com armadilhas Disney, porém, mostrou tendência a adaptação às áreas do peridomicílio.

Algumas espécies desse grupo já foram associadas a répteis sugerindo que elas se alimentam desses animais, e, até o momento não apresentam importância médica.

O quarto gênero mais encontrado neste trabalho foi *Brumptomyia*. As espécies desse gênero possuem caracteres morfológicos bem marcantes, fáceis de diferenciá-los dos outros gêneros. São insetos geralmente associados a tocas de tatus e sem interesse médico (Shimabukuro, 2007).

Duas espécies representaram esse gênero, *Br. cunhai* (Mangabeira, 1942) com 5,51% e *Br. nitzulescui* (Costa Lima, 1932) com 4,39% dos espécimes capturados. Ambas as espécies foram consideradas Constantes em 2 áreas trabalhadas, na área 2 e nas trilhas. Sendo que *Br. cunhai* esteve presente em todos os outros ambientes também, enquanto *Br. nitzulescui*, não teve registro somente na área 4.

A quarta espécie mais abundante durante todo o período das coletas foi *Br. cunhai* e a quinta mais frequente, *Br. nitzulescui*. A alta proporção de espécimes encontrados no presente estudo, nos leva a sugerir que o ambiente estudado apresenta uma fauna bem equilibrada com a presença de mamíferos edentados, que representam a principal fonte alimentar para esses flebotomíneos (Young & Duncan, 1994).

As duas espécies possuem uma distribuição ampla por todas as regiões brasileiras, com exceção de *B. nitzulescui* que ainda não teve registro na região Norte (Galati, 2015).

Nyssomyia intermedia (Lutz & Neiva, 1912) espécie tipo do gênero, foi registrada com 3,24% dos insetos coletados, e é considerada um dos principais vetores de *Leishmania braziliensis* no Brasil. Sabe-se que junto com *Ny. neivai* formam um complexo de espécies (Marcondes *et al.* 1996) e sua distribuição geográfica vai desde o estado do Piauí até o do Rio Grande do Sul e do litoral do Brasil ao norte da Argentina e sul da Bolívia, ocorrendo em áreas de clima e altitude bastante diversificados. Ainda não foi registrada na região Norte do país (Galati 2015). As áreas em que *Ny. intermedia* tem sido encontrada são mais quentes e úmidas que as de *Ny. neivai*, esta espécie parece mais adaptada que a primeira a regiões de clima mais frio e seco, como os do interior de São Paulo (Marcondes *et al.* 1998).

No estado do Rio de Janeiro não é diferente, *Ny. intermedia* tem uma distribuição bem ampla, sendo encontrada, na maioria das vezes, como a espécie mais freqüente (Rangel *et al.* 1984, 1986, 1990; Brazil *et al.* 1991; de Aguiar *et al.* 1993; Souza *et al.* 2001, 2002; Souza *et al.* 2003; da Costa *et al.* 2004; Alves, 2007; Brazil *et al.* 2011; Novo *et al.* 2013). No presente estudo, esta espécie também não esteve presente nos ambientes silvestres do PESET, corroborando com os estudos realizados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos e no Parque Nacional de Itatiaia, onde também não teve registro (Aguiar *et al.* 1984; Afonso *et al.* 2007). Esteve presente somente na armadilha das trilhas, onde foi classificada dentro da categoria Constante, e com apenas um espécime registrado no peridomicílio (área 3), sendo considerada uma espécie Acidental, de acordo com o Índice de Constância. Em trabalhos anteriores (Brazil *et al.* 1989, 1991) realizados nesta região, *Ny. intermedia* sempre foi a espécie dominante e capturada em alta densidade, entretanto foi observada uma mudança na distribuição fauna, onde *Mg. migonei* passou a ser a espécie dominante no peridomicílio e *Ny. intermedia* aparece em menor densidade e num quantitativo menor de localidades, corroborando ao observado por Fuzari (2013) na mesma localidade.

Ny. intermedia foi encontrada naturalmente infectada com *Leishmania (V.) braziliensis* em 1922, no atual bairro de Laranjeiras quando Aragão, ao estudar um foco de leishmaniose na cidade do Rio de Janeiro, incriminou esta espécie como vetor

potencial. Rangel *et al.* (1984), em área endêmica de LTA em Jacarepaguá e Vargem Grande, também registraram a infecção natural por *Leishmania* nesta espécie. Essas evidências, bem como a predominância de *Ny. intermedia* nos focos da doença e sua frequência no domicílio e peridomicílio, contribuem para que seja incriminada como a principal transmissora dessa parasitose no estado do Rio de Janeiro (Oliveira-Neto *et al.* 1988; Rangel *et al.* 1990; de Aguiar *et al.* 1993; Souza *et al.* 2002, 2005; Alves, 2007).

Em análises de infecção natural, por técnicas moleculares (PCR Multiplex), Pita-Pereira e colaboradores (2005) mostraram que *Ny. intermedia* e *Mg. migonei*, espécies predominantes coletadas no Parque da Pedra Branca, em Jacarepaguá, no município do Rio de Janeiro, foram encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania (V.) braziliensis*.

Psathyromyia pelloni esteve presente nas trilhas e nas áreas 1 e 3, nesta última, foi uma das espécies mais frequentes (Fig. 5.6 e 5.4) sendo classificado na categoria Assessório e nas outras localidades em uma proporção muito menor. Em muitos casos *Ps. pelloni* tem sido confundido com *Ps. lanei*, sendo necessária a presença do macho para sua identificação específica. Fuzari *et al.*, (2013) identificaram um pequeno número de flebotomíneos como *Ps. lanei*, porém, na verdade se tratava de *Ps. pelloni*, corroborando com os registros de Brazil *et al.* (1991).

Ps. pelloni possui uma distribuição geográfica que atinge as regiões Sul, Sudeste e o estado da Bahia (Galati, 2015). No estado do Rio de Janeiro, já foi assinalada em Vargem Grande e em Jacarepaguá, no município do Rio de Janeiro (Rangel *et al.* 1986; Souza *et al.* 2015).

Pintomyia bianchigalatae, tem sua distribuição restrita à região Sudeste e ao estado do Paraná (Galati 2015). No Rio de Janeiro foi registrada no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Itaguaí, Paracambi, Parque Nacional da Bocaina, Angra dos Reis, Paraty e Niterói (Andrade-Filho *et al.* 1999; Fuzari *et al.* 2013).

Pi. bianchigalatae no presente trabalho, só não foi encontrada na área 4 mata em Itacoatiara e registrada em todas as outros locais de estudo. Não há até a presente data qualquer indicação de sua importância epidemiológica na transmissão das leishmanioses.

É importante relatar que em trabalhos anteriores na mesma região, Brazil e colaboradores (1989,1991) registraram *Pi. fischeri* presente no peridomicílio como espécie frequente, entretanto ela não foi observada em capturas do presente estudo.

Mg. migonei, *Mi. schreiberi* e *Ev. tupynambai* juntas somam 77,3% de todas as espécies coletadas neste trabalho e estiveram presentes em todas as áreas trabalhadas (Tabela 5.3).

Dentre as espécies capturadas na região da Serra da Tiririca, podemos destacar ainda, *Lutzomyia longipalpis* principal vetor da LV no Brasil e o mais importante das Américas (Gontijo & Melo, 2004; Rangel & Lainson, 2005). A espécie possui uma ampla distribuição geográfica e ainda parece estar em franca expansão. Há pouco tempo era encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste, recentemente, foi registrada nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul (Souza et al. 2009; dos Santos et al. 2012; Galati, 2015). No estado do Rio de Janeiro sua distribuição é restrita a alguns municípios, tendo sido encontrada em 1978, na Ilha Grande, por Araújo Filho. Desde então com o aparecimento de casos de LV no município do Rio de Janeiro vem se constatando sua presença em outros municípios (Souza et al. 1981; Rangel et al. 1986, 1990; Brazil et al. 1989; Souza et al. 2002; Cabrera et al. 2003; Pita-Pereira et al. 2005; Brazil et al. 2011; Carvalho et al 2013; Souza et al. 2015).

Fuzari (2013) fez o primeiro relato desta espécie no município de Niterói, capturando apenas dois exemplares de *Lu. longipalpis* na mata de Itacoatiara. Na ocasião, sugeriu que esta população fosse eminentemente silvestre, já que em trabalhos anteriores em áreas modificadas nessa região, nunca havia sido encontrada (Brazil et al. 1991). *Lu. longipalpis* já tinha sido registrado no município de Rio Bonito, (Brazil et al. 1989) e mais recente, estudos no município de Saquarema (Brazil et al, 2011) mostraram também a presença desta espécie em área de transição de Mata Atlântica. Em nossos estudos, já no primeiro ano de coletas, foi observado e relatado o aumento do número de exemplares de *Lu. longipalpis*, em comparação ao estudo anterior (Fuzari et al. 2016). Em continuidade ao presente estudo, confirmou-se um aumento considerável do número de exemplares capturados de *Lu. longipalpis*, 90 espécimes (2,27%), em relação à investigação anterior. Atualmente, além da área 2

(mata de Itacoatiara), foi capturado também nas áreas 1 e 4, Mirante e Morro das Andorinhas respectivamente, porém, em número reduzido.

O registro de *Lu. longipalpis* nesta localidade reveste-se de grande relevância, pois há relatos do aumento do número de casos de leishmaniose visceral canina em localidades dos municípios de Niterói e Maricá (De Paula et al. 2009; Oliveira et al. 2015; Abrantes et al. 2016). É de conhecimento que no Brasil a LV canina coexiste com a LV humana em todos os focos conhecidos e ela precede a ocorrência de casos humanos (Kumar et al. 1999; Barnett et al. 2005; Bern et al. 2005).

Numa perspectiva futura, cremos ser necessária a continuação do presente estudo, no sentido de avaliar e monitorar potenciais mudanças comportamentais na população de *Lu. longipalpis* encontrada em Itacoatiara, ainda que possa ser considerada uma população isolada (Souza et al. 2008; Araki et al. 2009) ou, de acordo com nossos resultados, se essa população esteja em processo de expansão para outras localidades.

Estudos prévios, com armadilhas direcionadas para a captura de *Lu. longipalpis*, foi utilizado o feromônio sexual sintético, (\pm)-9-metilgermacreno-B, como atrativo, e os resultados obtidos foram surpreendentes, já que foi possível verificar um aumento expressivo na quantidade de espécimes coletados. Isso indica que essa estratégia possa ser uma ferramenta de grande valor na captura de *Lu. longipalpis* e também pode ser utilizada com fins de monitoramento e ainda possivelmente como uma nova estratégia de controle desta espécie (Barbosa et al. 2015).

A LV é uma zoonose que vem tomando um aspecto urbano. E tem os cães como importante reservatório do agente etiológico, a *Leishmania infantum*. Basicamente, para a ocorrência da doença em uma determinada área, depende da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório também susceptível (Marzochi et al. 2009), características já aferidas na região. Portanto, continuamos sugerindo a necessidade de maiores estudos, principalmente, no que se refere à população de *Lu. longipalpis* local.

Apesar da ocorrência da doença canina na região, ainda não é possível, associar os cães aos casos humanos (Madeira et al. 2000; Serra et al. 2003).

Recentemente, De Paula et al. (2009) relataram o primeiro caso autóctone de LV canina no município de Maricá. Em áreas urbanas os cães domésticos são considerados os principais reservatórios de *L. infantum*, reforçando o papel desse

animal como um elo importante no ciclo epidemiológico da doença. Os movimentos migratórios humanos com seus animais, associado às alterações ambientais são fatores importantes na disseminação de certas doenças (Shaw, 2007). O município de Maricá vem passando por esse processo de significativas modificações ambientais, principalmente nas atividades de veraneio (Serra et al. 2003).

Outro aspecto relevante é a capacidade de domiciliação de *Lu. longipalpis* em ambientes modificados (Lainson & Rangel, 2005), assim como foi relatado e identificado na região, em relação à espécie, no presente trabalho.

6.2 - Estudo da infecção natural por *Leishmania sp.* nas fêmeas de flebotomíneos

Nas análises de infecção natural por *Leishmania spp.*, realizadas em 500 fêmeas de flebotomíneos, foram detectados dois espécimes de *Ev. tupyngambai* naturalmente infectados por este protozoário e um exemplar de *Mi. schreiberi* (Tabela 5.5) e um quarto espécime, o qual designamos *Evandromyia spp.*, que por problemas na montagem, não foi possível efetuar a identificação específica. Todos esses espécimes foram capturados na mesma área de estudo (área 2), na mata em Itacoatiara. Neste ambiente, o gênero *Evandromyia* foi o de maior representatividade, com apenas 2 espécies encontradas, *Ev. tupyngambai* e *Ev. edwardsi*. Assim, é factível considerar que a espécie não identificada, provavelmente seja uma das duas citadas anteriormente.

Como já registrado, *Ev. edwardsi*, foi encontrada naturalmente infectada em São Paulo (Sucen, 2005), o que levantou a hipótese de um possível papel como vetor da LT nessa região, porém é necessário outras investigações entomológicas no sentido de sugerir como potencial vetora da área de estudo.

Ev. tupyngambai e *Mi. schreiberi*, no presente trabalho, tiveram o seu primeiro registro de infecção natural por *Leishmania sp.* Essas espécies de flebotomíneos ainda não foram devidamente avaliadas, portanto, há um escasso conhecimento sobre a biologia, aspectos comportamentais e fonte alimentares das espécies citadas, assim, somente podemos considerar os resultados apresentados no presente estudo.

Por ter sido a segunda e a terceira espécie mais abundante, respectivamente, nesta pesquisa e terem sido encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania sp.*, e como ainda não temos a identificação do parasita, não podemos inferir a possibilidade de serem espécies vetoras na localidade. Para tanto, é necessário a execução de

outros estudos e investigações para que tenhamos elementos que possam incriminá-las como tais. Com isso, se abre outra gama de futuras pesquisas nesta região.

Há relatos de outras espécies do gênero *Micropygomyia* que se alimentem de animais de sangue frio (Deane e Deane, 1957), o que levanta a possibilidade, que a espécie *Mi. schreiberi* esteja infectada com *Leishmania* específica desses répteis e sem importância médica ou epidemiológica. No entanto, *Mi. quinquefer*, já foi encontrada com infecção natural por *Leishmania braziliensis*, em estudo realizado no Mato Grosso do sul (Paiva *et al.*, 2010), e em Minas Gerais (Souza, 2011).

Diferentes aspectos estão correlacionados no enfrentamento e dificuldades para que consiga algum sucesso no controle da leishmanioses, dentre eles a diversidade de espécies de parasitos, de vetores e de reservatórios mamíferos. A taxa de flebotomíneos naturalmente infectados nas áreas endêmicas se reveste de grande importância para a epidemiologia das leishmanioses (Afonso *et al.* 2013).

6.3- Estudo de fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneos

Estabelecer o padrão alimentar dos insetos hematófagos é tarefa de grande importância para o entendimento de sua biologia, além de possuir valor fundamental para a Saúde Pública. A identificação das fontes alimentares desses hematófagos tornou-se uma informação importante para o delineamento de estratégias de controle de vários agravos transmitidos por esses insetos (Ngumbi 1992; SAvenge 1993; Duarte 1997).

Diante disso, em nosso estudo, foi utilizado para o diagnóstico de fonte alimentar 78 fêmeas de flebotomíneos, das seguintes espécies *Ev. tupynambai*, *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei*, e os resultados obtidos foram duas espécies diferentes de aves, *Gallus gallus* (galinha) e *Cairina moschata* (pato-do-mato). O resultado em relação à primeira fonte alimentar de uma certa forma já se esperava pois a maioria das fêmeas de *Mg. migonei* foram capturadas em galinheiros. Quanto ao resultado da segunda fonte, *Cairina moschata* (pato do mato), também não nos causou surpresa, pois em um dos galinheiros, haviam alguns patos que dividiam o espaço com os galináceos.

Dentre as espécies capturadas no estudo, *Mg. migonei* foi aquela com maior números de exemplares ingurgitados, 69 amostras, a maioria delas coletadas dentro ou próximo a galinheiros, no Mirante (área 1) e no Morro das Andorinhas (área 4).

A espécie *Mg. migonei* tem o hábito alimentar com notável grau de antropofilia, sugando ainda animais domésticos, como cães e galinhas (Rangel & Lainson 2003; Falqueto 1997). Em Vargem Grande, no município do Rio de Janeiro, foi aquela que mais sugou o cão, levantando a possibilidade desta espécie apresentar algum papel relevante no ciclo da transmissão da leishmaniose tegumentar naquela área. Esta espécie já foi incriminada como vetor domiciliar da LT (Vieira et al 2012; Falqueto 1997) e mais recentemente, também incriminado como possível vetor de LV em cães (Carvalho et al. 2010).

Uma fêmea de *Lu. longipalpis* foi encontrada ingurgitada, capturada no Mirante (área 1) e teve similaridade total com a fonte alimentar *Gallus gallus*. Esse ambiente, como já descrito, possuía características de ambiente silvestre e peridomiciliar, inserido em uma mata, e possuía uma residência, anexos e pessoas, num mesmo local.

Registros na literatura tem mostrado o ecletismo de *Lu. longipalpis* em se alimentar em uma variada gama de mamíferos, que incluem cães, porcos, equinos, bovinos, além das aves (Deane 1956; Zeledon et al 1984;). Estudos realizados com a mesma espécie, revelaram positividade para a fonte alimentar humana (61,5%), seguido de cão (28,2%) e aves (10,3%) (Afonso et al. 2013).

Análises através do teste imunoenzimático ELISA, detectaram sangue de gambá em espécimes de *Lu. longipalpis* procedentes de Jequié (BA), Sobral e Massapê (CE), revelando a associação entre *Lu. longipalpis* e os gambás (Afonso et al. 2012).

A antropofilia de *Lu. longipalpis* e o encontro deste, dentro de domicílios, já foi descrita em diversos trabalhos (Lainson & Rangel 2005; Silva et al. 2014; Casanova et al. 2015), e essa capacidade antropofílica configura como um dos critérios essenciais para que uma espécie seja incriminada como vetor (Killick-Kendrick 1990). Esta característica, juntamente com a abundância de fontes alimentares e às condições ambientais favoráveis, é determinante no crescimento populacional do vetor, especialmente em áreas periurbanas, o que propicia sua aproximação ao homem (Afonso et al 2013).

As fêmeas de *Ev. tupyngambai* capturadas contendo sangue em seu tubo digestório, foram encontradas nas localidades da mata de Itacoatiara (área 2) e no Mirante (área 1). Como já discutido anteriormente, esteve presente tanto nas armadilhas em ambientes de mata (silvestre) como no peridomicílio, este último, sendo

um misto de ambientes, por ser uma residência inserida no meio da unidade de conservação.

Nos exemplares examinados de fêmeas de *Ev. tupyngambai* para o diagnóstico de fonte alimentar, a espécie detectada foi *Gallus gallus*. Para os ambientes de peridomicílio, considerando aqui, além da área 3 e 4, também as área 1, por suas características mistas de ambientes, fica bem claro o resultado obtido. No entanto, no ambiente silvestre (área 2) em Itacoatiara, não fez muito sentido. Portanto, podemos sugerir, que apesar da similaridade alta, a possibilidade, da fonte alimentar neste local, ser algum outro tipo de ave, talvez aves marinhas, que ainda não tenha seu DNA identificado no banco para consultas.

Em sua descrição original, *Ev. tupyngambai* (Mangabeira, 1942), foi associada a roedores silvestres, o que também faria sentido, levando-se em consideração que esta espécie foi uma das mais frequentes nas armadilhas instaladas nas trilhas, durante as coletas de pequenos mamíferos (Fig. 5.10 e Tabela 5.9). O que nos leva a sugerir, mais uma vez, que é uma espécie que se encontra bem adaptada, se mostrando eclética quanto a sua fonte alimentar.

As aves, mesmo sendo consideradas refratárias à infecção por *Leishmania* spp. (Dias *et al.*, 2003), tem sido tema de bastante discussão sobre o seu papel na epidemiologia das leishmanioses. Estudos de fonte alimentar demonstram a participação, mesmo que indireta, de *Gallus gallus* no ciclo da *Leishmania* spp. Lopes (2014) relatou fonte alimentar em *Gallus gallus* em 25% das amostras nos seus estudos. Tanure e colaboradores (2015), demonstraram fonte alimentar por *Gallus gallus* em 43,6% das amostras, em estudo de município de Governador Valadares, empregando ensaio imunoenzimático. O papel de *Gallus gallus* e *Cairina moschata*, mesmo que ainda não tenham sido sugeridos como reservatórios de *Leishmania* spp., são importantes, uma vez que, essas espécies ajudam a manter o ciclo de vida dos flebotomíneos nas áreas urbanas.

O conhecimento sobre as preferências alimentares das fêmeas de flebotomíneos permite uma avaliação e planejamento coerentes, em relação ao emprego de medidas eficazes e adequadas para o controle desses vetores. O entendimento sobre aspectos do comportamento e a biologia dos flebotomíneos são importantes não apenas para um melhor entendimento do curso da parasitose (Forattini 1973; Dias-Sversutti 2007), como

nas investigações da relação hospedeiro-vetor e conseqüentemente na ecoepidemiologia das leishmanioses, mas também para a compreensão dos hábitos alimentares destes insetos, o que poderá resultar em dados e indícios dos potenciais reservatórios que estariam mantendo o ciclo enzoótico, além de melhor avaliar o grau de antropofilia das espécies (Tesh 1971; Nery 2004; Afonso 2005, 2012).

6.4 - Fauna de pequenos mamíferos

A mastofauna do estado do Rio de Janeiro é pouco conhecida devido à escassez de inventários faunísticos e a problemas taxonômicos (Bergallo et al 2000). Mesmo assim e após a devastação de grande parte das suas matas, o Estado ainda abriga uma grande riqueza de mamíferos terrestres com 166 espécies (Rocha et al. 2004). Este valor corresponde a 66,4% das espécies de mamíferos com ocorrência conhecida para a Mata Atlântica (Reis et al. 2006).

A fauna encontrada no PESET, de acordo com o seu plano de manejo, é típica da Mata Atlântica, com ocorrência de 408 vertebrados, sendo 77 mamíferos (excluindo cetáceos), 77 répteis (incluindo animais marinhos), 55 anfíbios e 199 aves. Só na porção continental do parque, tem relatos de mamíferos, como cutia, paca, tamanduá-mirim, preguiça, ouriço-cacheiro, tatu-galinha, gato-do-mato-pequeno e cuíca; répteis como jiboia, jararaca, jararacuçu e caninana; anfíbios (rãzinha-piadeira e sapo-cururu) e aves como, curió, trinca ferro e coleiro.

Espécies endêmicas foram registradas, como a perereca do litoral (*Scinax littoreus*), e também espécies ameaçadas de extinção, como o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). Também fazem parte da fauna desta unidade de conservação, 14 espécies exóticas, lagartixa-de-parede, pombo-doméstico, micos-estrelas, mico-leão-de-cara-dourada, cão e gato domésticos.

Os mamíferos da fauna do PESET aparentam ser os representantes que se encontram, de forma geral, em maior risco. As populações residentes estão em número reduzido e sofrendo grande pressão antrópica. As formas presentes são as de pequeno e médio portes, que ainda são caçadas por moradores da periferia como atividade de lazer. A paca e a preá-do-mato são as mais procuradas, estando a primeira em risco de extinção devido também à reduzida área do parque e sua baixa taxa de natalidade. Cabe ressaltar que este levantamento baseia-se em estudos realizados principalmente

na Serra da Tiririca, na porção marinha do parque e no estudo para o *Plano de Manejo do Parque Natural Municipal Darcy Ribeiro*.

Estudos faunísticos sobre a Serra da Tiririca são registrados desde a década de 1980 (Pontes, 1987), sendo que diversos trabalhos encontram-se em andamento nesta região. Apesar disso, o nível de conhecimento sobre as comunidades faunísticas ainda pode ser considerado incipiente.

As coletas de pequeno mamíferos realizadas no presente trabalho, com certeza, serviram para aumentar e atualizar esse levantamento faunístico da região. Em nossas coletas foram registrados a captura de 32 animais, dentre estes, 59,4% pertenciam a ordem Didelphimorphia, e 40,6% a ordem Rodentia (Fig. 5.21). Entre os marsupiais, cinco espécies de cinco gêneros diferentes foram identificadas (Fig. 5.22) e apenas três espécies de dois gêneros de roedores. (Fig. 5.23).

Os roedores vivem em qualquer ambiente terrestre que lhes dê condições de sobrevivência e possuem uma capacidade extraordinária de adaptação ecológica, suportando os mais variados tipos de climas, desde mais frios aos mais tórridos, nas regiões de florestas e também nas mais estéreis; suportam grandes altitudes e em cada região podem mostrar um grande número de adaptações fisiológicas. Algumas espécies são consideradas sinantrópicas por associarem-se ao homem em virtude de terem seus ambientes prejudicados pela ação do próprio homem (MS 2002).

As espécies capturadas em nossas coletas são classificadas, de acordo com o manual de controle de roedores, como roedores sinantrópicos não comensais (silvestres) (MS 2002). Estes formam suas colônias no ambiente silvestre longe do contato com o homem, mas em função das modificações ambientais decorrentes dos processos de urbanização e de transformação de ecossistemas naturais, essa divisão de silvestres, sinantrópicos comensais e não comensais não é permanente. Por conta da escassez de alimentos, os roedores acabam expandindo suas colônias, se aproximando das plantações, de anexos no peridomicílio e no próprio domicílio em busca de alimentos; este fato amplia o contato do homem e roedor silvestre. Algumas espécies, hoje, apresentam populações com elevado grau de sinantropia. Gerando um grande risco de transferência de agentes infecciosos dessas espécies para os roedores estritamente comensais (MS 2002).

O gênero *Trinomys*, pertence à Família Echimyidae, Subfamília Eumysopinae, e foi representado pelas espécies *Trinomys eliasi* e *Trinomys sp.*, em nossas expedições. *Trinomys eliasi* representou 31,25% de todos os espécimes capturados. Possuem, por características gerais, tamanho médio a grande, cauda igual ou ligeiramente menor que o comprimento do corpo, pelagem espinhosa. Coloração castanho-alaranjada, tracejada de preto por pelos guarda escuros, mais clara nas laterais. Cauda com pelos curtos. Superfície superior das patas clara, dígitos com pelos ungueais claros. Tem hábitos terrestres, habita áreas florestadas da Mata Atlântica e áreas de transição com o Cerrado e com a Caatinga (Bonvicino et al. 2008). A distribuição de *Trinomys eliasi* é bem restrita a uma parte do estado do Rio de Janeiro (Pessoa & Reis, 1993; Bonvicino et al. 2008).

Outro gênero encontrado em nossos estudos, o *Oligoryzomys* que pertence à Família Cricetidae, Subfamília Sigmodontinae. Anteriormente pertencente ao gênero *Oryzomys*, este novo gênero inclui mais de 10 espécies, todas muito parecidas o que dificulta a distinção entre elas no campo. (MS 2002). Espécies desse gênero, em algumas localidades são conhecidas pelo nome popular de “rato-de-fava ou rato-de-cacau”. São arvícolas, entretanto constroem seus ninhos em amontoados de folhas, pequenos buracos no solo e até mesmo tocos secos caídos ao chão, nas matas e nos campos. Também são encontrados em culturas de milho, arroz e cacau (MS 2002).

Oligoryzomys nigripes representou 3,1% dos espécimes coletados. Tem por características gerais, tamanho pequeno, comprimento da cauda maior que o do corpo. Coloração castanho-avermelhada a amarelada, com as laterais mais claras, olhos grandes. Patas longas e finas cobertas de pequenos pelos claros. Cauda fina e pouco pilosa. Seu habitat terrestre, em formações florestais abertas da Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal (Bonvicino et al. 2008). Possui distribuição ampla, desde Pernambuco ao norte do Rio Grande do Sul, em Minas Gerais e no Distrito Federal (Weksler & Bonvicino, 2005; Bonvicino et al. 2008). No estado do Rio de Janeiro, esta espécie também já foi encontrada no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, na Serra da Concórdia, no Parque Estadual do Desengano (Olifiers et al. 2007; Prevedello et al. 2008; Modesto et al. 2008a; Modesto et al. 2008b).

Em nossas análises para detecção de infecção por *Leishmania sp.*, todas as amostras desses pequenos mamíferos capturados, foram negativas. (Fig. 5.24) Mas a

participação de roedores na epidemiologia das leishmanioses já foi descrita por vários autores.

Lainson e Shaw (1970) detectaram pela primeira vez *Le. braziliensis* em roedores do gênero *Oryzomys* no estado de Mato Grosso. Em outros estudos, os mesmos autores, detectaram o roedor *Proechimys guyannensis* constantemente parasitado por *Le. amazonensis*, no Pará (Lainson e Shaw 1972). Forattini e colaboradores (1972), também isolou *Leishmania* em roedores das espécies *Akodon arviculoides* e *Oryzomys nigripes* em região endêmica para LT em São Paulo. Esta última espécie, sendo uma das capturadas em nossas expedições.

Outras espécies de roedores já foram relatadas como possíveis reservatórios para *Leishmania*. No Espírito Santo, observaram flebotomíneos atraídos pelo *Proechimys iheringi*, numa área onde esse roedor foi achado naturalmente infectado por *Leishmania mexicana ssp.* (Falqueto et al., 1985). No estudo em questão, 98,1% dos espécimes coletados foram *Lutzomyia gasparviannai*, o que sugere que essa espécie, não antropofílica, seja o transmissor entre os roedores, mas não habitualmente ao homem.

Em Pernambuco foi detectado DNA de *Le. infantum*, em amostras de roedores silvestres *Nectomys squamipes* (Carvalho et al 2005; Dantas Torres e Brandão-Filho 2006), enquanto que na Bahia, isolaram *Le. braziliensis* nesta mesma espécie de roedor (Peterson et al. 1988). Roque e colaboradores (2010) avaliaram o papel de *Trichomys laurentius* na retenção de infecção e amplificação do ciclo de transmissão de *Le. infantum* e *Le. braziliensis*, demonstrando a capacidade de ambas espécies, de invadir e manter-se nas vísceras e pele do roedor.

A ordem Didelphimorphia é a única ordem de marsupiais reconhecida nas Américas. O gênero *Didelphis* é o mais disperso no continente, principalmente devido à sua notável capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos. São encontrados com facilidade em florestas alteradas pela ação antrópica e vistos com frequências nos quintais das residências situadas nas bordas das matas visitando galinheiros e latas de lixo em busca de alimento (Austad, 1988; Olifiers et al 2005). Estudos indicam serem fonte alimentar preferencial de *Lu. longipalpis*, no Brasil (Sherlock et al. 1984) como de *Pintomyia evansi* na Colômbia (Travi et al., 1994).

Algumas espécies destes marsupiais já foram encontradas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, como *Didelphis* spp. pela *Le. infantum* e *Le. braziliensis* (Sherlock et al. 1984, Silva et al. 2005, Carvalho 2005; Schalling et al. 2007). A presença desses parasitos, em espécies de *Didelphis* está sendo observado em várias áreas do Brasil, em Amaraji, Pernambuco (Brandão-Filho et al. 2003); em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro (Cabrera et al. 2003; Carreira et al. 2009; 2012); Belo Horizonte e São João das Missões, Minas Gerais (Schalling et al. 2007; Quaresma et al. 2011; Ferreira et al. 2015).

Entre os animais coletados no presente trabalho, *Didelphis aurita* (28,12%), foi a segunda espécie mais capturada nas expedições, seguida de *Philander frenatus* (18,75%). Também foi registrado *Metachirus nudicaudatus* (6,25%), *Monodelphis gr. americana* (3,13%) e *Gracilinanus microtarsus* (3,13%).

Com exceção de *Gracilinanus microtarsus*, todas as outras espécies encontradas no presente estudo, também foram registradas no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, na Serra da Concórdia e em Cambuci, todos no estado do Rio de Janeiro (Prevedello et al. 2008; Modesto et al 2008; Albuquerque et al 2013). Nos municípios de Santa Maria Madalena, São Fidélis e Campos dos Goytacazes, onde se localiza o Parque Estadual do Desengano, a fauna encontrada foi exatamente a mesma que capturamos na Serra da Tiririca. Sendo que naquele, foi registrada mais uma espécie, *Marmosops paulensis* (Olifers et al., 2007).

O gênero *Didelphis* é composto por espécies consideradas importantes reservatórios silvestres de agentes patogênicos, *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* já foram encontrados naturalmente infectados, não só por *Leishmania* mas também por *Trypanosoma cruzi* e *Shistosoma mansoni*.

São considerados mamíferos muito bem sucedidos, verdadeiros fósseis vivos cuja morfologia atual não difere significativamente da dos fósseis mais antigos, datados de 55 milhões de anos (Austad, 1988).

D. aurita é encontrado basicamente na Região Sudeste do Brasil. Porém, no Rio de Janeiro, sua presença tem sido registrada, na grande maioria, dos estudos realizados (Rocha et al. 2004; D'Andrea et al. 2007; Olifers et al. 2007; Prevedello et al. 2008; Modesto et al 2008; Albuquerque et al 2013).

Em Santa Catarina, *D. aurita* pode ser encontrado em vários ambientes, na borda de alagados e manguezais, em restingas, no interior da Floresta Atlântica, bem como em áreas urbanizadas, principalmente aquelas próximas de terrenos baldios e fragmentos florestais (Graipel et al., 2001).

Os didelfídeos possuem hábitos generalistas, são noturnos, e com uma dieta muito ampla. São tolerantes aos ambientes degradados pelo homem (Brito et al. 2008).

As espécies de *Didelphis* infectadas podem desempenhar um importante papel na epidemiologia das leishmanioses nos centros urbanos, além da manutenção do parasito na enzootia silvestre, o que faz com que sejam as espécies mais pesquisadas (Sanguinette, 2015). São considerados animais sinantrópicos, podendo atuar na união entre os ciclos de transmissão silvestre e peridomiciliar (Roque et al. 2008).

Várias outras espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos, *Necromys lasiurius*, *Holochilus scieurus*, *Cerradomys subflavus*, *Mus musculus*, *Agouti paca*, *Cavia porcellus* e *R. norvegicus*, foram registradas como hospedeiros, potenciais reservatórios ou reservatórios de *Leishmania spp.* no Brasil, demonstrando a importância destes animais no estudo do ciclo de transmissão da leishmanioses (Silveira et al. 1991; Machado et al 1994; Brandão-Filho et al 2003; Marcelino et al. 2011; de Freitas et al. 2012; Lima et al. 2013; Lara-Silva et al. 2014; Ferreira et al. 2015).

7 – CONCLUSÕES

- A fauna flebotomínica no Parque Estadual da Serra da Tiririca apresentou-se bem diversificada, onde foram encontradas 11 espécies de oito gêneros diferentes;
- As espécies mais abundantes foram *Migonemyia migonei*, *Evandromyia tupynambai* e *Micropygomyia schreiberi* sendo a primeira espécie de maior abundância e a segunda de maior frequência;
- *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia migonei*, reconhecidamente vetoras do agente etiológico causador da Leishmaniose Tegumentar, foram encontradas neste trabalho, onde *Mg. migonei* se mostrou mais abundante que *Ny. intermedia*, sugerindo a possibilidade de *Mg. migonei* ser o principal vetor nesta região;
- *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da *Leishmania infantum*, continua sendo encontrado na região, agora em maior número, sugerindo o início de sua expansão na região;
- A maior diversidade de flebotomíneos foi encontrada na área que corresponde aos peridomícílios de alguns bairros de Niterói; e a área da mata de Itacoatiara tem maior uniformidade, também em Niterói;
- *Evandromyia tupynambai* e *Micropygomyia schreiberi* foram as espécies de flebotomíneos naturalmente infectadas por *Leishmania sp.*;
- *Evandromyia tupynambai* e *Micropygomyia schreiberi* foram relatadas, pela primeira vez, com infecção natural por *Leishmania sp.*;
- *Evandromyia tupynambai*, em Itacoatiara (subsede do PESET), se mostrou a espécie mais abundante e frequente, além do registro de infecção natural por *Leishmania spp.*, sugerindo a possibilidade desta espécie ser a mantenedora do ciclo de transmissão do agente etiológico no ambiente silvestre desta localidade;

- Como fonte alimentar dos flebotomíneos foram encontradas apenas o *Gallus gallus* e *Cairina moschata*;
- Foram encontradas as espécies *Trinomys eliasi*, *Trinomys spp.* e *Oligoryzomys nigripes*, da ordem Rodentia e as espécies *Didelphis aurita*, *Philander frenatus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Monodelphis gr. americana* e *Gracilinanus microtarsus*, da ordem Didelphimorphia;
- Não foi detectado infecção natural por *Leishmania* spp. nos pequenos mamíferos de acordo com as análises realizadas;

8 - Referências

- Abassi, I., Cunio, R., Warburg, A. Identification of bloodmeals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 9, 79–86, 2009.
- Abrantes TR, Madeira MF, Silva DA, Perié CSFS, Mendes Júnior AAV, Menezes RC, SilvaVL, Figueiredo FB. Identification of canine visceral Leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2016; 58:3
- Adhikari SR, Maskay NM. The economic burden of Kala-azar in households of the Danusha and Mahottari districts of Nepal. *Acta Trop.* 2003; 88:1-2.
- Afonso MM, Costa WA, Azevedo AC, Costa SM, Vilela ML, Rangel EF. Data on sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Itatiaia National Park, Rio de Janeiro State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2007 Mar; 23(3):725-30.
- Afonso MMS, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (L.) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American leishmaniasis in northeastern Brazil. *J Trop Med.* 2012; 2012:858657.
- Afonso MMS, Gomes AC, Meneses CRV, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous Leishmaniasis in Brazil. *Cad de Saúde Pública.* 2005; 21:109-18.
- Afonso, Margarete Martins dos Santos. Estudos sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana. [tese]. Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz. 2013.
- Aguiar GM, de Azevedo AC, Medeiros WM, Alves JR, Rendeiro V. Aspects of the ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2014; 56(2):143-9.
- Aguiar GM, de Medeiros WM, dos Santos TG, Klein Ade F, Ferreira VA. Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous leishmaniasis in Paraty, littoral of Rio de Janeiro State (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993 Apr-Jun.; 88(2):339-40.
- Aguiar GM, Medeiros WM, De Marco TS, Santos SC, Gambardella S. [Ecology of sandflies in Serra do Mar, Itaguai, state of Rio de Janeiro, Brazil. I - Sandfly fauna and prevalence of the species in collections sites and method of capture]. *Cad Saude Publica.* 1996 Apr; 12(2):195-206.

- Aguiar GM, Soucasaux T. Ecological aspects of phlebotomus of the Parque Nacional da Serra dos Orgaos, Rio de Janeiro. I. Monthly frequency in human baits (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984 Apr-Jun;79(2):197-209.
- Aguiar GM, Vilela ML, Soucasaux T. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro. V – Preferências Alimentares (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 81(4): 477-479.
- Albuquerque HG, Martins PF, Pessôa FS, Modesto TC, Luz JL, Raíces DSL, Ardente NC, Lessa ICM, Attias N, Jordão-Nogueira T, Enrici MC, Bergallo HG. Mammals of a forest fragment in Cambuci municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Check List* 2013; 9(6):1505-150.
- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1480-1485.
- Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in northeastern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992 Jul-Sep;87(3):387-95.
- Alexander B & Maroli M 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 17(1):1-18.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7(5):e35671.
- Alvar J, Yactayo S, Caryn B 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology* 12 (22): 552-557.
- Alves VS 2005. Um modelo de educação em saúde para o programa de saúde da família: pela integralidade e reorientação do modelo assistencial. *Interface*. Fev;9(16):39-52.
- Alves JRC. Espécies de *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) em Área de Leishmaniose Tegumentar no Município de Carmo, RJ. *Neotropical Entomology*. 2007 36(4):593-596.
- Anaguano D.F, Ponce P., Baldeón M.E, Santander S., Cevallos V.: Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Tropica*, 152, 116–120, 2015.
- Andrade LOM 2001. SUS passo a passo: normas, gestão e financiamento. São Paulo: Hucitec.
- Andrade Filho JD, Valente MB, de Andrade WA, Brazil RP, Falcao AL. Phlebotomine sand flies in the State of Tocantins, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 Jul-Aug;34(4):323-9.

- Andrade Filho JD, Aguiar GM, Dias ES, Falcão AL. Description of *Lutzomyia bianchigalatae* n. sp. A sand fly within the subgenus *Pintomyia* Costa Lima 1932 (Diptera; Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999 Nov-Dec;94(6):757-62.
- Anoopa Sharma D. et al. 2006. The economic impact of visceral leishmaniasis on households in Bangladesh. *Trop Med Int Health* 11: 757-764.
- Antunes Uchoa CM, Barrientos Serra CM, Duarte R, Magalhaes CM, Silva RM, Theophilo F, et al. Serological and epidemiological features of canine American tegumentary Leishmaniasis from Marica, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 Nov-Dec;34(6):563-8.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LGSR, Ferreira GEM, Nataly A. Souza NA, Araújo IB, Hamilton JGC, Brazil RP, Peixoto AA. Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2009 3(1): e365 1-12.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol*. 2000 May;66(5):1933-8.
- Araújo-Filho NA. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro, Estudo sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores. [Dissertação]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1978. Mestrado.
- Arias JR, Naiff RD, Miles MA, De Souza AA. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 1981;75: 537-541.
- Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1981;76: 279-286.
- Arn H, Tóth M, Priesner E. Pherolist: Heinrick Arn; 2000 [cited 2015]. Available from: <http://www-pherolist.slu.se/pherolist.php>.
- Arrivillaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, et al. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *J Med Entomol*. 2003;40(5):615-27.
- Artemiev MM. A classification of the subfamily Phlebotominae. *Parassitologia*. 1991 Dec;33 Suppl:69-77.
- Ashford RW. Leishmaniasis reervoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 1996 14(5): 523-532. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0738081X96000417>
- Austad SN. The adaptable opossum. *Sci Am* 1988; 54-59.

- Azeredo-Coutinho RB, Conceicao-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Jul;101(7):735-7.
- Azevedo AC, Rangel EF, Costa EM, David J, Vasconcelos AW, Lopes UG. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturite, Ceara State, northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990 Apr-Jun;85(2):251.
- Azevedo AC, Rangel EF, Queiroz RG. *Lutzomyia migonei* (Franca 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturite, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceara State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990 Oct-Dec;85(4):479.
- Azevedo ACd, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NAd, Rosa-Freitas MG, Rangel EF. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:305-22.
- Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Yaghoobi Ershadi MR, et al. *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *alexandri*: a probable vector of *Leishmania infantum* in Iran. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006 Jan;100(1):63-8.
- Badaro R. et al. 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 154: 639-649.
- Barbosa VA, Rodrigues AAF, Hamilton JGC, Brazil RP. Evaluation of the synthetic sex pheromone, (*S*)-9-methylgermacrene-B, for recruitment and monitoring of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an environmental reserve in Rio de Janeiro, Brazil. In: *International Symposium on Phlebotomine Sandflies IX (ISOPS IX)*, 2016
- Barnett, P. et al. Virgin soil: the spread of visceral leishmaniasis into Uttar Pradesh, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005. 73: 720–725.
- Barros AAM & Seoane CES. A problemática da conservação do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói / Maricá, RJ, Brasil. In: Vallejo LR & Silva MTC. *Os (Des)Caminhos do Estado do Rio de Janeiro Rumo ao Século XXI*. Anais. Niterói: Instituto de Geociências da UFF; 1999. p.114–124.
- Barros AAM. *Análise Florística e Estrutural do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ, Brasil*. [Tese]. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Escola Nacional de Botânica Tropical; 2008. 218p. Doutorado.
- Barros RSM 2007. *Medidas de Diversidade*. Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais – PGECOL. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. Juiz de Fora, MG.
- Bauzer LG, Souza NA, Maingon RD, Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(1):1-12.

- Bauzer LGSR, Souza NA, Maingon RDC; Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2007; 102 (1): 1-12.
- Bauzer LG, Gesto JS, Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP, Peixoto AA. Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Mol Biol Evol. 2002;19(9):1624-7
- Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. Insect Mol Biol. 2002;11(4):315-23.
- Bergallo HG, Geise L, Bonvicino CR, Cerqueira R, D'Andrea PS, Esberárd CE, Fernandez FA dos S, Grelle CE, Peracchi A, Siciliano S, Vaz SM. Mamíferos. In: Bergallo HG, Rocha CFD, Alves MAS, VanSluys M (Org.). A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Ed. UERJ, 2000. p. 125-135
- Bern C, Joshi AB, Jha SN, Das ML, Hightower A, Thakur GD, Bista MB. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. Am J Trop Med Hyg 2000; (63): 184-188.
- Bern, C. Hightower AW, Chowdhury R, Ali M, Amann J, Wagatsuma Y, Haque R, Kurkjian K, Vaz LE et al.. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. Emerg. Infect. Dis. 2005 (11), 655–662
- Bheham P.F.L., Garret-Jones C. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in malaria vector (*Anopheles sacharovi* Frave). Bull Who, 48: 605-614, 1973.
- Bernardes Filho F, Bonatto DC, Martins G, Maier LM, Nery JAC, Azulay-Abulafia L. Occurrence of two autochthonous cases of American cutaneous leishmaniasis in the neighborhood of Caju, city of Rio de Janeiro, Brazil. An Bras Dermatol. 2014; 89(5):848-50
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., Maroli, M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. Acta Trop. 88, 106–119, 2003.
- Bonvicino CR. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos /C. R. Bonvicino, J. A. Oliveira, P. S. D'Andrea. - Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008 120 p.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans Royal Society of Trop Med and Hyg 2003; 97: 291-296.
- Bray DP, Bandi KK, Brazil RP, Oliveira AG, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. J Med Entomol. 2009;46(3):428-34.

- Bray DP, Carter V, Alves GB, Brazil RP, Bandi KK, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone in a long-lasting lure attracts the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 weeks in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(3):e2723.
- Brazil RP & Brazil BG. Bionomia. In: Rangel EF & Lainson R. *Flebotómos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 257-274.
- Brazil RP, Brazil BG, Gouveia MC, Almeida DC, Oliveira SMP, Menezes JÁ. Epidemiological Studies on Cutaneous Leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Domestic and Peridomestic Sandfly Fauna. In: Hart DT, Leishmaniasis, Life Sciences NATO ASI Series, Zakynthos; 1989. vol.163 p. 159-163.
- Brazil RP, De Almeida DC, Brazil BG, Mamede SMPO. Chicken House as a Resting Site of Sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitologia*. 1991 33 (suppl.11): 113-117.
- Brazil RP, Fuzari Rodrigues AA, Andrade Filho JD.. Sand fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini-Review. *Entomol. Ornithol. Herpetol* 2015 4: 144.
- Brazil RP, Pontes MC, Passos WL, Rodrigues AA, Brazil BG. The sand fly fauna (Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema, State of Rio de Janeiro, Brazil, an endemic area of cutaneous leishmaniasis transmission. *J Vector Ecol*. 2011 Mar 36 (Suppl) 1:95-98.
- Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):263-4.
- Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2003 45: 79-83.
- Cardoso PG, Souza MB, Sanavria A, Meira Ade M, Merodio JC. [Sandflies in an areas with occurrences of human cases of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Seropédica, State of Rio de Janeiro]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Mar-Apr;42(2):146-50.
- Carreira JCA, Silva AVM, Pita-Pereira D, Brazil RP 2012. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors* 5: 111.
- Carvalho JM 2004. Abaixo a vacina. *Rev Nossa História*.:50-7.
- Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, de Santana AL, da Costa SM, da Costa Rego TA, de Pita Pereira D, Rangel EF. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasit Vectors*. 2013 Nov 13;6(1):325

- Carvalho GM, Andrade Filho JD, Falcao AL, Rocha Lima AC, Gontijo CM. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a Leishmania-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008 Jun;8(3):407-14.
- Carvalho GM, Brazil RP, Falcao AL, Andrade Filho JD. Geographical distribution of the *cortelezzii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex in Brazil. *Neotrop Entomol.* 2009 Nov-Dec;38(6):876-9.
- Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araújo Pereira T, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho SP. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 2010 Oct;116(1):108-10.
- Carvalho MR. Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil {Dissetação de Mestrado}. Recife: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; 2005.
- Casanova C, Colla-Jacques FE, Hamilton JGC, Brazil RP, Shaw JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. Bates PA, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2015; 9(3):e0003620.
- Casaril AE, Monaco NZN, de Oliveira EF, et al. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. *Parasites & Vectors.* 2014; 7:364. doi:10.1186/1756-3305-7-364.
- Cássia-Pires R, Boité MC, D'Andrea PS, et al. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. Schönian G, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2014;8(12):e3389..
- Christensen HA, Alias JA, Vasquez AM, Freitas RA. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania brasiliensis gyanensis* in the Central Amazon in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31:239-42.
- Cordoba-Lanus E, De Grosso ML, Pinero JE, Valladares B, Salomon OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 2006 Apr;98(1):1-5.
- Costa CH, Werneck GL, Rodrigues L Jr, Santos MV, Araújo IB, Moura LS, Moreira S, Gomes RB, Lima SS. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99: 229-236.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmaniainfantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology* 2002; 125: 407-414.
- Courtenay O, Santana EW, Johnson PJ, Vasconcelos, Vasconcelos AW. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identify. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 1996; 90: 498-502.

- Curi NHA, Miranda I, Talamoni AS. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 99-101.
- Danabalan, R., Monaghan, M.T., Ponsonby, D.J., Linton, Y.M. Occurrence and host preferences of *Anopheles maculipennis* group mosquitoes in England and Wales. *Med. Vet. Entomol.* 28, 169–178, 2014.
- D`andrea PS, Cerqueira R, Hingst ED. Age estimation of the gray four eyed opossum, *Philander opossum* (*Didelphimorphia: Didelphidae*). *Mammalia* 1994; 58: 283-291.
- Da Costa CM, Moutinho FFB, Bruno SF. A experiência do município de Paraty (Rio de Janeiro, Brasil) na prevenção e controle da leishmaniose tegumentar americana. *Parasitol. Latinoam.* 2004 59: 110-114.
- Da Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira-Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(5):664-674.
- da Silva AV, de Souza Candido CD, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JC. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2008 Jan;105(1):92-4.
- Dahroug MAA, Almeida ABPF, Sousa VRF, Dutra V, Turbino NCMR, Nakazato L, Souza RL. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 2010; 104 (1): 73-74.
- Dajos R. *Ecologia Geral*. Petrópolis: Vozes; São Paulo: EDUSP; 1973. 474p.
- De Brito VN, de Almeida A do BPF, Nakazato L, Duarte R, Souza C de O, Sousa VRF. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(7):899-904.
- de Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992 Sep;52(1):45-58.
- De Oliveira EF, Casaril AE, Mateus NLF, et al. *Leishmania amazonensis* DNA in wild females of *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae) in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(8):1051-1057. doi:10.1590/0074-02760150317.
- De Oliveira SMP, Afonso RCH, Dias CMG, Brazil RP. Estudo da Fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Santa Cruz, Município do Rio de Janeiro, Brasil. *Resv. Bras. Ent.* 1995 39 (3): 547-551.

- De Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009 42(1):77-78.
- de Queiroz RG, Vasconcelos AW, Vasconcelos Ide A, de Sousa RN, Pessoa FA, de Alencar JE, et al. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an American cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturite, Ceara State, northeast Brazil. *Parassitologia.* 1991 Dec;33 Suppl:159-67.
- De Souza CF, Quaresma PF, Andrade Filho JD, Bevilacqua PD. Phlebotomine fauna in the urban area of Timoteo, State of Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 2014; 134: 72–79. doi:10.1016/j.actatropica.2014.02.019
- de Souza MB, Marzochi MC, de Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes Cdos S, Caetano JM, et al. [Absence of *Lutzomyia longipalpis* in some endemic visceral leishmaniasis areas in Rio de Janeiro municipality]. *Cad Saude Publica.* 2003 Nov-Dec;19(6):1881-5.
- Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. *O Hospital* 1955; 48: 61-76.
- Deane LM, Grimaldi G. Leishmaniasis in Brazil. In: KP Chang, RS Bray. *Leishmaniasis.* Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 247-281.
- Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1956.
- Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. In: Sanitária SNdE, editor. Rio de Janeiro 1956.
- Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 1989; 83: 613-615.
- De-Souza AI, Barros SEM, Ishikawa E, Ilha IMN. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitology* 2005; 128: 41-45.
- Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública.* 2003; 19(5):1373-1380.
- Dias M, Marjorie E, Educação em Saúde: conceitos e propósitos. *Cogitare Enfermagem* [en linea] 2009, 14 (Oct-Dic) : [Fecha de consulta: 27 de noviembre de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=483648977026>> ISSN 1414-8536
- Dias-Sversutti A, Scodro RB, Reinhold-Castro KR, Neitzke HC, Teodoro U. Estudo preliminar de preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani*

- (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. *Neotropical Entomology*. 2007; 36: 953-59.
- Donalisio MR, Peterson AT, Costa PL, et al. Microspatial Distributional Patterns of Vectors of Cutaneous Leishmaniasis in Pernambuco, Northeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine*. 2012;2012:642910.
- dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1998 Jul;12(3):315-7.
- Dourado MI, Noronha CV, Alcantara N, Ichihara MY, Loureiro S. Epidemiology of tegumentary American leishmaniasis and its relations with agriculture and prospecting, in a locality of the State of Bahia, Brazil. *Rev Saude Publica*. 1989 Feb;23(1):2-8.
- Duarte R. Ensaio Imunoenzimático ELISA para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemíptera: Reduviidae). [Dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz. 1997. Mestrado.
- Ellis J, Crampton J. Characterisation of a simple, highly repetitive DNA sequence from the parasite *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988 May;29(1):9-17.
- Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 1998: 175-185.
- Falqueto A, Ferreira AL. Reservatórios e Transmissão de Leishmanias. *In: Coura J R, Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. p. 739-752.
- Falqueto A, Grimaldi Júnior G, Sessa PA, Varejão JBM, Deane LM. *Lutzomyia gasparviannai* Martins, Godoy & Silva, 1962, probable vector of *Leishmania mexicana* ssp. in Viana municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1985; vol.80 no.4
- Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Filho G, Sessa PA, Carias VR, et al. [Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 Apr-Jun;81(2):155-63.
- Falqueto A, Varejao JB, Sessa PA. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987 Jul-Sep;82(3):443.
- Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 2004 Mar;18(1):71-80.
- Ferreira EC, Cruz I, Cañavate C, Melo LA, Pereira AAS, Madeira FAM, Valério SAN, Cunha HM, Paglia AP, Gontijo CMF. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania*

braziliensis in rodents from endemic urban area of the New World. BMC Vet Research 2015; 11:71

- Figueireido FB, Gremião IDF, Pereira AS, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, Schubach TMP, Madeira MF. First report of natural infection of a bush dog (*Speothosvenaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. Trans Royal Society of Trop Med and Hyg 2008; 102: 200-201.
- Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. Rev Inst Med Trop São Paulo 1960; 2: 195-203.
- Forattini OP. Entomologia Médica: Psychodidae. Leishmaniose. Bartonelose. Vol IV. São Paulo: Edgard Blucher; 1973. 658p.
- Francino OAL, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol 2006; 137:214-221.
- Francke W, Schulz S. Pheromones. Comprehensive natural products chemistry.8: Elsevier; 1999. p. 197-261.
- Freitas VC. O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG) [Tese]. Centro de Pesquisas René Rachou Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2010. 210p. Doutorado.
- Fuzari AA. Estudo da Fauna Flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil. [Dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz: Pos-graduação Medicina Tropical. 2011. 62p. Mestrado.
- Fuzari AA, Delmondes AFS, Barbosa VA, Marra FA, Brazil RP. The presence of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) in Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2016; 49 (5):616-619.
- Fuzari Rodrigues AA, Barbosa VA, Andrade-Filho JD, Brazil RP. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108(7): 943-946.
- Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. Bol Dir Malariol y San Amb 1995; 35(supl. 1): 133-142.
- Galati EAB. Apostila - Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos - atualização de Morfologia e Taxonomia. In: Rangel EF & Lainson R. Flebotómos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. 2015; Vol (1 e 2) 184p.
- Galati EAB. Morfologia e Taxonomia. In: Rangel EF & Lainson R. Flebotómos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 23-206.

- Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bola Dir Malariol y San Amb.* 1995 35(supl. 1): 133-142.
- Gontijo B, de Carvalho Mde L. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Jan-Feb;36(1):71-80.
- Gontijo CMF & Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e Perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004 7(3): 338-349.
- González CNN. Caracterização transcriptômica e proteômica da glândula de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). [Tese].Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2013. Doutorado.
- González U, Pinart M, Sinclair D, et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2015;(8):1-101. doi:10.1002/14651858.CD008736.pub2.
- Graipel, ME; Cherem, JJ; Ximenez, A.. Mamíferos terrestres não voadores da Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas* 2001; 14 (2): 109-140.
- Guevara P, Alonso G, da Silveira JF, de Mello M, Scorza JV, Anez N, et al. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Nov;56(1):15-26.
- Hamilton JG, Dawson GW, Pickett JA. 3-Methyl-alpha-himachalene: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *J Chem Ecol.* 1996;22(12):2331-40.
- Hamilton JG, Dawson GW, Pickett JA. 9-Methylgermacrene-B; proposed structure for novel homosesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. *J Chem Ecol.* 1996;22(8):1477-91.
- Hamilton JG, Dougherty MJ, Ward RD. Sex pheromone activity in a single component of tergal gland extract of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Northeastern Brazil. *J Chem Ecol.* 1994;20(1):141-51.
- Hamilton JG, Hooper MA, Pickett AJ, Kenji M, Satoshi S. 3-Methyl-[small alpha]-himachalene is confirmed, and the relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. *Chemical Communications.* 1999(4):355-6.
- Hamilton JG, Ibbotson CH, Hooper MA, Pickett AJ. 9-Methylgermacrene-B is confirmed as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as S. *Chemical Communications.* 1999(23):2335-6.
- Hamilton JG. Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. *Parasite.* 2008;15(3):252-6.

- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J., Badda, H., Ravel, C. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir by bloodmeal analysis in the insect vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77,1054–1059, 2007.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354:1191-1199.
- Horta FT, Serra CMB, Madeira MF, Macedo RMS, Duarte R, Pacheco RS. Epidemiological study of Canine Tegumentary Leishmaniasis in Inoã District (Maricá Municipality, Rio de Janeiro, Brasil). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998 93(Sup. 2): 113.
- Huang and Madan. A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 1999; cap3 9(9):868-877.
- Hurtado C 2007. A educação popular: conceito que se define na práxis. [acesso em 2007 Dez 20] Disponível: <http://www.redepopsaude.com.br/varal>.
- ISA. Dossiê Mata Atlântica. Monitoramento participativo da Mata Atlântica. Instituto Sócio Ambiental. 2001. 409p.
- Joly CA, Leitão-Filho HF & Silva SM. O patrimônio florístico. In: Cecchi JC & Soares SM. Mata Atlântica / Atlantic Rain Forest. Fundação SOS Mata Atlântica; 1991. p. 95–125.
- Jorquera A, Gonzalez R, Marchan-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Feb;100(1):45-8.
- Karlson P, Luscher M. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature.* 1959;183(4653):55-6.
- Kawa H, Sabroza PC. [Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro]. *Cad Saude Publica.* 2002 May-Jun;18(3):853-65.
- Kwamoto EE 1995. *Enfermagem comunitária.* São Paulo: EPU.
- Kent, R.J. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 4–18, 2009.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990;4(1):1-24.
- Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990 65 (Suppl 1): 37-42.
- Kirstein, F., Gray, J.S. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4060–4065, 1996.

- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 86, 6196–6200, 1989.
- Kumar, R. et al. Kala-azar epidemic in Varanasi district, India. *Bull. World Health Org.* 1999 (77), 371–374
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(8):811-27.
- Lainson R, Shaw JJ. Some reservoir-hosts of *Leishmania* in wild animals of Mato Grosso State, Brazil. Two distinct strains of parasites isolated from man and rodents. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 1969; 63: 408-409.
- Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of, *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensisguyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 1981; 75: 530-536.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Fraiha H. Leishmaniasis in Brazil. XIX: visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajo, Para State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(3):323-30.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In *The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology* 1987. P. 120.
- Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D Topley & Wilson's, *Microbiology and Microbial Infections. Parasitology*, Arnold, London 1998; 242-266.
- Lainson R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988 Oct 31;321(1207):389-404.
- Lane R, Phillips A, Molyneux DH, Procter G, Ward RD. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? *Ann Trop Med Parasitol.* 1985; 79(2):225-9.
- Lane R, Ward R. The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) *Cahiers-ORSTOM Série Entomol Méd Parasit.* 1984;22(3):245-9.
- Lane RP, Bernardes Dde S. Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1990;84(1):53-61.

- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(6):839-47.
- Lara e Silva 2014. Eco-epidemiologia e Controle da Leishmaniose Visceral no município de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). [Tese]. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 124p. Doutorado.
- Law JH, Regnier FE. Pheromones. *Annu Rev Biochem.* 1971;40:533-48.
- Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol.* 2002 Apr;11(2):117-22.
- Lins RM, Souza NA, Peixoto AA. Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(7):736-40.
- Lopes JV. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. [Dissertação]. Centro de Pesquisas René Rachou. FIOCRUZ. 2014. p.108. Mestrado.
- Lopes UG, Momem H, Grimaldi JrG, Marzochi MCA, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci visceral and cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Parasitology* 1984 70:89-98.
- Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, Ecco R, Santos RL. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 155: 146-151.
- Madeira MF, Marzochi MCA, Schubach AO, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 2006; 100: 442-445.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MCA. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 2006 100: 442-445.
- Madeira MF, Serra CMB, Uchôa, CMA, Cruz DAM, Perdomo, CC. Canine leishmaniasis: a serological survey of 310 dogs in Itaipu, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2000 16(2): 568.
- Madeira MF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36: 551-555.

- Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? Trends Parasitol. 2008;24(1):12-7.
- Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, et al. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceara State, Brazil. Mol Ecol. 2003;12(7):1879-94.
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M.A., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., Mohtarami, F. Blood meal identification in field-captured sand flies: comparison of PCR-RFLP and ELISA assays. Iran. J. Arthropod-Borne Dis. 3, 8–18, 2009.
- Mangabeira OF. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. Rev Bras Malariol Doenças Tropicais. 1969;12:3-26.
- Marchiori CH, Linhares AX . Ecologia, Comportamento e Bionomia -Constância, Dominância e Freqüência Mensal de Dípteros Muscóides e seus Parasitóides (Hymenoptera e Coleoptera), Associados a Fezes Frescas de Bovinos, em Uberlândia, MG. An. Soc. Entomol. Brasil 1999; 28(3) 375.
- Marcondes CB, Bittencourt IA, Stoco PH, Eger I, Grisard EC, Steindel M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) spp.* in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009 Nov;103(11):1093-7.
- Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH. Geographic distribution of phlebotomine sandflies of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Leiva, 1912) complex (Diptera, Psychodidae). Rev Soc Bras Med Trop. 1998 Jan-Feb;31(1):51-8.
- Marcondes CB. A proposal of Generic and Subgeneric Abbreviations for Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. Entomological News. 2007 118(4):351-356.
- Marcondes CB. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Osw. Cruz. 1996 91: 457-462.
- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva RA, Oliveira ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. Journal Med Entomology. 2010 47(6):1212-1219.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol. 2013 27(2):123-47.
- Martins AMM. O Parcelamento da Terra no Município de Maricá. Estado do Rio de Janeiro. [Dissertação]. Instituto de Geociências: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1986. Mestrado.

- Martins FR & Santos FAM. Técnicas usuais de estimativa da biodiversidade. Rev. Holos 1 (edição especial):236-267.
- Martin-Sanchez J, Gallego M, Baron S, Castillejo S, Morillas-Marquez F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006 Jun;100(6):527-32.
- Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Junior G, Momen H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 Jul-Sep;80(3):349-57.
- Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira Mde F, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Sep-Oct;42(5):570-80.
- Marzochi MC, Marzochi KB, Carvalho RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitol Today. 1994 Jan;10(1):37-40.
- Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica. 1994;10 Suppl 2:359-75.
- Matos RMB, Silva EMRS, Berbara RLL. Biodiversidade e Índices. Embrapa Agrobiologia. Seropédica. 1999 20p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 107)
- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Martins AV, Magalhães PA, Costa CA, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce valley, State of Minas Gerais, Brazil. Annals Tropical Medicine Parasitology. 1979 73: 123-137.
- Michalsky, E.M., Fortes-Dias, C.L., Pimenta, P.F., Secundino, N.F., Dias, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2002 44(5):255-9.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF. 2010. 2ªed. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. Boletim Epidemiológico 2001; 6: 1-11.
- Ministério da Saúde. Portal da Saúde. 2014 <http://portalsaude.saude.gov.br/>
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Ed., Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF, 184 p., 2007.

- Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica, Manual de Controle de Roedores. Brasília, 2002
- Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L, 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. 2002 Mar;97(2):185-8.
- Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky EM, Dias ES Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2011 44(1):76-78
- Modesto TC, Pessôa FS, Enrici MC, Attias N, Jordão-Nogueira T, Costa LM, Albuquerque HG, Bergallo HG. Mamíferos do Parque Estadual do Desengano, Rio de Janeiro, Brasil. Biota Neotrop 2008; (8)4: 153-159.
- Modesto TC, Pessôa FS, Jordão-Nogueira T, Enrici MC, Costa LM, Attias N, Almeida J, Raíces DSL, Albuquerque HG, Pereira BC, Esbérard CEL, Bergallo HG. Mammals, Serra da Concórdia, state of Rio de Janeiro, Brazil. Check list 2008; 4(3):341-348.
- Mori SA, Boom BM & Prance GT. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. Brittonia 1981. 33: 233-245.
- Morse RA. Honey Bee Alarm Pheromone: Another Function. Annals of the Entomological Society of America. 1972;65(6):1430-.
- Morton IE, Ward RD. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. Med Vet Entomol. 1989;3(3):219-23.
- Mukabana, W.R., Takken, W., Knols, B.G.J. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. Trends Parasitol. 18, 2002.
- Mukherjee S, Hassan MQ, Ghosh A, Ghosh KN, Bhattacharya A, Adhya S. Short report: *Leishmania* DNA in *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species during a kala-azar epidemic. Am J Trop Med Hyg. 1997 Oct;57(4):423-5.
- Mukhopadhyay J, Ghosh K, Azevedo AC, Rangel EF, Munstermann LE. Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Am Mosq Control Assoc. 1998;14(3):277-82.
- Mutebi JP, Alexander B, Sherlock I, Wellington J, Souza AA, Shaw J, et al. Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1999;61(1):149-57.
- Nery LCR, Lorosa ES, Franco, AMR. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99:571-4.

- Ngumbi P.M., Lawyer P.G., Johnson R.N., Kiilu G., Assiago C. Identifications of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med Vet Entomol* 6: 385-388, 1992.
- Nota Técnica Nº 5/2012 – Subsecretaria de Vigilância em Saúde Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental .: Intensificação da Vigilância para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.
- Nunes VMA 2015. Prevalência da Leishmaniose Visceral e Georreferenciamento da população de cães domésticos (*Canis familiaris*) no Parque Estadual da Serra da Tiririca - RJ. [Dissertação]. Universidade Federal Fluminense. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 63p. Mestrado.
- Ogosuku E, Perez JE, Paz L, Nieto E, Monje J, Guerra H. Identification of bloodmeal sources of *Leishmania* spp. in Peru. *Ann Trop Med and Parasitol*.1994; 88:329-35.
- Olifiers N, Cunha AA, Grelle CEV, Bonvicino CR, Geise L, Pereira L, Vieira MV, D'Andrea PS, Cerqueira R. Lista de espécies de pequenos mamíferos não-voadores do Parque nacional da Serra dos Órgãos 2007; p. 183-192 In: Cronemberger, C. and E.B. Viveiros de Castro (ed.) Ciência e Conservação na Serra dos órgãos. Brasília: IBAMA, Centro Nacional de Informação, Tecnologias Ambientais e Editoração.
- Oliveira AG, Andrade-Filho AJ, Falcão AL, Brazil RP.. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad. Saúde Pública* 2003; 19: 933-944.
- Oliveira EF, Fernandes CES, Araújo e Silva E, Brazil RP, Oliveira AG.. Climatic Factors and population density fo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in na urban endemic área of visceral leishmaniasis in midwest Brazil. *J. Vector Ecology* 2013; 38(2): 224-228.
- Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 129: 219-227.
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 1998 Nov;37(11):846-9.
- Oliveira-Pereira YN, Rebelo JM, Moraes JL, Pereira SR. [Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmaniasp* in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhao, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Nov-Dec;39(6):540-3.
- Pacheco RS, Lopes UG, Mores CM, Grimaldi Jr G, Momen H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparisom with some phenotypic techniques. In: J. A. Rioux. *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Écoépidémiologiques, Montpellier: IMEEE; 1986. p. 57-65.
- Paiva BR, Oliveira AG, Dorval ME, Galati EA, Malafronte RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Tropica*. 2010; 115(1-2):126-130.

- Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop*. 2006 Oct;99(2-3):252-9.
- Peña VH, Fernández GJ, Gómez-Palacio AM, Mejía-Jaramillo AM, Cantillo O, Triana-Chávez O. Highresolution melting (HRM) of the cytochrome B gene: a powerful approach to identify blood-meal sources in Chagas disease Vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(2):e1530, 2012.
- Parque Estadual da Serra da Tiririca [homepage]. Niterói e Maricá, RJ: Instituto Estadual do Ambiente/Secretaria do Ambiente; 2007 [acessado em 24 jun. 2011]. [12 telas]. Disponível em: <http://www.parqueserradatiririca.org>
- Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degrave W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996 Jan-Feb;91(1):19-20.
- Peres-Dias QN, Oliveira CD, Souza MB, Meira AM, Villanova CB. Sand fly species composition (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the municipality of Cantagalo, an area with sporadic cases of human cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016; 58:50.
- Pessoa SB, Barreto MP. Leishmaniose tegumentar americana. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro 1948; 169-190.
- Pessoa SB, Coutinho JO. Infecção natural e experimental dos flebotomos pela *Leishmania braziliensis*, no Estado de São Paulo. *Hospital*. 1941 20: 23-35.
- Pessoa SB, Martins AV. *Parasitologia Médica*, 11ª ed. Guanabara koogan, Rio de Janeiro; 1982. 872p.
- Pessoa SB, Pestana BR. Infecção natural de *L. migonei* por formas em leptomonas provavelmente da *L. braziliensis*. *Acta méd*. 1940 5: 106-111.
- Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN. Interação Vetor-Hospedeiro. In: Rangel EF & Lainson R. *Flebotómos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 275-289.
- Pita-Pereira D. Avaliação de infecção natural de Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. empregando ensaios de PCR multiplex e PCR em tempo real. [Tese]. Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. 2010. Doutorado.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, de Figueiredo Barbosa A, et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Dec;99(12):905-13.
- Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by

- Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop.* 2008 Jul;107(1):66-9.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Apr;80(4):593-5.
- Plano de manejo do Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET) http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/BIODIVERSIDADEEAREASPROTEGIDAS/UnidadesdeConservacao/INEA_008600#/PlanodeManejo
- Prevedello JA, Ferreira P, Papi, Loretto D, Vieira MV. Uso do Espaço Vertical por Pequenos mamíferos no Parque Nacional Serra dos Órgãos, RJ: Um estudo de 10 anos utilizando três métodos de amostragem. *Espaço & Geografia* 2008; 1:35:58.
- Price PW, Bouton CE, Gross P, McPheron BA, Thompson JN, Weis AE. Interactions Among Three Trophic Levels: Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores and Natural Enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 1980;11(1):41-65.
- Pugedo, Hoover et al. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2005, vol.38, n.1, pp.70-72. ISSN 0037-8682. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000100017>.
- Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CM. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(10):579-85. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.07.005
- Quaresma PF, Murta SM, Ferreira EC, Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral *Leishmaniasis*: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 2009; 111(3):289-294.
- Quinnell RJ, Dye C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol* 1994; (8): 219–224.
- Rangel EF & Lainson R. Ecologia da Leishmanioses. In: Rangel EF & Lainson R. *Flebotómos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 291-336.
- Rangel EF, Azevedo AC, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990 Jan-Mar;85(1):39-45.
- Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Nov;104(7):937-54.

- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo AC, Barbosa AF, Andrade CA. [Phlebotomus of Vargem Grande, a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro]. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986 Jul-Sep;81(3):347-9.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Infecção Natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, em Área Endêmica de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1984 79(3): 395-396.
- Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2008 Dec;24(12):2948-52.
- Ranjan, A. et al. Risk factors for Indian kala-azar. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005 (73): 74–78.
- Ready PD, Smith DF, Killick-Kendrick R. DNA hybridizations on squash-blotted sandflies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. Med Vet Entomol. 1988 Apr;2(2):109-16.
- Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil. Imprensa da UEL, Londrina. 2006.
- Reithinger R et al.. Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania* (Viannia) species. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 2003; 97: 141-145.
- Rocha CFD, Bergallo HG, Pombal Jr. JP, Geise L, Van Sluys M, Fernandes R, Caramaschi U. Fauna de anfíbios, répteis e mamíferos do Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. Publ. Avulsas do Mus. Nac. 2004;104:1-24.
- Rodrigues AC, Melo LM, Magalhães RD, De Moraes NB, de Souza Júnior AD, Bevilagua CM. Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) [abstrac]. *Vet Parasitol* 2016; 15;220:28-32.
- Rodriguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999 Jan-Feb;93(1):47-9.
- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol.* 1994 Sep;32(9):2246-52.
- Ronald S. M. Barros .MEDIDAS DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA *Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais – PGECOL. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. Juiz de Fora, MG. 2007*

- Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2014; 3(3):251-262.
- Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. Louzir H, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010; 4(2):e589. doi:10.1371/journal.pntd.0000589.
- Rosabal R, Trejos A. *Phlebotomus* in El Salvador (Diptera: Phlebotomidae). II Observations sobre su biología con especial referencia a *P. longipalpis*. *Ver Biol Trop*. 1965;13:219-28.
- Salomón OD, Araki AS, Hamilton JG, Acardi SA, Peixoto AA. Sex pheromone and period gene characterization of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Lutz & Neiva) (Diptera: Phlebotomidae) from Posadas, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 928-930
- Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Elizabeth Ferreira Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015 Vol. 110(7): 831-846
- Sanguinete CC. Epidemiologia das leishmanioses em Barra do Guaiçui, Minas Gerais, Brasil. [Tese]. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2015. 169p. Doutorado.
- Santos DR, Ferreira AC, Bisetto Junior A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Phlebotomidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. *Rev. Soc Bras Med Trop* 2012; 45(5):643-645
- Santos JB, Lauand L, Souza GS, Macêdo VO. Socioeconomic factors and attitudes towards household prevention of American cutaneous leishmaniasis in an endemic area in Southern Bahia, Brazil. *Cad. Saude Publica* 2000; 16: 701-708.
- Santos MG, Carvalho CEM, Kelecom A, Ribeiro, MLR, Freitas CVC, Costa LM, Fernandes LVG. Cianogênese em esporófito de pteridófitas avaliada pelo teste do ácido pícrico. *Acta Botanica Brasilica*. 2005. 19(4): 783–788.
- Santos-De Marco T. Aspectos Ecológicos dos Flebotomíneos, em Recente Foco de Transmissão de Leishmaniose Tegumentar, na Microrregião de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. [Tese]. Universidade Federal de Minas Gerais: Departamento de Parasitologia. Belo Horizonte: 2008. 218p. Doutorado.
- Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, Andrade Filho JD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Phlebotomidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. *J Med Entomol*. 2009; 46(5):1159-63.
- Saraiva L, Lopes J dos S, Oliveira GBM, Batista F de A, Falcão AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Phlebotomidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006. pp. 56–63. doi:10.1590/S0037-868220060001000

- Saraiva L, Silva Reis A, Marteleto NunesRugani J, Sampaio Pereira AA, Rêgo FD, Vianna Mariano da Rocha Lima AC, et al. Survey of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Environmentally Protected Area in Brazil. *Plos One* 2015 10(8): e0134845. doi:10.1371/journal.pone.013484
- Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, Andrade Filho JD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol.* 2009 Sep;46(5):1159-63.
- Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 105(8):1033-1039
- Savage HM, Niebylski ML, Smith GC, Mitchell CJ, Craig-JR GBJ. Hostfeeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) at a temperate North American site. *J Med Ent.* 1993;30:27-34.
- Schall, Virgínia Torres; Struchiner, Miriam. Educação em saúde: novas perspectivas. *Cad. Saúde Pública*, v. 15, supl. 2, p. S4-S6, 1999
- Schallig HDFH, Da Silva ES, Van-Der-Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector-Borne and Zoon Dis* 2007; 7: 387-393.
- Schilling AC, Batista JLF. Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral em florestas tropicais. *Revista Brasil. Bot.* 1999, V.31, n.1, p.179-187
- Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira AS, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, Cuzzi T, Marzochi MCA, Schubach A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 2004; 98: 165-167.
- Serra CMB, Leal CA, Figueiredo F, Schubach TM, Duarte R, Uchôa CMA, Silva RMM, Madeira MF. Canine tegumentary leishmaniasis in Morada das Águias (Serra da Tiririca), Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2003 19(6): 1877-1880.
- Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis.* 2008 Dec;45(4):255-72.
- Shaw J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 102: 541-547.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994 Jul-Sep;89(3):471-478.

- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Jr. Grimaldi G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 511.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Jr. Grimaldi G. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. VI – Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. Rev Soc Bras Med Trop 1988; 21: 23-27.
- Shimabukuro PHF. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo. [Tese]. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças; 2007. 107p. Doutorado.
- Silva AVM, Cândido CDS, Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JCA. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica* 2008; 105: 92–94.
- Silva DA, Madeira MF, Figueiredo FB. Geographical Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2015 , Sep-Oct 57(5):435-438.
- Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating Fox (*Cerdocyonthus*) in south-east Brazil. Vet Record 2000; 147: 421-422.
- Silva OS, Grunewal, J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999 94: 579–582.
- Silva GAR, Boechat TO, Ferry FRA, Pinto JFC, Azevedo MCVM, Carvalho RS, Motta RN, Veras MF. First case of autochthonous human visceral leishmaniasis in the urban center of Rio de Janeiro: case report. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2014; 56(1): 81-4.
- Silveira FT, Ishikawa EA, de Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n.sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. Parasite. 2002 9: 43-50.
- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Pova MM. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyonthus* (L.) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. Trans Royal Society of Trop Med and Hyg 1982; 76: 830-832.
- Simpson SJ, Raubenheimer D. The Geometric Analysis of Nutrient- Allelochemical Interactions: A Case Study Using Locusts. Ecology. 2001;82(2):422-39.
- Sinan/MS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine *Leishmaniasis* endemicity using

- PCR on several tissues and serology, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001 39(2):560-563
- SOS Mata Atlântica. 2002. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 1995–2000. Relatório parcial Estado do Rio de Janeiro [on line]. <http://www.sosmatatlantica.org.br/atlas2001/dados/relatorioatlas.pdf>.
- Souza CF. Estudo da Urbanização de flebotomíneos e aspectos epidemiológicos de leishmaniose tegumentar americana no município de Timóteo, Minas Gerais, Brasil. [Dissertação]. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. 2011. p.101. Mestrado.
- Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:1181-1182
- Souza MA, Sabrosa PC, Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS. Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro. 1 - Flebotomíneos de área de procedência de caso humano autóctone. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1981 76: 161-168.
- Souza MB, Cardoso PG, Sanavria A, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Ponte CS, Meira AM, Meródio JC. Fauna Flebotomínica do Município de Bom Jardim, Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2003 12 (4): 150-153
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Silva VC, Peixoto AA, Rangel EF. Moonlight and blood-feeding behaviour of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae), vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Feb;100(1):39-42.
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vigoder FM, Ward RD, Peixoto AA. Reproductive isolation between sympatric and allopatric Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae).*Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 .March 103(2): 216-219.
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil.*Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Sep;97(6):759-65.
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Rangel EF. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic Rain Forest Reserves in the State of Rio de Janeiro, Brazil.*Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Apr;96(3):319-24.
- Souza NA, Silva JB, Godoy RE, Souza FJ, Andrade-Coelho CA, Silva VC, Azevedo AC, Rangel EF. Studies on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in the campus FIOCRUZ mata Atlântica, Jacarepaguá, in the City of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48(1):26-32. doi: 10.1590/0037-8682-0301-2014.

- Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *J Med Entomol.* 2004;41(5):906-13.
- Souza NA, Vilela ML, Andrade-Coelho CA, Rangel EF. *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) ocorrendo em simpatria em área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000 33 (Supl.I): 183.
- Spiegel CN, Brazil RP, Soares MJ. Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae). *Arthropod Struct Dev.* 2002;30(3):219-27.
- Steiger S, Schmitt T, Schaefer HM. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proc Biol Sci.* 2011;278(1708):970-9.
- Sucen - Superintendência de Controle de Endemias; Informes Técnicos Institucionais. Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande de São Paulo. *Rev Saúde Pública.* 2005 39(1):137-138.
- Sudia WD, Chamberlain RW. Battery operated light trap, an improved model. *Mosquito animals. J Med Entomol.* 1962 5: 293-297.
- Tanizaki-Fonseca K & Moulton TP. A fragmentação da mata atlântica no estado do Rio de Janeiro. In: Bergalo HG, Rocha CFD, Alves MAD & Sluys MV. A fauna ameaçada de extinção do estado do Rio de Janeiro. EDUERJ; 2000. p. 23–35.
- Tanure A, Peixoto JC, Afonso MMS, Duarte R, Pinheiro AC, Coelho, SVB, Barata RA. Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2015; 57(4): 321-324.
- Tesh RB, Chaniotis BN, Aranson MD, Jahnsen KM. Natural host preference of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *J Trop Med Hyg.* 1971; 20:150-6.
- Tesh RB, Modi GB. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg.* 1984 Jan;33(1):41-6.
- Tesh RB, Modi GB. Studies on the biology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). I. Experimental infection of the vector. *Am J Trop Med Hyg.* 1984 Sep;33(5):1007-16.
- Tesh, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1995; 52: 287-292.
- Thakur CP. Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 156-157.

- Tolezano JE, Uliana SRB, Taniguchi HH, Araújo MFL, Barbosa JAR, Barbosa JER, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2007; 149: 280-284.
- Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 275-278.
- Uchôa CMA, Serra CMB, Duarte R, Magalhães CMM, Silva RM, Theophilo F, Figliuolo LP, Horta FT, Madeira MF. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(6): 563-568.
- Van Wynsbergue NR, Canto-Lara SB, Sosa-Bibiano EI, Rivero-Cárdenas NA, Andrade-Narváez FJ. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, México. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2009; 51: 87-94.
- Veloso HP, Rangel-Filho, ALR & Lima JCA. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE; 1991.124p.
- Verma N, Tripathi SK, Sahu D, Das HR, Das RH. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. *Mol Cell Biochem*. 2010 336:127-135.
- Veruska Nogueira de Brito^{1,2*}; Cenita Maria Oliveira³ ; Patrícia Lazari¹ ; Valéria Régia Franco Sousa *Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Jaciara, Mato Grosso, Brazil, 2003 to 2012* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil, de 2003 a 2012 *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, 2014 Jan-Mar v. 23, n. 1, p. 63-68.
- Vieira VP, Ferreira AL, Biral dos Santos C, Leite GR, Ferreira GEM, Falqueto A. Peridomestic Breeding Sites of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Endemic Area of American Cutaneous Leishmaniasis in Southeastern Brazil. *Am J Trop Med and Hyg*. 2012; 87(6):1089-1093. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0470.
- Vieira VR, Azevedo AC, Alves JR, Guimarães AE, Aguiar GM. Ecological aspects of Phlebotomine Sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in areas of American Cutaneous Leishmaniasis, in the municipality of Paraty, Rio de Janeiro, Brazil. I-Index of abundance by location and type of capture [abstract]. *J Med Entomol* 2015; 52(5):886-95.
- Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LG, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect Genet Evol*. 2010;10(6):734-9.

- Vigoder FM, Souza NA, Brazil RP, Bruno RV, Costa PL, Ritchie MG, et al. Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *Parasit Vectors*. 2015;8:290.
- Ward R, Phillips A, Burnet B, Marcondes C. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: S M, editor. *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Oxford: Oxford University 1988. p. 258-69.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani* chagasi Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78:269-80.
- Weksler M, CR Bonvicino. Taxonomy of pigmy rice rats (genus *Oligoryzomys*, Rodentia: Sigmodontinae) of the Brazilian Cerrado, with the description of two new species. *Arquivos do Museu Nacional* 2005; 63(1): 113-130.
- Whitman D. Allelo chemical interactions among plants, herbivores, and their predators. *Novel Aspects of Insect–Plant Interactions: Wiley-Interscience Publication; 1988*. p. 207-48.
- WHO (World Health Organization) 2016. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- Wilson EO, Bossert WH. Chemical Communication Among Animals. Recent progress in hormone research. 1963;19:673-716.
- Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51: 771-777.
- Yoshida EL, Marques Sde A, Stolf HO, Barsotti LA, Bueno MM, Sogayar R. [Natural infection of *Equus caballus* by *Leishmania* sp--Sao Paulo, Brazil. (Brief scientific communication)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1988 Mar-Apr;30(2):79-80.
- Young DG & Ducan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. 1994. 881p.
- Zeledon R, Murillo J, Guitierrez. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and possibilities of the existence of visceral leishmaniasis in Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;19:455-9.

9. Artigos publicados e aceitos para publicação durante o Doutorado

9.1 – Artigos e resumos gerados no Doutorado

1. Fuzari AA, Delmondes AFS, Barbosa VA, Marra FA, Brazil RP. The presence of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) in Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016; 49 (5):616-619
2. Fuzari Rodrigues, Andressa A.; Barbosa, V. A.; Andrade Filho, José Dilermando; BRAZIL, Reginaldo Peçanha . Study of sand flies fauna (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) of Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil.. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of Brazilian Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. Anais do, 2012.
3. Fuzari Rodrigues, Andressa A.; Barbosa, V. A.; Andrade Filho, José Dilermando; BRAZIL, Reginaldo Peçanha . Study of sand flies fauna (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) of Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. In: V Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais, 2012, Recife (PE). Anais, 2012.
4. Fuzari AA, Delmondes AFS, Barbosa VA, Marra FA, Brazil RP. The presence of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) in Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. In: XXIV Congresso Brasileiro da Sociedade de Parasitologia – SPB e XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia - FLAP . Anais, 2015.
5. Artigos futuros: Fauna Flebotomíenos + infecção natural por Leishmania + fonte alimentar (final tese) /Fauna mamíferos e infecção natural por Leishmania (final tese).
6. Elaboração de Nota Técnica (gerada a partir dos resultados obtidos) que será encaminhada à Secretaria de Saúde dos municípios de Niterói e Maricá, RJ

9.2 – Artigos e resumos publicados em colaboração durante o doutorado

- 1- Brazil RP, Fuzari Rodrigues AA, Andrade Filho JD. 2015. Sand fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini-Review. *Entomol. Ornithol. Herpetol.* 4:144.
- 2- Araujo-Pereira T, Fuzari AA, Filho JD, Pita-Pereira D, Britto C, Brazil RP. 2014. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of

leishmaniasis transmission in the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Parasites & Vectors* ^{JCR}, v. 7, p. 360.

- 3- Pinto IS, Chagas BDd, Rodrigues AAF, Ferreira AL, Rezende HR, Bruno RV, et al. 2015. DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil. *PLoS ONE* 10(10):e0140636. doi:10.1371/journal.pone.0140636
- 4- Araujo-Pereira T, Pita-Pereira D, Boité M, Melo M, Martins DA, Costa-Rego TAN, Pinto IS, Moreira RB, Andrade-Filho JD, Fuzari AA, Oliveira M, Brazil RP, Britto C. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar no município de Brasiléia, Acre: Identificação da fauna flebotomínica, preferência alimentar e caracterização de *Leishmania* spp. circulantes In: III Encontro Comemorativo da Semana Nacional de Controle e Combate às Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
- 5- Barbosa, Vanessa de Araújo; Fuzari Rodrigues, Andressa A; Hamilton, James Gordon Campbell; Brazil, Reginaldo Peçanha . Evaluation of the synthetic sex pheromone, (S)-9-methylgermacrene-B, for recruitment and monitoring of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an environmental reserve in Rio de Janeiro, Brazil. In: IX ISOPS. Anais 2016

Anexo 1



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DO AMBIENTE – SEA
INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE - INEA

ADITIVO À AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA INEA Nº 017/2010

O Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas do Instituto Estadual do Ambiente – INEA, no uso de suas atribuições legais, considerando a Portaria IEF/RJ/PR nº. 227, de 18/12/2007, e considerando, ainda, o que consta no administrativo E-07/501.128/2010, **AUTORIZA** a:

- (a) Prorrogação do prazo da autorização em tela por mais 05 (cinco) anos;
- (b) Inclusão de Francisco de Assis Marra, Daniele de Pita Pereira, Thais de Araujo Pereira e Cristian Ferreira de Souza à equipe do projeto;
- (c) Captura de roedores e marsupiais, utilizando armadilhas Tomahawk e Shermann contendo iscas feitas com pasta de amendoim, aveia, toucinho e banana;
- (d) Marcação dos animais adultos capturados utilizando tinta específica para tal, os quais serão soltos no mesmo local após os procedimentos descritos nos itens (e) e (f), a seguir;
- (e) Sedação branda dos animais adultos capturados (80 mg/kg de cloridrato de quetamina e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina para roedores, e 40 mg/kg de cloridrato de quetamina e 05 mg/kg de cloridrato de xilazina para marsupiais), a fim de facilitar a biometria e a coleta de amostras de sangue (item f);
- (f) Coleta de amostras de sangue em papel de filtro, por meio de punção da veia caudal dos animais adultos capturados.

Ficam mantidas as condicionantes e demais disposições da referida autorização, acrescidas das seguintes:

1. Os procedimentos de sedação somente poderão ser realizados por veterinário(a) apto(a) à atividade e na presença de um membro da equipe do parque;
2. Durante o período de sedação, os animais deverão ser monitorados até que o efeito tenha cessado por completo;
3. Caso algum animal apresente sintomas de reação negativa à sedação, o veterinário da equipe deverá tomar todas as providências cabíveis para a recuperação do animal;
4. Este Aditivo não contempla qualquer tipo de manipulação em animais domésticos, estando esta atividade vinculada à anuência dos proprietários dos animais.
5. As armadilhas deverão ser vistoriadas diariamente e recolhidas ao final das atividades. Recomenda-se a identificação das armadilhas, sinalizando a instituição responsável pelo projeto e o número da autorização de pesquisa emitida pelo INEA.

Rio de Janeiro, 15 de MARÇO de 2013.

André Ilha
Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas



Anexo 2



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32669-4	Data da Emissão: 04/02/2014 13:40	Data para Revalidação*: 06/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades e ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Reginaldo Peçanha Brazil	CPF: 324.256.277-15
Título do Projeto: Experimentos de campo com feromônio sexual sintético para reduzir a transmissão da leishmaniose visceral por Lutzomyia longipalpis no Brasil	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de insetos.	02/2012	01/2015

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	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	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.
6	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.
7	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.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues	Pesquisadora	042.391.027-23	1271380 SSP-ES	Brasileira
2	Graziela Borges Alves	Pesquisadora	000.972.201-75	4033047 DGP-GO	Brasileira
3	Vanessa de Araújo Barbosa	Estudante	134.578.487-26	218814473 Detran-RJ	Brasileira
4	Cáris Maroni Nunes	Médica Veterinária	037.132.978-78	10.337.829 ssp-SP	Brasileira
5	Israel de Souza Pinto	Pesquisador	101.405.687-00	1866380 SSP-ES	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPO GRANDE	MS	Campo Grande	Fora de UC Federal
2	ARACATUBA	SP	Araçatuba	Fora de UC Federal
3	BIRIGUI	SP	Birigui	Fora de UC Federal
4	NITERÓI	RJ	Itaipu	Fora de UC Federal

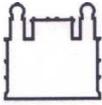
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 67646835



Página 1/4

Anexo 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-26/14

Certificamos que o protocolo (P-46/12-7), intitulado "Estudo da Leishmnaiose em Comunidades Inseridas em Área de Preservação Ambiental, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ, Brasil.", sob a responsabilidade de Reginaldo Peçanha Brazil, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 07/10/2017 e inclui o uso total de :

Rodentia

- 25 Machos.
- 25 Fêmeas.

Marsupialia

- 25 Machos.
- 25 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 7 de outubro de 2013

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

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

Anexo 4



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 300.509

indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

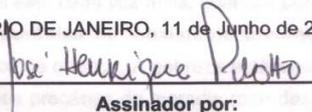
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

RIO DE JANEIRO, 11 de Junho de 2013


Assinador por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

ANEXO 5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 13373-1	Data da Emissão: 19/11/2007 17:02	
Dados do titular		
Registro no Ibama: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas;
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exige o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade;
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos;
6	Esta autorização NÃO 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 Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação;
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ;
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente;
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor;
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação;
13	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente;
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração;

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Rodentia, Didelphimorphia
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Museu Nacional (UFRJ)	coleção

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

Código de autenticação: 91827146



Página 1/2

ANEXO 6



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

Registro de Expedição Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 7695-1	Data da emissão: 27/11/2015 12:18
Número da solicitação: 13373	Data da expedição: 30/11/2015 à 06/12/2015

Dados do titular

Nº de Registro: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Equipe

#	Nome	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade	*Responsável
1	Jonathan Gonçalves de Oliveira	128.600.487-07	256511163 DIC-RJ	Brasileira	Sim
2	Vanessa de Araújo Barbosa	134.578.487-26	218814473 Detran-RJ	Brasileira	Não
3	Arina Pacheco Magalhães Lopes	011.814.476-66	MG10210856 SSP-MG	Brasileira	Não
4	Bernardo Rodrigues Teixeira	083.331.997-39	11566950-9 IFP-RJ	Brasileira	Sim
5	Natalie Olfiers	082.893.087-28	11416202-7 IFP-RJ	Brasileira	Sim
6	Yuri Teixeira Robim Valle	128.566.427-21	25.577.698-1 ifp-RJ	Brasileira	Não
7	Thiago dos Santos Cardoso	115.803.577-25	215414772 DETRAN-RJ	Brasileira	Sim
8	Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues	042.391.027-23	1271380 SSP-ES	Brasileira	Sim

* O titular será o responsável pela equipe caso não designe alguém para exercer tal função.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Localidade	UF	Município
1	Serra da Tiririca	RJ	MARICA

Táxons autorizados

Táxon(s)	
Outros mamíferos	Rodentia, Didelphimorphia

ANEXO 7

Nota Técnica

Nossa proposta é mostrar aos órgãos responsáveis (secretaria de saúde e centro de controle de zoonoses) a vulnerabilidade das comunidade carentes inseridas na área de preservação, neste caso, o Parque Estadual da Serra da Tiririca, quanto à possibilidade de infecções por *Leishmania* e a manutenção do ciclo de transmissão em um ambiente peridoméstico. Neste contexto poderemos, através do esclarecimento da população sobre a doença e seus riscos, elaborar ações simples como medidas de profilaxia e educação em saúde, para contribuir com o bem estar da comunidade sem necessidade de ultrapassar as leis que regem a reserva em que vivem.

Medidas e ações sugeridas aos órgãos públicos competentes, direcionados à população da região:

- ✓ Orientação e esclarecimento da população sobre a leishmaniose (palestras e elaboração de material didático, contendo informações sobre a doença, tais como seu ciclo evolutivo, aspectos epidemiológicos, diagnóstico, tratamento);
- ✓ Desenvolvimento de material didático e distribuição do mesmo à população dos municípios;
- ✓ Tela nas janelas e forros das casas;
- ✓ Uso de repelentes;
- ✓ Evitar horários de atividade dos vetores;
- ✓ Vestuário apropriado;
- ✓ Não são indicadas medidas de controle de animais silvestres
- ✓ Controle da população canina errante
- ✓ Uso de telas em canis individuais ou coletivos
- ✓ Coleiras impregnadas com Deltametrina a 4% (propor ao parque que distribuía essas coleiras)
- ✓ Controle químico, dos vetores, por meio da utilização de inseticidas impregnados em telas e com ação residual (piretróides – Deltametrina) para ambientes domiciliares e peridomiciliares, em residências fora área de reserva, através dos agentes de saúde – Secretaria de Saúde;

ANEXO 8

Ficha nº Modelo 5

TABALHO DE CAMPO

Projeto Doutorado – Serra da Tiririca	
Localidade: Subsede do Parque - Itacoatiara	
Data:	Número da coleta:
Tipo da captura: Armadilha HP (tipo CDC)	

SSP1	(perto do paredão)	
	Início da coleta	Término da coleta
Horário	h	h
Temperatura	° C	°C
Umidade Relativa do Ar	%	%
Coletores		
Guarda Parque		

SSP2	(perto da grutinha)	
	Início da coleta	Término da coleta
Horário	h	h
Temperatura	° C	°C
Umidade Relativa do Ar	%	%
Coletores		

SSP3	(perto do pedrão)	
	Início da coleta	Término da coleta
Horário	h	h
Temperatura	° C	°C
Umidade Relativa do Ar	%	%
Coletores		

Condições Ambientais Durante a Coleta		
	Início da coleta	Término da coleta
Ventos		
Chuvas		
Outros		

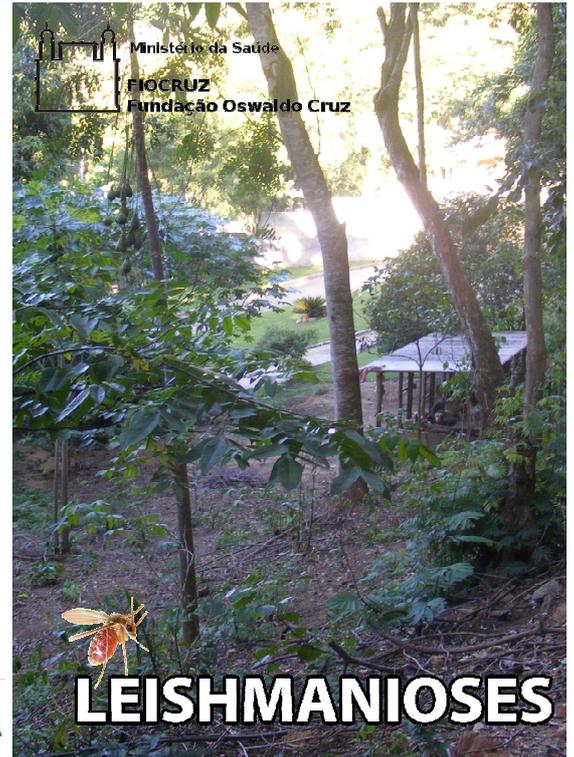
Anexo 9

Medidas de prevenção e controle:

- Tela nas janelas e forros nas casas;
- Uso de repelentes;
- Evitar horários de atividades dos vetores;
- Vestuário apropriado (roupas de manga longa e calça)
- Uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas
- Controle da população canina errante;
- Uso de telas em canis individuais ou coletivos
- Coleiras impregnadas com inseticidas



Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
Laboratório de Doenças Parasitárias
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
Pavilhão Arthur Neiva – sala 22
Tel: 2562-1468
Andressa Fuzari/Reginaldo Brazil



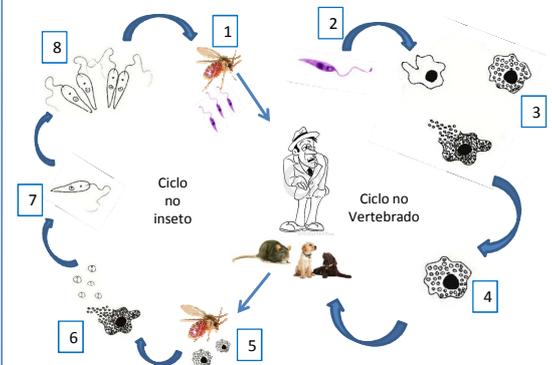
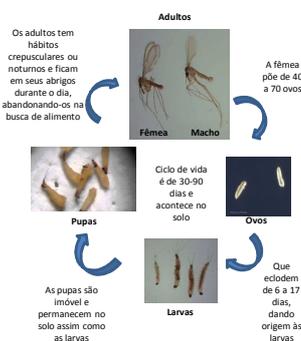
As leishmanioses são parasitoses que acometem o homem e outros animais domésticos e silvestres. A doença pode se manifestar de duas formas clínicas: Leishmaniose tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).



São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que necessitam de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida: um hospedeiro vertebrado e um inseto, denominado flebotomíneo, que são conhecidos popularmente, dependendo da região, como asa branca, asa dura, birigui, cangalhinha, mosquito-palha, tatuquira, frebóti, arrupiado, entre outros.

Machos e fêmeas se alimentam de seiva vegetal. Apenas as fêmeas necessitam de sugar sangue para maturação do seus ovos.

São insetos terrestre, se desenvolvem em criadouros constituídos por solos úmidos ricos em matéria orgânica, entre raízes expostas, embaixo de folhas caídas, pedras e ambientes como chiqueiros, galinheiros e estábulos.



Ciclo epidemiológico das leishmanioses: 1- Flebotomíneo ingere sangue de um vertebrado saudável (injetando com sua saliva as formas); 2- No organismo dos vertebrados, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos (células do sistema mononuclear fagocitário); 3 - Promastigotas se transformam em amastigotas dentro do macrófago; 4- Amastigotas se multiplicam dentro da célula, por divisão binária, infectando outras células; 5- Fêmea do flebotomíneo ingere sangue com macrófagos infectados por amastigotas; 6 /7- Amastigota se transforma em promastigotas no intestino do inseto; 8 - promastigotas dividem-se no intestino e migram para a probóscide do inseto promastigotas)

A distribuição das leishmanioses é mundial, acometendo mais de 12 milhões de pessoas em 98 países. No Brasil, tem registros em todas as regiões. No Rio de Janeiro, a leishmaniose visceral (LV), conhecida como Calazar, e a tegumentar (LT) também denominada "úlceras de Bauru", "ferida brava" ou "nariz de tapir, vem se expandindo. Nos últimos anos, casos humanos e caninos de LT nas encostas da Serra da Tiririca, inserida entre os municípios de Maricá e Niterói, tem sido associada com a ocupação humana próximo à encostas.