

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical

Aline Machado Rapello do Nascimento

Ocorrência e infecção natural de flebotomíneos e pequenos mamíferos por *Leishmania* em matas de galeria do Distrito Federal, Brasil

Brasília

Agosto de 2017

Ocorrência e infecção natural de flebotomíneos e pequenos mamíferos por *Leishmania* em matas de galeria do Distrito Federal, Brasil.

Aline Machado Rapello do Nascimento

Defesa de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de doutora em Medicina Tropical, na área de concentração: Epidemiologia e Controle das doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Rodrigo Gurgel Gonçalves

Co-orientador: Prof. Andrey José de Andrade

Brasília

Agosto de 2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mo Machado Rapello do Nascimento, Aline
Ocorrência e infecção natural de flebotomíneos e pequenos mamíferos por Leishmania em matas de galeria do Distrito Federal, Brasil / Aline Machado Rapello do Nascimento; orientador Rodrigo Gurgel Gonçalves; co-orientador Andrey José de Andrade. -- Brasília, 2017.
193 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. Medicina Tropical. 2. Epidemiologia e parasitologia. 3. Leishmaniose . 4. Flebotomíneos. 5. Pequenos Mamíferos Silvestres. I. Gurgel Gonçalves, Rodrigo, orient. II. José de Andrade, Andrey, co-orient. III. Título.

Ocorrência e infecção natural de flebotomíneos e pequenos mamíferos por *Leishmania* spp em matas de galeria do Distrito Federal, Brasil.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BANCA EXAMINADORA

Dra. Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro

Universidade Federal do Paraná

Dra. Elisa Neves Vianna

Universidade de Brasília

Dr. Ciro Martins Gomes

Universidade de Brasília

Dr. Francisco Anilton Araújo (suplente)

Laboratório Hertape Saúde e Bem Estar Animal S/A

Agosto de 2017

“Porque o que acontece aos filhos dos homens, isso também acontece aos animais; a mesma coisa lhes acontece. Como morre um, assim morre o outro. Todos têm o mesmo fôlego, e nenhuma vantagem têm homens sobre os animais. Tudo é vaidade.”

Eclesiastes 3:19

Dedico este trabalho aos meus pais Ronaldo Rapello e Eliana Rapello meus maiores mestres e incentivadores e para quem sinto profundo respeito e agradecimento pelos ensinamentos de vida e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar pelos caminhos que Ele traçou para minha vida, ainda que alguns inicialmente pareçam obscuros, progressivamente se revelam fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do Núcleo de Medicina Tropical, especialmente às professoras Maria Regina Fernandes de Oliveira, Elisabeth Carmem Duarte, Elza Ferreira Noronha e aos professores Gustavo Adolfo Sierra Romero, Cleudson Nery de Castro, Pedro Luiz Tauil, Wildo Navegantes de Araújo e João Barberino Santos pela formação teórica e inspiração profissional no campo da Epidemiologia.

Ao meu orientador Rodrigo Gurgel Gonçalves pelo profissionalismo exemplar, pela constante motivação, pela participação ativa em todas as etapas desse processo, mas também pela compreensão, empatia, paciência e amizade ao longo da jornada.

Ao meu co-orientador Andrey José Andrade pelo extenso conhecimento compartilhado, pela identificação de milhares de flebotomíneos, pelo incentivo positivo e participação em todas as etapas desse processo, mas também pelos conselhos, pela sinceridade, pela paciência e pela parceria do início ao fim desse doutorado.

À equipe do Laboratório Interdisciplinar de Biociências e Faculdade de Medicina e em especial à professora Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo pelo vasto conhecimento teórico e prático compartilhado, pelas palavras de incentivo fundamentais para o sucesso da etapa molecular, mas também pela doçura e pela força feminina, por compartilhar sabedoria, por se tornar um exemplo profissional e pessoal para mim. À colega Thaís Tâmara Castro Minuzzi-Souza por compartilhar sua experiência profissional com paciência, pelos conselhos e momentos que fortaleceram a amizade. Às colegas Tamires Emanuele Vital e Bruna Caroline Vêras de Carvalho pela ajuda na execução das PCRs, pela paciência, pela gentileza e pelo agradável convívio na etapa laboratorial.

À equipe do Laboratório de Parasitologia, especialmente ao professor Marcos Takasha Obara pelo incentivo e ajuda em várias etapas de trabalho e pela

amizade. Ao colega Douglas Rocha pela ajuda no campo e na triagem, identificação e fotografia dos flebotomíneos. À colega Tauana de Souza Ferreira por ser gentilmente prestativa em todas as etapas desse trabalho. À colega Thaís Oliveira por compartilhar o tempo e os conhecimentos profissionais, pelos agradáveis momentos juntas, pela amizade construída. À colega e técnica Renata Velôso Timbó, pela ajuda na execução de diversas etapas do processo laboratorial e pela paciência. À colega Mariana Neiva pela ajuda na execução de diversas etapas do processo laboratorial.

À melhor equipe de campo que alguém poderia ter: Jônatas Ferreira, Débora Juliana Rodrigues Martins, Jéssica Toledo de Almeida, Cristiana Santiago Nery de Souza, Agda Regina Melo Silva, Thamerson Felipe Lelis dos Santos, Saemis Ferreira de Souza, Tâmela Stéfany Lopes Silva, Renê Cunha de Castro, Rubens Geraldo de Souza, Jadson José Gomes da Silva, Lana Cristina Evangelista Ferreira Sá, Hayana Maria Boaventura Costa e ao senhor Barbosa José Bezerra.

Ao meu parceiro Grégoire Saint Gal de Pons pela cumplicidade, pelo amor, pela paciência, por ser um grande ouvinte, pelos conselhos, pela compreensão nos momentos de privação de tempo em função do curso, por cuidar da nossa família.

Aos meus filhos Lucca Rapello e Pierre Rapello pela paciência e compreensão nos momentos de ausência e por serem minhas razões de ser melhor.

Ao meu irmão Marcio Rapello e cunhada Gabriela Ortiz de Rozas pelos momentos e palavras de apoio sempre bem-vindos.

Às minhas avós Annita Rapello (*in memorian*) e Eulina Machado (*in memorian*) que foram para o Senhor ao longo desse doutorado mas que deixaram seus ensinamentos para sempre na minha vida.

Aos meus amigos pessoais que não foram aqui citados, mas que sabem o quanto foram importantes para mim ao longo dessa etapa. Vocês me fortalecem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A. Distribuição geográfica dos casos de leishmanioses em 2013. A. Leishmaniose Tegumentar (LT). B. Leishmaniose Visceral (LV). Fonte: WHO 2016.....	27
Figura 2.	Forma Amastigota (A) e Promastigota (B) de <i>Leishmania</i> . Fonte: Rey, 2002– CD room (Modificado).....	32
Figura 3.	Ciclo biológico de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> . VL: Visceral Leishmaniasis (LV). CL: Cutaneous Leishmaniasis (LT). Fonte: TDR – Wellcome Trust.....	34
Figura 4.	Ilustração das subunidades SSU e LSU intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS (ITS1 e ITS2 espaçadores internos transcritos) e ETS (espaçador externo transcrito) flanqueados pelo espaçador intergenômico (IGS). Fonte: Vilgalyslab, Duke University.....	63
Figura 5.	Matas de Galeria amostradas em Brasília. A: Parque Nacional de Brasília. B: Fazenda Água Limpa. C: Jardim Botânico de Brasília. D: Reserva Biológica da Contagem.....	68
Figura 6.	Localização geográfica das quatro áreas de estudo no Distrito Federal. A: PNB: Parque Nacional de Brasília (PA; PB); B: REBIO: Reserva Biológica da Contagem (RA; RB); C: FAL: Fazenda Água Limpa da UNB (BA; BB); D: JBB: Jardim Botânico de Brasília (JA; JB). Fonte: Google Earth 2014.....	69
Figura 7.	Armadilhas utilizadas nas amostragens de flebotomíneos. A: armadilha do tipo HP. B: Armadilha do tipo Shannon.....	70
Figura 8.	Armadilhas utilizadas para amostragens de mamíferos. A: Armadilha tipo Tomahawk localizada no solo. B: Armadilha tipo Tomahawk com pequeno mamífero capturado. C: Armadilha tipo Sherman localizada em estrato arbóreo.....	72
Figura 9.	Roedor marcado por um brinco de identificação (observar a ponta da pinça).....	73
Figura10.	Base de trabalho de campo.....	74

Figura 11	Procedimentos de pesagem (A) e exame clínico geral em roedor e marsupial (B).....	75
Figura 12	Roedor após coleta de tecido. A seta aponta o local da coleta da ponta de orelha.....	76

Capítulo 1

Figura 1	Porcentagem de armadilhas positivas para flebotomíneos em quatro matas de galeria no Distrito Federal, em maio e setembro de 2014. FAL = Fazenda Água Limpa. REBIO = Reserva Biológica da Contagem. PNB = Parque Nacional de Brasília. JBB = Jardim Botânico de Brasília.....	86
Figura 2	A) Genitália de macho de <i>Brumptomyia brumpti</i> (10x); B) genitália masculina de <i>Brumptomyia guimaraesi</i> (10x); C) tórax do macho de <i>Brumptomyia guimaraesi</i> (10X); (Montados em bálsamo de Canadá).....	89
Figura 3.	D) Cabeça de fêmea de <i>Micropygomyia ferreirana</i> (10x); E) Faringe e cibário de fêmea de <i>Micropygomyia ferreirana</i> (40x); F) espermoteca de <i>Micropygomyia ferreirana</i> (40x) (Montados em bálsamo do Canadá).....	90
Figura 4.	G) Faringe e cibário de fêmea de <i>Evandromyia bourrouli</i> (40x); H) espermoteca de <i>Evandromyia bourrouli</i> (40X); I) genitália masculina de <i>Evandromyia bourrouli</i> (40X).....	91
Figura 5.	J) Ascóide em flagelômeros de <i>Psathyromyia pradobarrientosi</i> (40X); K) Genitália masculina de <i>Psathyromyia pradobarrientosi</i> (10X); L) porção final do ducto ejaculatório de <i>Psathyromyia pradobarrientosi</i> (40X).....	92

Capítulo 2

Figura 1.	Fluxograma explicativo dos métodos utilizados para a obtenção e processamento dos flebotomíneos.....	102
Figura 2.	Amplificação do gene Cacophany em gel de agarose visualizado por luz ultra-violeta. Peso Molecular (MW) 100bp. R15-R22: Amostras de flebotomíneos.....	110
Figura 3	Amplificação de SSUrRNA em gel de agarose visualizado por luz ultra-violeta. Peso Molecular (MW) 100bp. R15-	

R28: Amostras de flebotomíneos. Controles positivos: Lb (<i>L. braziliensis</i>) e Lc (<i>L. infantum</i>).....	111
---	-----

Capítulo 3

Figura 1	Roedores capturados no presente trabalho. A: <i>Oecomys bicolor</i> . B: <i>Calomys expulsus</i> . C: <i>Hylaeamys magacephalus</i> . D: <i>Rhipidomys macrurus</i> . E: <i>Nectomys rattus</i> . F: <i>Necromys lasiurus</i> . Fonte: A, B, C, D e F - Bonvicino (2008); E – Arquivo pessoal.....	125
Figura 2	Marsupiais capturados no presente trabalho. A: <i>Didelphis albiventris</i> . B: <i>Gracilinanus agilis</i> . C e D: <i>Monodelphis americana</i> . Fonte: arquivo pessoal.....	125
Figura 3	Amplificação de ITS-1 em gel de agarose visualizado por luz ultravioleta. Peso molecular (MW) 100bp. Números correspondem às amostras de mamíferos. Amostras positivas: 4, 13, 16,17, 20, 21, 25, 82 e 86. Controles positivos: Lb (<i>L. braziliensis</i>) e Lc (<i>L. infantum</i>).....	134
Figura 4	Amplificação de ITS-1 em gel de agarose visualizado por luz ultravioleta. Peso molecular (MW) 100bp. Números correspondem às amostras de mamíferos. Amostras positivas: 48, 55, 70 e 90. Controles positivos: Lb (<i>L. braziliensis</i>) e Lc (<i>L. infantum</i>).....	134
Figura 5	Amplificação de SSU rRNA em gel de agarose visualizado por luz ultravioleta. Peso molecular (MW) 100bp. Números correspondem às amostras de mamíferos. Amostras positivas: 02, 11, 13, 16, 17, 20, 25, 41, 58 e 90. Controles positivos: Lb (<i>L. braziliensis</i>) e Lc (<i>L. infantum</i>).....	135

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Fauna flebotomínica do Distrito Federal até 2015. Fonte: Carvalho et al. 1989; Carvalho et al. 2010; Ferreira et al. 2014; Almeida et al. 2015; Galati 2015.....	43
-----------	--	----

Capítulo 1

Tabela 1.	Números do catálogo institucional dos voucheres de espécies de flebotomíneos capturados no presente estudo.....	84
Tabela 2.	Espécies de flebotomíneos capturados nas quatro áreas de estudo do Distrito Federal, em maio e setembro de 2014. *Novos registros para o Distrito Federal. #Novo registro para o cerrado. Riqueza total de espécies nas matas de galeria: 16 espécies.....	85
Tabela 3	Lista atualizada de espécies de flebotomíneos no Distrito Federal, Brasil. #Novo registro para o Brasil. Riqueza total 35 espécies.....	87

Capítulo 2

Tabela 1	Identificação molecular dos “pools” de flebotomíneos fêmeas submetidos aos exames moleculares por área, espécie, mês de coleta e número de indivíduos em cada “pool”.....	107
----------	---	-----

Capítulo 3

Tabela 1	Espécies de roedores e marsupiais didelfídeos coletadas nos meses de maio e setembro de 2014 na FAL, REBIO, PNB e JBB, Distrito Federal, Brasil.....	124
Tabela 2	Distribuição das espécies de mamíferos capturados nas áreas de estudo nos meses de maio e setembro de 2014.....	126
Tabela 3	Dados brutos da morfometria corporal, sexo e idade das espécies de mamíferos capturadas nas áreas de estudo nos meses de maio e setembro de 2014. As linhas realçadas em amarelo correspondem aos animais positivos nos testes moleculares.....	127

Tabela 4	Número de amostras de orelhas positivas para os marcadores moleculares SSU de Tripanossomatídeos e ITS1 de <i>Leishmania</i> spp. em animais da FAL, REBIO, PNB e JBB, Distrito Federal.....	133
Tabela 5	Número de amostras de orelhas positivas para os marcadores moleculares SSU rRNA de tripanossomatídeos e ITS-1 de <i>Leishmania</i> spp. em animais da FAL, PNB e JBB, Distrito Federal.....	136

ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Áreas de Proteção Ambiental
APPs	Áreas de Preservação Permanente
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ETS	Espaçador Externo Transcrito
FAL	Fazenda Água Limpa
GDF	Governo do Distrito Federal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAM	Instituto Brasília Ambiental
ICMBio	Instituto Chico Medes de Biodiversidade
IGS	Espaçadores Intergênicos
IGS	Espaçador Intergenômico
IM	Intramuscular
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer-</i> Região Espaçadora Transcrita Interna
ITS-1	Espaçadores Internos Transcritos 1
ITS-2	Espaçadores Internos Transcritos 2
JBB	Jardim Botânico de Brasília
KOH	Hidróxido de Potássio
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Muco-cutânea
LSU	Subunidade Maior
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mg/Kg	Miligramas por quilo
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Tampão Fosfato Salino

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> -Reação da Polimerase em Cadeia
PCR-RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
PNB	Parque Nacional de Brasília
RBC-DF	Reserva da Biosfera do Cerrado no DF
RCO	Região Centro-Oeste
REBIO	Reserva Biológica da Contagem
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAr	RNA ribossômico
SINAN-NET	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SSU	Subunidade Menor
UC	Unidades de Conservação
UNB	Universidade de Brasília
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ <i>World Health Organization</i>
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphates</i> – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
pb	pares de bases

FINANCIAMENTO

O estudo foi financiado pela CAPES (processo nº1276/11, edital Parasitologia Básica) e pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Revisão Histórica das Leishmanioses nas Américas.....	23
1.2	Definição.....	25
1.3	Epidemiologia.....	26
1.4	Agente Etiológico.....	31
1.5	Espécies de <i>Leishmania</i> e formas clínicas de leishmaniose.....	35
1.6	Leishmanioses no Centro Oeste e no DF.....	38
1.7	Vetores.....	40
1.8	Flebotomíneos no DF.....	43
1.9	Hospedeiros e reservatórios de <i>Leishmania</i> spp.....	45
1.10	Diversidade e espécies mais importantes de Hospedeiros e Reservatórios.....	46
1.11	A questão ambiental do Distrito Federal.....	52
1.12	A fragmentação florestal e as leishmanioses.....	55
1.13	Estratégias de controle das leishmanioses.....	57
1.14	Diagnóstico parasitológico e imunológico das leishmanioses.....	58
1.15	Diagnóstico molecular das leishmanioses.....	61
1.16	Diagnóstico molecular da infecção por tripanossomatídeos utilizando genes ribossômicos.....	62
2.	JUSTIFICATIVA.....	64
3.	OBJETIVOS.....	66
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1	Áreas de estudo.....	67
4.2	Amostragem de flebotomíneos.....	70

4.3	Montagem, dissecação e identificação dos flebotomíneos.....	71
4.4	Captura dos pequenos mamíferos.....	71
4.5	Contenção e marcação dos pequenos mamíferos.....	73
4.6	Coleta de material biológico.....	75
5	Resultados.....	77
5.1	Capítulo 1 - Lista atualizada de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) do Distrito Federal, Brasil.....	77
	RESUMO.....	78
	Introdução.....	79
	Material e Métodos.....	80
	Áreas de Estudo.....	80
	Amostragem dos flebotomíneos.....	81
	Análise estatística.....	82
	Resultados.....	82
	Aspectos morfológicos para novos registros.....	88
	Discussão.....	93
5.2	Capítulo 2 - Avaliação de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos de matas de galeria do Distrito Federal, Brasil...	98
	RESUMO.....	98
1	Introdução.....	100
2	Material e Métodos.....	101
2.1	Amostragem, dissecação e montagem dos flebotomíneos.....	102
2.2	Extração de DNA	103
2.3	PCR dirigida ao gene <i>Cacophany</i>	103
2.4	PCR dirigida ao gene SSU rDNA de tripanossomatídeos.....	104
2.5	PCR dirigida ao ITS-I do rDNA.....	105
3	Resultados.....	106

4	Discussão.....	111
5.3	Capítulo 3. Ocorrência de pequenos mamíferos infectados por <i>Leishmania</i> spp. em Matas de Galeria do Distrito Federal, Brasil.....	115
	RESUMO.....	115
1.	Introdução.....	116
2.	Material e métodos	118
2.1	Área de estudo, amostragem e identificação dos pequenos mamíferos.....	118
2.2	Amostras biológicas e extração do DNA.....	119
2.3	PCR dirigida ao gene SSU rRNA de tripanossomatídeos.....	120
2.4	PCR dirigida ao ITS- 1 do rRNA.....	121
2.5	Aspectos éticos.....	122
2.6	Análise de dados.....	122
3	Resultados.....	123
4	Discussão.....	137
4.1	Composição da comunidade de mamíferos no momento das coletas.....	137
4.2	Infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. nos pequenos mamíferos das Matas de Galeria estudadas no Distrito Federal, Brasil.....	141
6	Considerações Finais.....	148
7	Conclusões.....	151
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
9	ANEXOS.....	190

RESUMO

O conhecimento relacionado à transmissão enzoótica de espécies de *Leishmania* no Distrito Federal ainda é escasso e a participação de flebotomíneos e mamíferos silvestres no ciclo de transmissão desses protozoários é objeto do presente estudo. As áreas estudadas foram as matas de galeria da Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília, Reserva Biológica da Contagem, Parque Nacional de Brasília e Jardim Botânico de Brasília em maio e setembro de 2014. O Capítulo 1 traz a atualização da lista de espécies de flebotomíneos no DF. Com esforço de captura de 1.280 armadilhas HP e 16 armadilhas do tipo Shannon, foram capturados 1.209 flebotomíneos pertencentes a 16 espécies. *Bichromomyia flaviscutellata* (n=668) foi a espécie mais capturada. *Psathyromyia pradobarrientosi*, *Brumptomyia guimaraesi*, *Br. brumpti*, *Micropygomyia ferreirana* e *Evandromyia bourrouli* foram registradas pela primeira vez no DF, ampliando a distribuição geográfica das mesmas e elevando para 35 o número de espécies registradas nessa unidade da federação. O Capítulo 2 analisou a infecção natural dos flebotomíneos capturados por *Leishmania*. DNA foi extraído de 569 fêmeas agrupadas em 87 “pools”. A integridade das amostras foi conferida por uma PCR designada à amplificação do gene cacophony da região IVS6. A detecção dos tripanossomatídeos foi feita pela amplificação das regiões SSU rRNA e ITS-1. Nenhuma amostra mostrou-se positiva para *Leishmania* spp., entretanto, os resultados do presente estudo não implicam na inexistência de vetores infectados nestas matas de galeria. O Capítulo 3 analisou a ocorrência e infecção em pequenos mamíferos (Rodentia e Didelphimorphia) por *Leishmania* spp. nas mesmas áreas dos flebotomíneos e nos mesmos períodos. Amostras de tecido (fragmentos de orelhas) foram obtidas dos mamíferos capturados e utilizadas para a detecção molecular dos parasitos a partir de Nested PCR SSU rRNA e PCR com alvo na região ITS em 153 amostras. Com um total de 5.120 armadilhas-noite, 172 pequenos mamíferos foram capturados, pertencentes à três espécies de marsupiais (*Didelphis albiventris*, *Gracilinanus agilis* e *Monodelphis americana*) e seis espécies de roedores (*Rhipidomys macrurus*, *Oecomys bicolor*, *Calomys expulsus*, *Hyleaemys megacephalus*, *Nectomys rattus* e *Necromys lasiurus*). Vinte amostras (13,07%) foram positivas,

considerando ambos os marcadores moleculares, quatro somente para SSU e quatro somente para ITS. As espécies infectadas por *Leishmania* spp. foram *Rhipidomys macrurus*, *Gracilinanus agilis* e *Didelphis albiventris*. Estas espécies devem participar da transmissão enzoótica de *Leishmania* na REBIO, FAL e JBB sendo este o primeiro relato de mamíferos silvestres infectados por este parasito nestas duas últimas áreas. Ao considerar todos os resultados obtidos conclui-se que as matas de galeria do DF abrigam hospedeiros e espécies incriminadas vetoras de *Leishmania* e teriam um papel importante na manutenção da transmissão enzoótica desses tripanossomatídeos.

Palavras chaves: Transmissão enzoótica, *Leishmania* spp., roedores, marsupiais, Phlebotominae, Cerrado.

ABSTRACT

Knowledge about the enzootic transmission of *Leishmania* in the FD is still scarce and the participation of wild mammals and sandflies in the leishmaniasis transmission cycle is the subject of this study. All samples were captured in gallery forests of four areas, Água Limpa Farm, Biological Reserve of Contagem, Brasília's National Park and Botanic Garden of Brasília, on May and September, 2014. Chapter 1 provides the updated list of sand fly species in the Federal District. The entire capture effort entailed 1.280 HP light traps and 16 Shannon traps, 16 species were identified. *Bichromomyia flaviscutellata* (n=668) was the most captured species. *Psathyromyia pradobarrientosi*, *Brumptomyia guimaraesi*, *Br. brumpti*, *Micropygomyia ferreirana* and *Evandromyia bourrouli* were registered for the first time in the Federal District, elevating to 35 the number of reported species at this federation unit. Chapter 2 follows up the study of Chapter 1 by detecting natural *Leishmania* infection in those captured sandflies. DNA was extracted from 569 females grouped into 87 pools. Fragments that corresponded to cacophony gene were amplified in all of the samples,

demonstrating the quality of the extracted DNA. Trypanosomatids detection was performed by amplifying the SSU rRNA and ITS-1 regions. All samples tested negative for *Leishmania* spp. Therefore negative results in the present study do not implicate in the inexistence of infected vectors in these gallery forests and surroundings. Chapter 3 addresses occurrence and natural infection data of small mammals (Rodentia and Didelphimorphia) captured in the same areas of sandflies and during the same periods. Tissue samples (ear tips) were obtained from captured mammals and used to molecular parasite detection from Nested PCR SSU rRNA and PCR targeting the region ITS in 153 samples. The entire capture effort entailed 5.120 night-traps and 172 small mammals from three marsupials species (*Didelphis albiventris*, *Gracilinanus agilis* and *Monodelphis americana*) and six rodents species (*Rhipidomys macrurus*, *Oecomys bicolor*, *Calomys expulsus*, *Hyleaemys megacephalus*, *Nectomys rattus* and *Necomys lasiurus*) were captured. Twenty samples (13,07%) were positive, considering both molecular markers, four samples only for SSU and four samples only for ITS. *Leishmania* spp. infected species were: *Rhipidomys macrurus*, *Gracilinanus agilis* and *Didelphis albiventris*. These species might participate in the enzootic transmission of *Leishmania* at REBIO, FAL and JBB. This is the first report of *Leishmania* infected wild mammals in the last two cited areas. Considering all results obtained it is concluded that gallery forests of FD host hosts and species from possible *Leishmania* vectors and they might have an important role in the maintenance of enzootic transmission of these trypanosomatids.

Key words: Enzootic transmission, *Leishmania* spp., rodents, marsupials, Phlebotominae, Brazilian savanna

1 Introdução

1.1 Revisão Histórica das Leishmanioses nas Américas

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença existente desde a antiguidade, cujos relatos e descrições datam do séc. I d.C. (Basano & Camargo 2004). Altamirano-Enciso et al. (2003) relataram três teorias de origem da doença nas Américas. A primeira, de 1890, em que Juliano Moreira & Aguiar Pupo propunham uma origem mediterrânea, enfatizando que os casos observados em pacientes da Bahia (Brasil), doença chamada “botão da Bahia” eram parecidos ao “botão do Oriente”. Segundo os mesmos autores a LTA teria sido introduzida pelos fenícios ou sírios que supostamente chegaram ao nordeste do Brasil ainda na Antiguidade. No entanto tais viagens jamais foram comprovadas historicamente ou arqueologicamente.

A segunda teoria é a de origem andina formulada a partir dos descobrimentos de peças de cerâmica pré-colombianas ou “huacos peruanos” em 1895 e reforçada pelos documentos do século XVI. Contudo, a discussão dos dados históricos dividiu-se em dois grupos: uma primeira corrente, representada pelos defensores das chamadas “evidências” históricas, cujos argumentos se reforçam pelos estudos das representações de lesões feitas em objetos de cerâmica e outro grupo de estudiosos que questionava essa fonte histórica por ser descrita por cronistas que não eram médicos. Atribui-se a essa discussão grande importância, porque se passaram quase 80 anos desde que Eduardo Rabello (1925) propôs que as origens da leishmaniose muco-cutânea (LMC) estariam inicialmente focalizadas nos territórios frios, sugerindo as regiões da Bolívia e do Peru, predominando esta teoria na literatura biomédica.

Mais recentemente, a chamada teoria monofilética para origem das leishmânias foi formulada por Thomas-Soccol et al. (1993) que, baseando-se em estudos de DNA mitocondrial de 20 espécies de leishmânias do mundo, consideram que os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, propostos por Lainson & Shaw (1972) tiveram origem comum desde os períodos Cretáceo e Jurássico, há 120 milhões de anos, quando os continentes estavam unidos na Pangéia. Contudo, a questão do local de origem das leishmânias continua controversa, entre as regiões Neotropical, Paleártica e Africana.

Cerqueira no Brasil, em 1855, observou a existência da forma cutânea, identificando-a clinicamente como “botão de Biskra” e Breda, em 1895, na Itália, descreveu a doença em italianos provenientes de São Paulo.

Lindenberg (1909) encontrou “formas de *Leishmania*” idênticas à *Leishmania tropica* da leishmaniose do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo o que confirmou a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas (Basano & Camargo 2004). Gaspar Vianna redescreveu o parasito como *L. braziliensis*, por considerá-lo diferente da *L. tropica* e, assim denominou-se o agente etiológico da “úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (Basano & Camargo 2004).

No Brasil, até a década de 1970, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. braziliensis* (Basano & Camargo 2004), entretanto, com o progresso das pesquisas ecoepidemiológicas e com o desenvolvimento das técnicas moleculares outras espécies foram descritas, sendo registradas até o momento sete espécies causadoras da LTA (Brasil 2010). A leishmaniose visceral (LV) era confundida no passado com outras doenças endêmicas e de apresentação clínica semelhante, como a malária em humanos (Palmer 1998).

No início de 1903, James Homer Wright, de Baltimore, observou formas de protozoários em úlcera cutânea de uma criança da Armênia suspeita de ser acometida pelo Botão do Oriente e propôs o nome de *Welcozoma tropicum* para o agente causal, hoje conhecido como *L. tropica*. Em 30 de maio desse

ano, o inglês William Boog Leishman, obteve uma biópsia de fígado de um soldado inglês morto pela doença febre de dum-dumou kala-azar na Índia. Dois meses depois, em 11 de julho, Charles Donovan, também em biópsia do baço de outro soldado morto, descobriu, independentemente, o agente etiológico do calazar, que era semelhante ao parasito da tripanossomíase, em sua fase intracelular (Altamirano-Enciso et al. 2003).

O nome do gênero *Leishmania* foi criado pelo médico inglês Ronald Ross, mas o termo *Leishmania donovani*, para o agente da LV, foi proposto por Laveran & Mesnil em 1903, embora segundo Basano & Camargo (2004), Cunningham, em 1885, na Índia foi o primeiro a observar o parasito do gênero em casos de LV. A partir daquele ano, foram descritos outros tripanossomatídeos em países do mar Mediterrâneo e da Ásia arábica. As dúvidas de que *L. donovani* e *L. tropica* fossem tripanossomatídeos e não piroplasmas só foram dissipadas quando Rogers & Nicolle (1904), e posteriormente Nicolle (1908) e Carlos Chagas (1908) demonstraram as formas flageladas de ambos os parasitos em meio de ágar sangue "in vitro". Sergent et al. (1921) reproduziram o "botão do Oriente" em hamsters ao inocularem macerados de *Phlebotomus papatasi* alimentados em soldados franceses na Argélia, comprovando a associação entre *L. tropica* e flebotomíneos. No Brasil, Henrique Aragão (1922) estudou um surto de LTA no Rio de Janeiro e associou os casos à presença de elevada quantidade de flebotomíneos infectados por *L. braziliensis*. Ao inocular triturados destes flebotomíneos no focinho de cães, foi observada ulceração com a presença de formas amastigotas intracelulares (Altamirano-Enciso et al. 2003).

1.2 Definição

As leishmanioses são um conjunto de doenças resultantes da infecção por protozoários digenéticos (Negrão & Ferreira 2014), pertencentes ao filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família

Trypanosomatidae (Cavalier-Smith 2016), gênero *Leishmania* (Ross 1903), com caráter zoonótico. Esses protozoários são transmitidos por insetos vetores conhecidos por flebotomíneos (Laurenti 2010; Ready 2013). O fator em comum das espécies de *Leishmania* está na necessidade de passar por um hospedeiro invertebrado, obrigatoriamente um flebotomíneo (ver item 1.7), para se reproduzirem e atingirem a forma infectante (Jones et al. 2003).

As doenças estão amplamente distribuídas em todo o mundo e dividem-se em dois grandes grupos: as leishmanioses dermatrópicas e as leishmanioses viscerotrópicas (Negrão & Ferreira 2009).

1.3. Epidemiologia

As leishmanioses representam uma das endemias de maior importância em saúde pública no mundo (Laurenti 2010). As mesmas são consideradas emergentes, em franca expansão associada à pobreza e ao deslocamento da população para áreas com ciclos de transmissão existentes, sendo incluídas na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (WHO 2014). As leishmanioses têm ampla distribuição geográfica sendo possível observar casos da doença em todos os continentes, com exceção da Antártica (Figura 1) (WHO 2009).

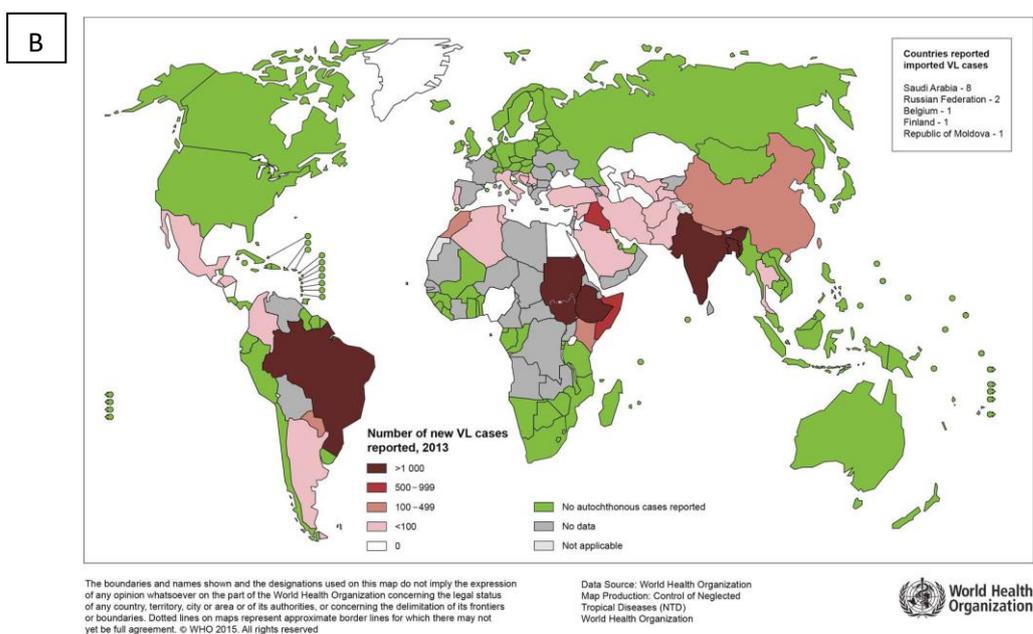
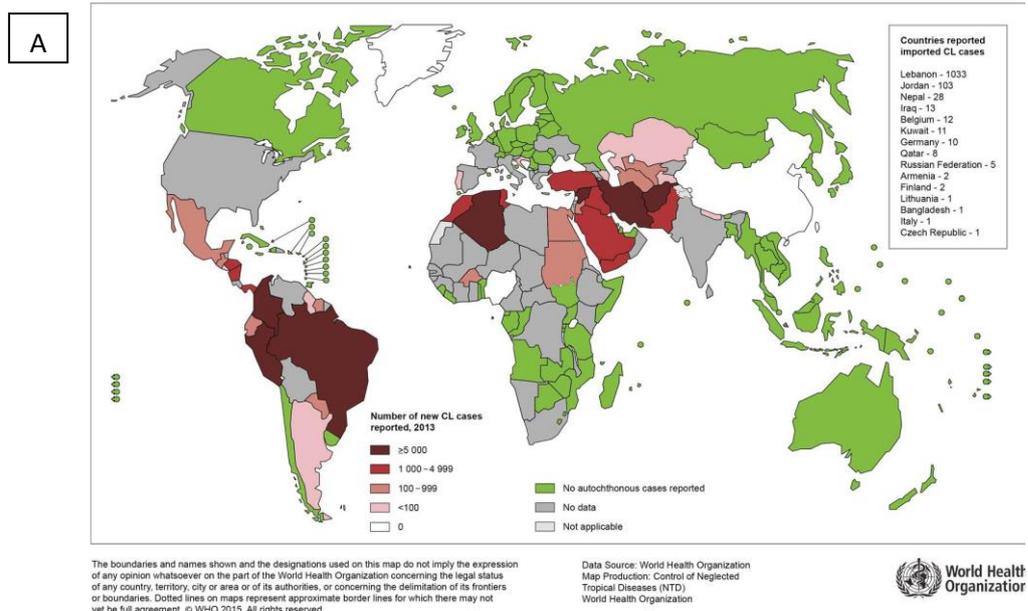


FIGURA 1. Distribuição geográfica dos casos de leishmanioses em 2013. A. Leishmaniose Tegumentar (LT). B. Leishmaniose Visceral (LV). Fonte: WHO 2016.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO 2016) são estimados 900 mil a 1,6 milhão de novos casos de leishmanioses, destes, 0,2 a 0,4 milhão de novos casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LT, onde 20 mil a 30 mil mortes ocorrem anualmente, no mundo. Ainda de acordo com

dados da WHO (2016), mais de 98 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses. Destes, 72 países estão em processo de desenvolvimento, incluindo 13 dos menos desenvolvidos e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles (Negrão & Ferreira 2014). Nas Américas as leishmanioses ocorrem em 21 países, com expansão geográfica associada à antropização dos ciclos de transmissão de *Leishmania* com o desmatamento, abertura de estradas e urbanização de áreas primitivas, que tem favorecido o ciclo peridomiciliar da doença (Dedet 1999; Negrão & Ferreira 2014).

As formas viscerotrópica e dermatrópica têm despertado especial interesse devido a sua importância médica e econômica em áreas endêmicas em regiões tropicais e subtropicais da América, África, Índia e países nas margens do Mediterrâneo (Negrão & Ferreira 2009).

A LTA é encontrada em todos os países das regiões tropicais e subtropicais do mundo (Gontijo & Carvalho 2003), exceto na Austrália, Nova Zelândia e algumas ilhas do Pacífico. Essa irregularidade na distribuição mundial é enfatizada pelo fato que os 90% dos casos tem ocorrido em apenas seis países: Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO 2008; Negrão & Ferreira 2014). A doença é descrita em quase todos os países americanos, do sul dos Estados Unidos à Patagônia, ao norte extremo da Argentina (Millán et al. 2016) com exceção do Uruguai e do Chile (Lainson 1981) verificando-se a distribuição das diversas formas clínico epidemiológicas com estreita relação com condições florísticas e faunísticas (Teodoro 1997). Na América Latina é assinalada desde a península de Yucatán, México (Castro 2002) compreendendo as províncias do norte da Argentina (Salomón 2010, Millán et al. 2016) alcançando maior importância no Brasil, além do Peru.

Negrão & Ferreira (2014) consideraram que, na América do Sul, a LTA apresenta dois padrões epidemiológicos: o padrão clássico, constituído por surtos epidêmicos associados à derrubada de matas para a construção de estradas e povoados e o padrão associado às formas de ocupação do espaço em regiões de colonização antiga.

A maioria dos casos de leishmanioses nas Américas é proveniente do Brasil (Alvar et al. 2012) onde as mesmas apresentam distribuição em todas as regiões geográficas, desde 2003 com maior incidência observada no Nordeste brasileiro (WHO 2014). No Brasil, estão incluídas na lista de doenças que compõem o Sistema de Informação de Doenças de Notificação Compulsória (Brasil 2010).

De acordo com WHO (2016), no ano de 2014 foram notificados 3.453 casos de LV no Brasil, dos quais 82% com confirmação laboratorial. Para a leishmaniose tegumentar (LT) foram notificados 19.402 casos e 89% confirmados por exames. De acordo com a mesma fonte, 43% da população brasileira está sob o risco de LV (86.997.054/ 200.362.200) e 70% sob o risco de LT (139.396.846/200.362.200). Entre os fatores de risco para a ocorrência das leishmanioses, encontra-se a subnutrição, com dietas pobres em proteínas, ferro, vitamina A e zinco, que pode comprometer a imunidade dos indivíduos, aumentando o risco de uma infecção se agravar, a precariedade das condições sanitárias domésticas como a falta de gestão de resíduos e esgoto a céu aberto, que podem aumentar os locais de criação e repouso de flebotomíneos e, bem como, o seu acesso aos seres humanos, a migração e a exposição ocupacional onde as pessoas ao se movimentarem ou se estabelecerem em áreas de florestas, ficam mais próximas do habitat de flebotomíneos, mudando o perfil epidemiológico das doenças (WHO 2014).

Negrão & Ferreira (2014) estudaram a dispersão da LT nas Américas e relataram que o crescimento migratório aliado ao processo histórico de organização espacial nas últimas décadas tem propiciado a proliferação de áreas de alto risco e infecção por *Leishmania* em áreas urbanas brasileiras, ora associadas a áreas verdes e outras como consequência do desequilíbrio ecológico, evidenciada em algumas áreas periurbanas ou associadas às áreas de desmatamentos. Os mesmos autores enfatizaram que dentro dos limites geográficos da ocorrência da doença, sua extensão e severidade variavam pelo endemismo ou ocorrência esporádica com condições ecológicas específicas em diferentes regiões. A distribuição espacial da doença em território brasileiro é resultado de diferentes condições geográficas

ou ecológicas, potencializadas pelo planejamento governamental inadequado ou ineficiente em ações que promovam a conscientização, visando o controle, prevenção ou detecção precoce da infecção em áreas de risco. Para os centros urbanos é de grande importância o conhecimento de áreas que podem oferecer risco à população exposta às formas de LTA de ocorrência ligadas ao ambiente (Negrão & Ferreira 2014).

Outro aspecto relevante dentro deste contexto de expansão e urbanização das leishmanioses em todo o mundo e principalmente no Brasil é a possibilidade de se adquirir a doença a partir de transfusões sanguíneas (Luz et al 1997; Urias et al 2009). Este fato é agravado em função do diagnóstico sorológico para a LV não estar incluído, ainda, na triagem dos doadores do país (Laurenti 2010), que se restringe a triagem laboratorial normatizada das seguintes doenças: doença de Chagas, sífilis, hepatite B, HIV, malária, HTLV 1 e 2 (Anvisa 2004).

Karagiannis-Voules et al. (2013) associaram as doenças a fatores sócio-econômicos e à precipitação. Clima, precipitação, temperatura e umidade, são fatores que podem alterar as distribuições e influenciar na sobrevivência e no tamanho das populações de vetores e de hospedeiros reservatórios. Flutuações na temperatura podem ter um efeito profundo no ciclo de desenvolvimento de promastigotas de *Leishmania* em flebotomíneos, permitindo a transmissão do parasito em áreas anteriormente não endêmicas para as doenças. Alterações climáticas que levam à seca, fome e inundações podem levar ao deslocamento em massa e a migração de pessoas para áreas com transmissão de leishmanioses (WHO 2014).

Acredita-se que os números de casos notificados não correspondam a evolução da LTA devido à demora com que o paciente procura o sistema de saúde e o difícil diagnóstico por parte do próprio sistema. Mesmo levando-se em conta as falhas de notificação compulsória, é evidente o crescente número de casos novos e a intensidade que atinge o homem, sendo proporcional às alterações ambientais decorrentes de atividades humanas em áreas específicas na área de estudo proposta. A prevalência das diferentes leishmanioses no continente americano é difícil de ser mensurada devido,

principalmente, a subnotificações, diagnósticos incorretos, afecções inaparentes, variações de resposta do hospedeiro e multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos (Marzochi 1992).

1.4 Agente Etiológico

As infecções em seres humanos e em animais por protozoários do gênero *Leishmania* recebem denominações variadas, mas podem ser agrupadas com base em suas características comuns. De acordo com Akhoundi et al. (2016) são conhecidas 53 espécies de *Leishmania* pertencentes a cinco subgêneros e complexos (*Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complexo *L. enriettii* e *Paraleishmania*). Desse total, 31 espécies parasitam espécies de mamíferos, sendo que pelo menos 20 delas infectam seres humanos. Uma vez que as formas amastigotas são morfologicamente similares (Jubb et al.1993, Palmer 1998), a diferenciação das espécies que parasitam seres humanos é realizada por testes moleculares, indispensáveis para o diagnóstico (Zampieri et al. 2016).

As espécies de *Leishmania* têm ciclos biológicos similares (Laurenti 2010), apresentando duas formas principais: a amastigota, observada dentro de células do sistema fagocitário mononuclear em tecidos dos hospedeiros vertebrados e a promastigota, encontrada no sistema digestório de flebotomíneos fêmeas (Figura 2) (Rey 2002). Ambos amastigotas e promastigotas dividem-se repetidamente por divisão binária (Palmer 1998).

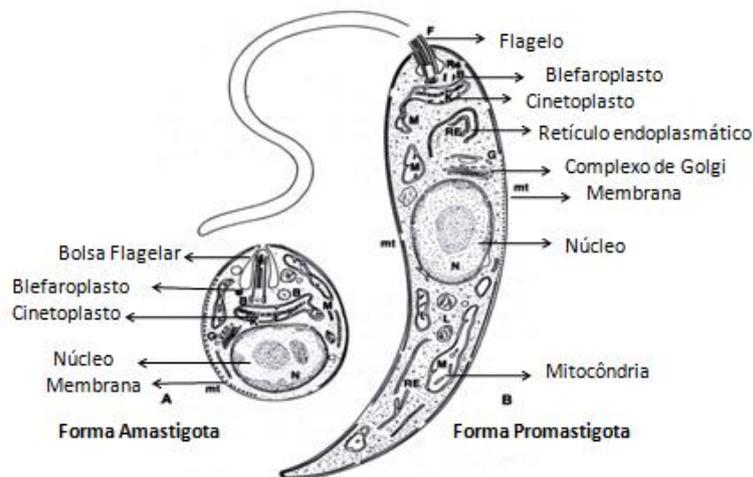


FIGURA 2 – Forma Amastigota (A) e Promastigota (B) de *Leishmania*. Fonte: Rey, 2002– CD room (Modificado).

No hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas encontram-se no interior de vacúolos parasitóforos em macrófagos e células reticuloendoteliais, e medem cerca de 1 a 2 μm de largura por 2 a 4 μm de comprimento (Palmer 1988, Jones et al. 2003). Esta forma se multiplica por divisão assexuada até o rompimento da célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, para outros tecidos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear como linfonodos, fígado, baço, medula óssea, placas de Peyer, por exemplo, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos gerando um “ciclo vicioso” (Figura 3) (Palmer 1998, Basano & Camargo 2004).

A forma amastigota da *Leishmania* é tipicamente ovóide ou esférica, não possui flagelo e nem membrana ondulatória (Palmer 1998), apenas um rudimento de flagelo que está presente na bolsa flagelar caracterizada como uma pequena invaginação da membrana do parasito (Figura 2) (Laurenti 2010). Nas preparações coradas por Romanovsky, esses organismos apresentam um citoplasma azul pálido contendo, nas proximidades da

extremidade posterior, um núcleo único, avermelhado com um cariossoma central que se cora mais profundamente. Tangenciando e anterior ao núcleo, encontra-se um corpo em forma de bastonete e com uma cor violeta escuro, o cinetoplasto, que contém o corpo parabasal e o blefaroplasto em forma de pinta (Figura 2) (Jones et al. 2003). A forma amastigota contém duas concentrações de DNA, no núcleo e em uma mitocôndria modificada, o cinetoplasto (Palmer 1998).

No seu hospedeiro invertebrado ou em culturas, os organismos assumem formas que variam desde a forma amastigota até a forma de promastigota; essa última é esguia e fusiforme, medindo cerca de 14 a 20µm de comprimento e 1,5 a 4µm de largura. Esta forma tem motilidade por meio de um flagelo que se origina no blefaroplasto e projeta-se desde o pólo anterior do organismo. O cinetoplasto se situa na extremidade anterior do corpo (Figura 2) (Jones et al. 2003).

O flebotomíneo, hospedeiro invertebrado, ao sugar sangue de um animal infectado, se infecta ao ingerir histiócitos da derme ou monócitos do sangue contendo formas amastigotas de *Leishmania* em seu citoplasma (Basano & Camargo 2004). Em seu intestino médio e glândulas salivares as leishmânias sofrem modificações morfológicas e bioquímicas, se congregam na válvula cardíaca, onde o intestino anterior projeta-se no intestino médio e se transformam em promastigotas (com flagelo livre) que aderem ao epitélio do tubo digestório, onde se multiplicam amplamente por divisões binárias. A população daí resultante migra para a parte anterior do tubo digestório do inseto, diferenciando-se para formas promastigotas infectantes por volta de 3-4 dias, com invasão da faringe do inseto, sendo também as chamadas formas de promastigotas metacíclicas encontradas na buco-faringe destes insetos. Quando os parasitos atingem o pró-ventrículo do inseto causam uma obstrução no tubo digestório dificultando a ingestão de sangue e levando a fêmea então faminta a picar muitas vezes pessoas ou animais. Tais insetos ao sugarem sangue (injetando na picada da pele a sua saliva e a saliva apresentando propriedade anticoagulante, homesostática, anestésica e vasodilatadora) injetam, também, as formas infectantes da *Leishmania*, a qual

caindo na circulação sanguínea deste novo hospedeiro (vertebrado) vai desenvolver a doença numa das formas clínicas conhecidas (Figura 3) (Palmer 1998), ou, na maioria dos casos, levar a infecções assintomáticas e auto-resolutivas (Fukutani 2014).

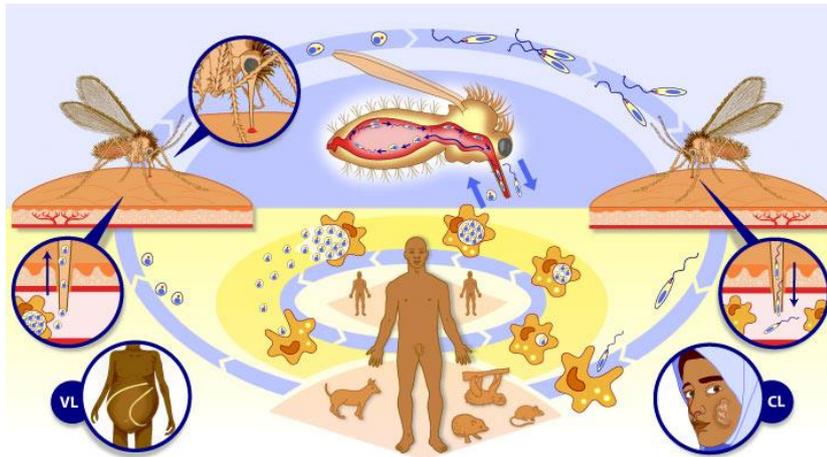


FIGURA 3 – Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania*. VL: Visceral Leishmaniasis (LV); CL: Cutaneous Leishmaniasis (LT). Fonte: TDR – Wellcome Trust

1.5 Espécies de *Leishmania* e formas clínicas de leishmaniose

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam diferentes distribuições geográficas e as enfermidades por eles causadas são relativamente distintas, embora possa haver superposição nos sinais e clínicos e lesões (Jones et al. 2003). Cerca de 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para o ser humano (Laurenti 2010). As leishmanioses se manifestam de quatro formas diferentes, a depender da espécie de *Leishmania* envolvida e do estado imunológico do hospedeiro: i) visceral também conhecida como calazar, a forma mais grave da doença; ii) cutânea, a mais comum; iii) mucocutânea; e iv) cutânea difusa. A LV é uma doença crônica sistêmica, que afeta os órgãos como o fígado e o baço. A LTA inclui as formas cutânea, cutânea difusa e mucocutânea, caracterizadas pela formação de úlceras na pele (Brasil 2006, 2010).

A LV é principalmente causada por *L. donovani* (Jubb et al. 1993). Nas Américas Central e Sul, *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) é a espécie envolvida na patogenia (Brasil 2006).

A patogenia das leishmanioses é fortemente influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro, como suas características genéticas e resposta imunológica; por fatores inerentes ao parasito, como a virulência da espécie de *Leishmania* infectante e por fatores inerentes ao vetor, como sua capacidade vetorial. Como resultado dessa interação entre as diferentes espécies do parasito, do vetor e dos mecanismos da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, um espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas é observado no homem (Laurenti 2010). Imunologicamente, após a inoculação do parasito, aqueles animais que serão resistentes à infecção promovem a ativação de células TCD4+Th1, que produzirão, entre outras, as citocinas interferon gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucinas (IL) 2 e 12. Estas, por sua vez, ativarão macrófagos que farão a destruição das formas amastigotas intracelulares (Pinelli et al. 1995). Segundo os mesmos autores, as células TCD8 citotóxicas

também podem estar envolvidas na resistência à doença. Já nos animais que manifestarão sinais clínicos da doença haverá uma supressão das células TCD4+Th1 e ativação das células TCD4+Th2, com produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, responsáveis pela proliferação de células B e, conseqüentemente produção de grande quantidade de anticorpos (Pinelli et al 1994, 1999). Anticorpos, estes, não protetores, mas muitas vezes danosos, pois formarão imunocomplexos que poderão ser depositados nas membranas basais de vários órgãos (Slappendel 1988, Martinez-Moreno et al. 1995).

Usualmente a LV é observada como enfermidade debilitante crônica com períodos de febre, perda de peso gradual, anemia e leucopenia (Jones et al. 2003). Patologicamente, o fígado pode conter numerosos granulomas e é simetricamente aumentado e marrom escuro. O baço é maior em duas a três vezes o seu tamanho normal, simetricamente aumentado e marrom-escuro a preto na sua superfície capsular. Os linfonodos estão moderadamente aumentados e irregulares sem outras mudanças significativas na cavidade abdominal, exceto os rins, que podem estar mais escuros que o normal (Jubb et al. 1993). A medula óssea é uniformemente avermelhada e amolecida (Jones et al. 2003).

As lesões microscópicas da LV caracterizam-se por uma infiltração maciça em vários sistemas do organismo de enormes macrófagos, cujo citoplasma está repleto de leishmânias. A arquitetura dos linfonodos e do baço, pode estar completamente obscurecida pelas células fagocitárias (Jones et al. 2003).

Os folículos esplênicos são hiperplásicos geralmente com hialinose folicular. Em casos avançados há atrofia de nodos e baço, e as áreas dos sinus podem estar difusamente ocupadas por grandes macrófagos altamente carregados com organismos intracitoplasmáticos e numerosas células plasmáticas. As lesões na medula óssea podem ser focais e consistem de grupos de macrófagos epitelióides com organismos fagocitados. As alterações renais são variáveis e podem consistir em manchas intersticiais com algum envolvimento parasitário (Jubb et al. 1993) e por este motivo, utiliza-se os critérios de classificação da Organização Mundial da Saúde que

inclui: glomerulopatias com alterações mínimas, glomeruloesclerose segmentar focal, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite proliferativa mesangial, glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite crescêntica e glomerulonefrite crônica (Churg et al. 1985).

A LT é causada por 18 espécies de *Leishmania* patogênicas para os seres humanos (Ready 2013). A LT causada por *L. tropica* e *L. major* ocorre principalmente no sul da Europa e nos países do norte da África que circundam o Mediterrâneo (Jones et al. 2003). Nas Américas, assim denominada LTA, a infecção humana ocorre por 11 espécies (Ready 2013) agrupadas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, onde as três espécies mais importantes do subgênero *Leishmania* são: *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis* e do subgênero *Viannia* são: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis*.

A infecção caracteriza-se por úlceras ou nódulos únicos ou múltiplos na pele com lento desenvolvimento e que, habitualmente, cicatrizam-se espontaneamente depois de um período de meses (Jones et al. 2003). As lesões cutâneas tomam forma de uma úlcera crônica que se desenvolve de pápulas inflamatórias no local da picada do inseto. Linfócitos e células plasmáticas margeiam a lesão e os neutrófilos são atraídos para os debris. Quando a inflamação se estende à borda epitelial, a ulceração ocorre. Muitos parasitos estão no interior de histiócitos e alguns estão livres no tecido (Jubb et al. 1993). As lesões de longa duração estão circunscritas por um tecido conjuntivo fibroblástico, o que lhes dá um aspecto de granuloma típico (Jones et al. 2003).

A leishmaniose mucocutânea, uma das formas clínicas da LTA, ocorre no México e nas Américas Central e do Sul. A infecção parece com a cutânea, mas, além da pele, com frequência, as úlceras crônicas com bordas elevadas e fundo granuloso estão localizadas nas junções mucocutâneas e podem ocorrer nas cavidades oral e nasal (Jones et al. 2003, Brasil 2010, Laurenti 2010).

No Brasil já foram identificadas sete espécies responsáveis pela LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três espécies mais encontradas são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. As espécies *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenbergi* e *L. shawi* foram identificadas mais recentemente em estados das regiões Norte e Nordeste (Brasil 2010).

1.6 Leishmanioses no Centro Oeste e no DF

Entre 2001 e 2012 cerca de 3.000 casos confirmados de LV e 50 mil de LTA foram registrados na região Centro-Oeste do Brasil (RCO) (www.saude.gov.br), onde há pelo menos 127 espécies de flebotomíneos registradas (Almeida et al. 2015). Essa região é coberta, em sua maioria, pelo bioma Cerrado, onde há vasta expansão agropecuária e ocupação do solo devido o crescimento urbano desordenado, o que poderia favorecer a ocorrência das leishmanioses (Galati et al. 1996, Carranza-Tamayo et al. 2010). O Centro-Oeste se destaca atualmente por estar se tornando um pólo de atração de população das demais regiões brasileiras devido à expansão da fronteira agrícola (Negrão & Ferreira 2014).

Um estudo da distribuição territorial da LTA no Brasil (Negrão & Ferreira 2014) mostrou que o Centro-Oeste corresponde a segunda maior região em coeficiente de detecção da doença de 2001 a 2010 (19,9 casos por 100.000 habitantes). Em Goiás, o número de municípios com registro da doença passou de 71 (30,6%) em 1994 para 118 (48,7%) em 1999, o que corresponde a um acréscimo de 67% (Costa 2005). O Estado do Mato Grosso é detentor do terceiro maior coeficiente de detecção – 76,5 casos por 100.000 habitantes. O Distrito Federal (DF) registra a transmissão da LTA de ocorrência cíclica desde 1992 e, a partir de então, apresenta coeficientes de detecção bem inferiores ao que é considerado como baixo, segundo parâmetros do Ministério da Saúde (<2,5 casos por 100.000 habitantes)

(Carvalho et al. 2010). Com a expansão das fronteiras agrícolas nesta região principalmente nos estados de Mato Grosso e Goiás, estes Estados passaram a ser importante rota de fixação do homem.

No DF há evidência de transmissão autóctone de LTA. O número de casos notificados de LTA procedentes do DF nos anos de 2003, 2004 e 2005 foi de 31, 57 e 26, respectivamente (Sampaio et al. 2009). O primeiro caso de LV autóctone no DF ocorreu em 2005 e três óbitos foram confirmados até 2009 (Carranza-Tamayo et al. 2010). Entre 2007 e 2012, 24 casos humanos de LV autóctone foram registrados (SES/DF 2012). Em 2013 foram notificadas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN/NET, 98 pessoas com suspeita de LV e 47 foram confirmadas, sendo dois casos autóctones provenientes de Sobradinho e Lago Norte dos quais um veio a óbito.

Segundo dados do Boletim Epidemiológico das Leishmanioses no DF para o ano de 2015, dos 142 casos de LV notificados, 39 foram confirmados, destes, três autóctones e 36 importados. Foram atendidos 39 pacientes nas unidades hospitalares do DF, desses, quatro evoluíram a óbito, dos quais um autóctone da RA da Fercal e três importados. De janeiro a março de 2016 foram notificados 28 casos de LV, dentre eles um caso autóctone, proveniente do Lago Norte, além de sete importados e dois em investigação para a definição do Local Provável de Infecção (LPI). Dos dez casos confirmados em 2016, foram atendidos dez pacientes nas unidades hospitalares do DF, desses, dois evoluíram a óbito, dos quais, um importado do estado de Goiás e um encontra-se em investigação para definir o LPI.

Em relação à LTA no DF, segundo dados do Boletim Epidemiológico das Leishmanioses no DF para o ano de 2015, foram confirmados 50 casos, destes, 35 são residentes do DF, 14 de outras Unidades Federadas, e um da Guiana Francesa. Dos 50 casos confirmados, 35 são importados, nove indeterminados, seis em investigação e nenhum autóctone. Não foi registrado nenhum óbito relacionado à LTA no período. Dados do Boletim Epidemiológico de janeiro a março de 2016, confirmam sete casos da doença mas nenhum caso autóctone foi registrado. Além disso, nos últimos anos têm sido registrados casos de LV em cães domésticos nas regiões norte e sul do

DF, que vem sofrendo com a urbanização descontrolada da sua área rural (Carranza-Tamayo et al. 2010, Cardoso et al. 2015).

1.7 Vetores

Flebotomíneos (ordem Diptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotominae) são insetos com ampla distribuição geográfica, ocorrendo sob as mais diversas condições climáticas e de altitude, nos ambientes silvestres, rurais e urbanos. Atualmente, conhece-se cerca de 1.003 espécies, das quais 537 estão presentes na região Neotropical e Neoártica, destas, 277 foram registradas no Brasil, representando 28% do total e 53% das que ocorrem na Região Neotropical (Shimabukuro et al. 2017). Dezenove espécies de flebotomíneos estão incriminadas como vetoras de espécies de *Leishmania* (Basano & Camargo 2004, Shimabukuro & Galati 2010).

Flebotomíneos são insetos pequenos, de cor parda (“mosquito-palha”) e de corpo cerdoso, que normalmente não ultrapassam 0,5 cm de comprimento, têm pernas longas e delgadas e apresentam como característica o voo saltitante. Ao contrário dos outros dípteros, os flebotomíneos mantêm a postura ereta das asas, mesmo em repouso. Apenas as fêmeas fazem repasto sanguíneo por serem adaptadas com o aparelho bucal picador-sugador (Killick-Kendrick, 1999; Basano & Camargo, 2004). A hematofagia é indispensável ao desenvolvimento ovariano (Carrera 1991). Entre os inúmeros nomes populares, que variam segundo os países e as suas regiões, encontram-se: mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado (Martins et al. 1978). As formas imaturas podem ser encontradas em seus criadouros em solo úmido, mas não molhado, e em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição (Brazil & Brazil 2003).

As fêmeas dos flebotomíneos geralmente apresentam hábito noturno, procuram fazer repasto sanguíneo ao entardecer e começo da noite, quando transmitem o parasito para o novo hospedeiro. Já os machos alimentam-se de frutas, seiva de plantas, entre outros, por breve período (Killick-Kendrick,1999). Durante o dia, os flebotomíneos procuram abrigo ou no interior das residências ou em matas em local protegido dos ventos. São frequentemente encontrados em tocas de outros animais como tatu, buracos em paredes de construções, ocos de paus ou bambus ou similares. Em matas fechadas, devido a pouca luz em seu interior, podem ser vistos mesmo durante o dia, inclusive ativos a procura de possíveis animais ou o próprio homem para ser sugado (Basano & Camargo 2004).

Killick-Kendrick (1990), propõem quatro critérios que devem ser observados antes de se incriminar uma espécie como vetora de zoonoses, são eles: alimentar-se em humanos e no reservatório animal, manter os parasitos após a ingestão, exibir parasitos indistinguíveis daqueles isolados de pacientes e transmitir o parasito pela picada. Adicionalmente Ready (2013) propõe o critério relacionado a influência da abundância do vetor na incidência da leishmaniose comprovada por modelos matemáticos.

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Ny. umbratilis*, *Ny. neivai*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (Barbosa et al. 2008, Ready 2013, Diniz et al. 2014). Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como potenciais vetores, de acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana do Ministério da Saúde, por atenderem a alguns dos critérios que atribuem a uma espécie a capacidade vetorial, segundo Killick-Kendrick & Ward (1981), Killick-Kendrick (1990) e Ready (2013). Cabe ressaltar que o papel vetorial de cada uma dessas espécies dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino, da sua capacidade de se infectar e transmitir o parasito a um novo hospedeiro (Brasil 2010, Pita-Pereira et al. 2009, 2011).

O principal vetor da LV nas Américas é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, espécie bem adaptada ao ambiente peridoméstico e com ampla

distribuição geográfica (Brasil 2010), porém, outros flebotomíneos também podem estar participando do ciclo de LV, principalmente nas áreas onde *Lu. longipalpis* é ausente (de Souza et al. 2003, de Carvalho et al. 2010). *Lutzomyia cruzi* parece participar como vetor nos municípios de Corumbá e Ladário/MS, na fronteira entre Brasil e Bolívia (Dos Santos et al. 1998) e *Pintomyia (Pifanomyia) evansi* é também um importante vetor na Colômbia (Travi et al. 1990, Oviedo & Moreno 1995, Montoya-Lerma & Lane 1996, Travi et al. 1996) e Venezuela (Pifano 1964, Feliciangeli et al 1998).

1.8 Flebotomíneos no DF

Atualmente, conhece-se 29 espécies de flebotomíneos no DF (Quadro1).

QUADRO 1. Fauna flebotomínica do Distrito Federal até 2015. Fonte: Carvalho et al. 1989; Carvalho et al. 2010; Ferreira et al. 2014; Almeida et al. 2015; Galati 2015

Espécies
<i>Brumptomyia avellari</i> (Costa Lima, 1932)
<i>Brumptomyia pinto</i> (Costa Lima, 1932)
<i>Micropygomyia longipennis</i> (Barretto, 1946)
<i>Micropygomyia acanthopharynx</i> (Martins, Falcão & Silva, 1962)
<i>Micropygomyia quinquefer</i> (Dyar, 1929)
<i>Evandromyia bacula</i> (Martins, Falcão & Silva, 1965)
<i>Evandromyia evandroi</i> (Costa Lima & Antunes, 1936)
<i>Evandromyia corumbaensis</i> (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989)
<i>Evandromyia teratodes</i> (Martins, Falcão & Silva, 1964)
<i>Evandromyia sallesi</i> (Galvão & Coutinho, 1939)
<i>Evandromyia saulensis</i> (Floch & Abonnenc, 1944)
<i>Evandromyia lenti</i> (Mangabeira, 1938)
<i>Pintomyia christenseni</i> (Young & Duncan 1994)
<i>Pintomyia kuscheli</i> (Le Pont, Martinez, Torrez-Espejo & Dujardin, 1998)
<i>Pintomyia monticola</i> (Costa Lima, 1932)
<i>Pintomyia fischeri</i> (Pinto, 1926)
<i>Sciopemyia servulolimai</i> (Damasceno & Causey, 1945)

Continuação QUADRO 1.

<i>Sciopemyia sordellii</i> (Shannon & Del Ponte, 1927)
<i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912)
<i>Lutzomyia ischnacantha</i> Martins, Souza & Falcão, 1962
<i>Psathyromyia lutziana</i> (Costa Lima, 1932)
<i>Psathyromyia runoides</i> (Fairchild & Hertig, 1953)
<i>Psathyromyia brasiliensis</i> (Costa Lima, 1932)
<i>Psathyromyia aragaoi</i> (Costa Lima, 1932)
<i>Psathyromyia shannoni</i> (Dyar, 1929)
<i>Nyssomyia whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)
<i>Nyssomyia neivai</i> (Pinto, 1926)
<i>Nyssomyia intermedia</i> (Lutz & Neiva, 1912)
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942)

No trabalho de Carvalho et al (2010), foram coletados mais de 17 mil flebotomíneos de 27 espécies em diversos ambientes como nas diferentes fitofisionomias do Cerrado, abrigo de animais e no intradomicílio. Os autores identificaram mais duas espécies consideradas vetoras, *Ny. neivai* e *Ps. davisi* que auxiliaram no mapeamento das áreas de risco à transmissão de *Leishmania*.

Ferreira et al. (2014) analisaram a ocorrência de flebotomíneos em matas de galeria do Distrito Federal (DF) nas estações seca e chuvosa. Os autores não capturaram flebotomíneos em novembro (estação chuvosa) e em maio (estação seca) foram capturados 250 exemplares identificados como *Psathyromyia runoides* (79,9%), *Pintomyia monticola* (9,7%), *Mi. quinquefer* (3,7%), *Pa. shannoni* (3%), *Bi. flaviscutellata* (0,7%), *Brumptomyia* sp. (0,7%), *Pi. kuscheli* (0,7%), *Pa. lutziana* (Costa Lima) (0,7%) e *Sciopemyia sordellii* (0,7%). De acordo com os resultados, os autores relataram que em matas de galeria do DF haveria maior ocorrência de flebotomíneos na estação seca, no

nível do solo e em áreas preservadas. As espécies *Pa. runoides*, *Pi. kuscheli* e *Mi. quinquefer* foram registradas pela primeira vez no DF.

Informações relevantes relacionadas à riqueza de espécies, abundância, ocorrência em distintas épocas do ano somam dados que podem ser usados para a melhor compreensão da epidemiologia das doenças e conhecimento do comportamento dos flebotomíneos nas matas de galeria próximas às áreas urbanas no DF.

1.9 Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* spp.

Segundo Ashford (1996), o reservatório de uma infecção é definido como o sistema ecológico no qual um agente infeccioso sobrevive persistentemente. Para as infecções de transmissão vetorial, o sistema compreenderia um ou mais vetores e um ou mais mamíferos hospedeiros, que viveriam sob condições de densidade populacional, proximidade espacial, entre outros fatores que permitiriam a transferência continuada do agente entre eles. O autor designa o hospedeiro mamífero responsável pela manutenção em longo prazo do agente infeccioso de hospedeiro reservatório e define como zoonose uma doença causada por parasitos cujos hospedeiros são o homem e outros mamíferos.

Entretanto, a definição de reservatório tem sofrido mudanças significativas no último século, fazendo-se necessário o estudo das zoonoses a partir de perspectivas mais abrangentes. Atualmente, aceita-se que um reservatório pode ser uma espécie ou um complexo delas responsáveis pela manutenção do parasito na natureza. Dentro desse sistema-reservatório, cada hospedeiro desenvolve papéis diferentes na transmissão em um determinado tempo e espaço, isso é, considera-se que “hospedeiros de manutenção” sejam os mamíferos que podem ser infectados e mantêm a infecção e que “hospedeiros amplificadores” sejam os mamíferos que além de manterem a

infecção, desempenham uma característica que favoreça a transmissão como a presença de mais parasitos no sangue e pele por períodos maiores (Roque & Jansen 2014). Um estudo de reservatórios silvestres e sinantrópicos de espécies de *Leishmania* nas Américas distinguiu as espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos encontrados infectados com *Leishmania* spp. classificando-os em hospedeiros e "potenciais reservatórios" (Roque & Jansen 2014) de acordo com a capacidade de manutenção da infecção ou de transmissibilidade dos parasitos aos vetores, por meio de xenodiagnóstico positivo ou culturas de pele ou sangue.

1.10 Diversidade e espécies mais importantes de hospedeiros e reservatórios

Desde o século passado, a comunidade científica tem demonstrado que diferentes e numerosos mamíferos silvestres podem se tornar infectados com espécies de *Leishmania*, além das espécies domésticas e sinantrópicas (animais não domesticados que habitualmente compartilham e aproveitam-se do ecótopo humano) (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006, Roque & Jansen 2014). Entretanto, o foco deve ser mudado para a identificação de espécies que podem servir como fontes de infecção para vetores e amplificação de focos enzoóticos, temporalmente e regionalmente específicos, constituindo um risco para a transmissão humana. Esta mudança depende da melhor compreensão de sistemas reservatórios e do papel desempenhado por cada espécie de mamífero na manutenção destes parasitos na natureza (Roque & Jansen 2014). Diversas espécies das ordens Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Rodentia, Carnivora, Primata e Chiroptera foram recentemente classificadas como hospedeiros ou potenciais reservatórios por Roque & Jansen (2014).

Os cães domésticos (*Canis familiaris*) são considerados eficientes reservatórios de *L. infantum*, devido à alta susceptibilidade à infecção, ao frequentemente elevado parasitismo nesta espécie e por causa da sua íntima relação com o homem, tanto nas zonas urbanas quanto rurais (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). Os cães, como importantes reservatórios domésticos de *L. infantum*, são responsabilizados pela manutenção das endemias nos grandes centros urbanos (Silva et al. 2001, Medeiros et al. 2005). Uma considerável gama dos cães infectados por espécies de *Leishmania* são assintomáticos, seja por um determinado período de tempo que pode chegar a anos até nunca apresentar sinais clínicos ou sintomas da doença. Porém, os cães não são as únicas fontes de infecção em todos os focos de LV no Brasil (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). Também existe uma forte tendência para que os cães assumam o papel de principais reservatórios domésticos para *L. braziliensis*, o agente etiológico da LTA mais disseminado (Aguilar et al. 1989, Madeira et al. 2003, 2006, Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006, Castro et al. 2007, Quaresma et al. 2011). Entre os estudos que relatam casos de infecção mista por *L. infantum* e *L. braziliensis*, encontra-se os trabalhos de Madeira et al. (2006) e Quaresma et al. (2011).

Além dos carnívoros descritos por Roque & Jansen (2014), *Cerdocyon thous*, popularmente conhecido como cachorro do mato ou guaraxaim já era suspeito de desempenhar o papel de hospedeiro reservatório primário de *L. infantum* no Norte do Brasil (Lainson et al. 1969). Os mesmos autores descreveram a eficiência dessa espécie como fonte de infecção em 1990. Este canídeo também tem sido incriminado como hospedeiro reservatório primário na Venezuela (Lainson et al. 1987). Figueiredo et al (2008) relataram o primeiro caso de *L. infantum* em cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) no Brasil, no Estado do Mato Grosso. Os autores chamam a atenção para os controles parasitológicos em animais silvestres mantidos em cativeiros, principalmente quando estes fazem intercâmbios entre zoológicos brasileiros. Também no Mato Grosso, Souza et al. (2010) relataram a infecção de canídeos silvestres por *L. infantum* mantidos em cativeiro. Foram coletadas amostras de pele, medula óssea e linfonodos de seis raposas (*Cerdocyon thous*) e um cachorro vinagre (*Speothos venaticus*), para detecção e

caracterização de *Leishmania* sp. pela técnica de PCR-RFLP. Todos os animais pesquisados apresentaram-se positivos para *L. infantum*. O estudo destaca a importância de monitoramento adequado dos animais e do maior controle desta enfermidade já que os animais estudados estavam em ambientes de recreação pública.

De maneira geral, as taxas de infecção em canídeos não domésticos são baixas, mas pode ser alta, às vezes, como observado nas raposas da América do Sul (Lainson et al. 1987). Porém, canídeos silvestres, normalmente, não vivem perto de habitações humanas e logo, eles teriam um papel secundário na importância da epidemiologia da LV enzoótica (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). Millán et al. (2016), encontraram *Leishmania* sp. em 37.5 % das 32 raposas cinzas (*Pseudalopex griseus*) capturadas na Patagônia Argentina. Os achados dos autores têm elevada significância pela extensão da área de distribuição das leishmanioses na América do Sul, por suportar a existência de um ciclo silvestre na ausência de cães e ainda na transmissão, indicando que ou a distribuição de flebotomíneos é mais ampla do que se pensava ou que a transmissão de *Leishmania* por outros artrópodes poderia ser possível.

De acordo com Medeiros et al. (2005) marsupiais didelfídeos estão entre os principais reservatórios rurais da doença. *Didelphis albiventris* foi o primeiro mamífero silvestre não canino a ser descrito como hospedeiro de *L. infantum* no Novo Mundo (Sherlock et al. 1984). Em áreas endêmicas do Brasil e na Colômbia, espécies de *Didelphis* têm frequentemente abrigado *L. infantum* (Corredor et al. 1989, Travi et al. 1994, Sherlock 1996, Cabrera et al. 2003, Humberg et al. 2012, Carreira et al. 2012) e a presença de *D. albiventris* poderia ser um fator associado a ocorrência de infecções assintomáticas por *Leishmania* na periferia de centros urbanos (Carranza-Tamayo et al. 2016). Outros marsupiais como *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum* e *Metachirus nudicaudatus*, já foram detectados com *Leishmania amazonensis* (Lainson et al. 1981) mostrando que esses mamíferos desempenham papel importante na manutenção de *Leishmania* na natureza. Em Barra de Guaratiba, estado do Rio de Janeiro, a distância das casas para as bordas

florestais, sua altitude e a presença de *D. marsupialis* nos quintais das casas foram considerados fatores preditores para infecção por *L. infantum* em cães (Cabrera et al. 2003).

Roedores sinantrópicos da família Muridae como o rato de telhado (*Rattus rattus*), e o camundongo (*Mus musculus*), compõem a lista de espécies de potenciais reservatórios ou hospedeiros, conforme a espécie de *Leishmania* encontrada e o local (Roque & Jansen 2014). *Rattus rattus* já foi encontrado naturalmente infectado por *L. infantum* (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). De Lima et al. (2002), isolaram *Leishmania braziliensis* de *R. rattus*, na Venezuela e Brandão-Filho (2003) encontrou *L. braziliensis* por meio de eletroforese enzimática multilocus nesse mesmo hospedeiro. Esse processo de domiciliação facilita a ligação entre os ambientes peridoméstico e o silvestre (Lainson et al. 1969) podendo estabelecer novos padrões epidemiológicos de LV, particularmente no ciclo urbano de transmissão (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006).

Helhazar et al. (2013) reportaram pela primeira vez, em Portugal, a infecção natural por *L. infantum* em *M. musculus* e em *Rattus norvegicus* (ratazana), sugerindo que estes animais provavelmente desempenham papéis como potenciais reservatórios no ciclo biológico do parasito. Os autores relatam que *M. musculus* e *R. norvegicus* são animais que se proliferam muito rápido e têm uma expectativa de vida de 12 e 24 meses, respectivamente, o que poderia manter o parasito disponível por pelo menos um ano mesmo durante a baixa atividade dos flebotomíneos em determinadas estações do ano. Na Venezuela, De Lima e colaboradores (2002), isolaram *L. braziliensis* em *Sigmodon hispidus* (rato do algodão), além do *R. rattus*.

Mais de 200 espécies de roedores estão distribuídas em habitats semi-aquáticos, terrestres e semi-fossoriais no Brasil (Bonvicino et al. 2008). Esta característica é, provavelmente, a principal razão que explica a sua exposição aos diferentes ciclos de transmissão de várias espécies de *Leishmania* no ambiente silvestre (Roque & Jansen 2014a).

No Brasil, Pádua et al. (2011) relataram infecção natural por *L. braziliensis* no roedor sinantrópico *M. musculus* e no roedor silvestre *Necromys lasiurus* a partir de análises moleculares (PCR-RFLP) de medula óssea femoral e fragmentos de pele. Freitas et al. (2012), no Estado de Mato Grosso, uma região endêmica para leishmaniose cutânea, relataram infecção natural nas mesmas espécies e utilizando a mesma metodologia que Pádua et al. (2011), mostraram que a presença de *Leishmania* em roedores sinantrópicos pode ser uma ameaça aos humanos devido a coabitação de domicílios humanos nessa área de estudo.

No Brasil, existem poucos estudos de infecção natural de *Leishmania* em roedores caviomorfos e cerca de 90 espécimes foram analisados (Lainson et al. 1981, Quaresma et al. 2011). Estudos experimentais apontaram duas espécies de caviomorfos como reservatórios potenciais para *Leishmania*: *Thrichomys laurentius* infectado por *L. infantum* e *L. braziliensis* (Roque et al. 2010) e *Proechimys semispinosus* infectados com *L. infantum* (Travi et al. 2002). Lainson & Shaw (1968) encontraram o parasito *L. amazonensis* no roedor *Proechimys guyannensis* no norte do estado do Pará (Lainson & Shaw 1972). *Proechimys cuvieri* foi descrito como hospedeiro de *Leishmania* spp. na Guiana Francesa por Dedet et al. (1985).

Um estudo de Brandão-Filho et al. (1994) em pequenos mamíferos prováveis reservatórios de *L. braziliensis* em Amaraji, Pernambuco, encontrou amostras de esfregaços hepáticos e esplênicos com amastigotas em *Nectomys squamipes*, *N. lasiurus* e também em *R. rattus*. Após quase 10 anos, um estudo realizado na mesma localidade de Pernambuco identificou *L. braziliensis* em *R. rattus* e *N. lasiurus* (Brandão-Filho et al. 2003)

Forattini et al. (1972, 1973), isolaram *Leishmania* de *Akodon arviculoides*, *Oryzomys nigripes* e *Oryzomys capito laticeps*. Telleria et al. (1999) identificaram *Leishmania amazonensis* em *Akodon* spp. por PCR kDNA. Exames histológicos de lesões nos roedores *Oryzomys* spp., *Nectomys spinosus amoenus* e *Nectomys rattus* revelaram amastigotas compatíveis com *Leishmania* (Lainson & Shaw 1970). *Leishmania amazonensis* foi isolada de

Proechimys guyannensis (família Echimyidae) e *Dasyprocta* sp. (família Dasyproctidae) por Lainson et al. (1981).

Quaresma et al. (2011), encontraram *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis* nos roedores silvestres *Thrichomys apereoides* e *Rhipidomys mastacalis*, no roedor sinantrópico *Rattus rattus* e nos marsupiais *Didelphis albiventris*, *Gracilinanus agilis* e *Marmosops incanus*, na Reserva Indígena Xakriabá, região norte de Minas Gerais, considerada uma área endêmica para leishmanioses. Os parasitos foram identificados por PCR e a *L. guyanensis* foi relatada pela primeira vez fora da região norte do Brasil. Antes disso, *L. guyanensis* já havia sido isolada em *Didelphis marsupialis*, *Proechimys guyannensis* e *Tamandua tetradactyla* por Lainson et al. (1981).

Sabe-se que *L. guyanensis* é encontrada ao norte do rio Amazonas além do Suriname e da Guiana Francesa em hospedeiros silvestres como o bicho preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), roedores e marsupiais (Gentile et al. 1981, Lainson et al. 1981) e infecta seres humanos no Brasil.

Leishmania spp. foi isolada de tatu galinha (*Dasypus novemcinctus*) por Lainson et al. (1979). Silveira et al. (1991) foram os responsáveis pelo primeiro isolamento de *Leishmania lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Família Cuniculidae).

No Distrito Federal, Cardoso et al. (2015) identificaram seis espécies de mamíferos silvestres que possivelmente participam na transmissão enzoótica de *Leishmania* spp. no Parque Nacional de Brasília e Reserva Biológica da Contagem na região nordeste do DF, são elas: *Clyomys laticeps*, *Gracilinanus agilis*, *N. lasiurus*, *Nectomys rattus*, *Rhipidomys macrurus* e *Didelphis albiventris*. Foi o primeiro registro de *L. amazonensis* no roedor silvestre *N. lasiurus* no Brasil Central. Os mesmos autores detectaram cães infectados por *L. infantum* em casas ao redor das matas estudadas. Estes e outros animais silvestres podem estar envolvidos na manutenção do ciclo enzoótico de *L. infantum* atuando como hospedeiros reservatórios primários do parasito (Dantas Torres & Brandão-Filho 2006). Herenio et al. (2014), analisaram

dados de prontuários do Centro de Zoonoses de Brasília, Distrito Federal, de 6.422 cães, de ambos os sexos, diferentes idades, raças e local de origem, no período de janeiro a outubro de 2013 e encontraram 9,19% de resultados positivos para a LV canina. Segundo os autores, o maior número de casos confirmados ocorreu nos meses de abril e maio, com 13,6% e 16,6%, respectivamente e as menores porcentagens nos meses de outubro e agosto, com 5,4% e 6,1%, respectivamente. As regiões administrativas apontadas com maior incidência de casos positivos foram Sobradinho com 19,3% e Lago Norte com 18,3%.

As leishmanioses são doenças focais e a epidemiologia local deve diferir-se entre regiões (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). Conseqüentemente, a compreensão sobre detalhes da estrutura do sistema de reservatórios em cada foco é um passo crucial para a adoção de medidas eficientes de controle baseadas nos reservatórios da infecção. Nos últimos anos, foram obtidos avanços sobre o conhecimento da estrutura desses sistemas de reservatórios mas muito ainda necessita ser descoberto (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006).

1.11 A questão ambiental do Distrito Federal

O Distrito Federal (DF) ocupa uma área de aproximadamente 5.800,00 Km² dentro do estado de Goiás, limitada a oeste pelo Rio Descoberto e a leste pelo Rio Preto (IBGE, 2016). A linha imaginária do paralelo 15°30'00" marca sua divisa ao norte, e o extremo sul é delimitado pelo paralelo 16°03'06" (SEBRAE/DF, 1995). Apresenta uma topografia suave, com altitude entre 750 e 1.349 metros acima do nível do mar e é drenado pelos rios pertencentes às mais importantes bacias fluviais do Brasil - Bacia Platina, Bacia São Franciscana e Bacia Amazônica (Viero et al. 2014).

No Planalto Central predomina o Cerrado, que pertence a uma paisagem vegetal mundialmente conhecida como savana (Paparelle & Henkes 2013). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, abriga alta diversidade de espécies, muitas dessas endêmicas (Klink & Machado 2005).

Os Cerrados brasileiros são as savanas mais ricas do mundo, com sua variedade de climas, solos e sua grande diversidade genética, que se reflete na formação de ecossistemas únicos. O DF encontra-se no centro desse complexo e possui em sua área todos os tipos de vegetação normalmente englobados no termo Cerrado: o “Cerrado arbóreo”, o “Cerrado de savana” e o “Cerrado de campos gramíneos” como suas principais formas de vegetação. As matas de galerias e palmares inundados são encontradas ao longo dos rios e riachos, na parte mais baixa dos vales. Os limites do Cerrado com as matas de galeria podem ser diretos ou a partir de campos gramíneos inundados em determinadas épocas do ano, os quais se encontram nas encostas dos vales (Eiten 1984). Áreas de Cerrado são encontradas em todo o território do DF e restam apenas 37% da cobertura vegetal nativa (Paparelle & Henkes 2013).

Entre as formações mais ameaçadas do bioma Cerrado destaca-se a matas de galeria (Artioli 2011), que são de grande importância na manutenção dos mananciais de água; as quais apresentam um ambiente bastante heterogêneo, onde habitam numerosas espécies, apresentando um índice de diversidade muito maior ao encontrado em outras formações florestais (Rezende 1998). Funcionam ainda como corredores ecológicos sendo fundamentais para a conservação do solo, dos recursos hídricos e da fauna, silvestre e aquática (Artioli 2011).

As matas de galeria mesmo sendo consideradas Áreas de Preservação Permanente (APPs) protegidas pelo Código Florestal Brasileiro (Lei nº. 4.771/1965), no DF já perderam aproximadamente 50% de sua cobertura original (UNESCO 2002). De acordo com a Superintendência de Gestão de Áreas Protegidas do Instituto Brasília Ambiental (IBRAM), o Cerrado no DF recebe ameaças e pressões antrópicas, como a ocupação urbana irregular e descontrolada, representada por condomínios e parcelamentos rurais para

chácaras de recreio. Além dessa ocupação, destacam-se as atividades irregulares de mineração, responsáveis juntamente com o parcelamento irregular do solo, pelo assoreamento dos cursos d'água e em especial do Lago Paranoá (Paparelle & Henkes 2013).

Segundo Moraes (2007) Brasília “foi planejada com o propósito estratégico de desenvolver o interior do país”, mas a ocupação do DF apresenta conflitos e contradições. Destaca-se o crescente número de habitantes, vindos de várias regiões do Brasil, especialmente do Nordeste, desde a construção da capital até os dias atuais, atraídos por oportunidades de emprego e melhoria na qualidade de vida. Associada a essa migração, uma política de distribuição de lotes aumentou ainda mais a chegada de migrantes com a finalidade de formar “currais eleitorais” na década de 1990. Isso gerou uma ocupação desordenada das áreas planejadas para serem áreas verdes.

Brasília é uma cidade que extrapola seus limites e abriga uma população estimada de 2.977,216 habitantes, segundo publicação do IBGE (2016). De acordo com Garcia et al. (2011) quase 50% das áreas das Unidades de Conservação (UC) já foram convertidas em uso antrópico. Entre 2002 e 2009, foram registrados 13 Km² de desmatamento no DF.

As áreas mais críticas são as Áreas de Proteção Ambiental (APA) do Paranoá, do São Bartolomeu, do Descoberto e do Cafuringa, que abrigam a maior parte dos condomínios e parcelamentos irregulares do solo. A situação dessas áreas é muito sensível, exigindo do poder público uma atuação constante por meio da fiscalização articulada entre diversos órgãos do Governo do Distrito Federal (GDF), sob a coordenação da Secretaria de Estado de Fiscalização das Atividades Urbanas, responsável pela retirada de invasões e coibição de parcelamentos irregulares do solo e da extração clandestina de minerais como areia, argila, cascalho entre outros (Paparelle & Henkes 2013). No período de 1995 a 2005 o aumento no número de parcelamentos urbanos foi de 54,5% (Artioli 2011).

A criação da Reserva da Biosfera do Cerrado no DF foi o primeiro reconhecimento oficial internacional da importância do bioma. A reserva

engloba cerca de 50.670 hectares, estando incluídos os seguintes núcleos de preservação: o Parque Nacional de Brasília, a Estação Ecológica de Águas Emendadas, a Estação Ecológica do Jardim Botânico de Brasília, a Reserva Ecológica do IBGE e a Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (IBRAM – Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos do Distrito Federal). As reservas devem cumprir três funções básicas: a conservação da biodiversidade, das paisagens e da cultura; o desenvolvimento sustentável e a educação ambiental; e o apoio logístico à pesquisa, ao monitoramento e às ações em favor do desenvolvimento (Paparelle & Henkes 2013).

De maneira desordenada a intervenção antrópica vêm causando danos irreversíveis ao bioma Cerrado. Isso coloca o Cerrado entre os “hotspots” mundiais da biodiversidade, pois é um bioma de alta biodiversidade sob a ameaça de destruição (Artioli 2011).

A abordagem de “apenas estabelecer reservas” como meio para a interrupção da perda da diversidade é inadequada. O crescimento descontrolado da população humana e a ação antrópica que participa na formação de chuvas ácidas e mudanças climáticas continuam a interferir no processo de perda da biodiversidade (Ehrlich 1988).

1.12 A fragmentação florestal e as leishmanioses

A fragmentação florestal é uma das principais causas de modificação na composição de espécies de uma comunidade, pois as alterações antrópicas do ambiente natural influenciam a eco-epidemiologia das doenças infecciosas e resultam na emergência de novas doenças, na modificação do modo de transmissão e em suas áreas de ocorrência (Ehrlich, 1988).

Kessing & Ostfeld (2006) mostram a relação entre diversidade de espécies e o risco de doença indicando que o isolamento causado pela

fragmentação dos habitats resulta em maior susceptibilidade à extinção e redução na biodiversidade. Fatores como diminuição do tamanho da população efetiva, menores taxas de migração e dispersão, maior perda da variabilidade genética e redução nas interações ecológicas podem influenciar no aparecimento das zoonoses. Os autores se basearam em duas propostas principais de “Efeito Diluição” e de “Efeito de Amplificação” que são similares na sugestão de que mudanças na diversidade de espécies alteram a dinâmica hospedeiro-patógeno e, em parte, afetam a prevalência de doenças.

O efeito diluição prediz que a diversidade de espécies diminui a prevalência de doenças a partir de mecanismos como a diminuição da densidade de hospedeiros, diminuição de encontros entre hospedeiros ou redução da sobrevivência dos hospedeiros. Em contraste, o efeito de amplificação prediz o aumento na prevalência de doenças com diversidade de espécies menor, a partir do aumento de encontros entre hospedeiros ou da presença de hospedeiros de doenças secundárias (Kessing & Ostfeld 2006).

Ainda segundo os autores, comunidades mais diversas podem diminuir o risco de epizootias e epidemias ao impedir a dominância de espécies consideradas vetoras ou reservatórias de determinadas doenças. Pois, em ambientes fragmentados, sob efeito de borda, há pobreza de diversidade de espécies, há generalismo e antropofilia dos vetores ou reservatórios competentes que estão adaptados e se beneficiam da nova condição da fragmentação, logo, o risco de infecção para o homem pode ser maior (Nardi 2010).

O processo de fragmentação cria uma borda de floresta onde não existia anteriormente. Essa borda difere das zonas de ecotonia natural, que são caracterizadas por um gradiente natural de limites entre dois habitats, pois na borda, existe uma quebra abrupta da paisagem, que separa um habitat do outro adjacente. A criação da borda leva a diversas consequências biológicas como resultado do ressecamento e das alterações microclimáticas na região (Périco et al. 2005), como a maior penetração da luz solar, o aumento da intensidade de vento, a elevação da temperatura, a uma maior evapotranspiração e a uma diminuição da umidade relativa do solo e do ar,

uma vez que a borda sofre grande influência das atividades externas a ela. Estes efeitos favorecem as espécies que se adaptam a estas novas condições, favorecendo-as. Este é um fenômeno denominado de “Efeito de Borda” (Nardi 2010).

Segundo Felizola et al (2001) o modelo de ocupação de terras do DF tem levado à drástica redução de áreas naturais como resultado da transformação de habitats contínuos em fragmentos florestais e a grande pressão antrópica contribui para a redução da biodiversidade local e a supressão de recursos naturais. Estes fatores podem ter reflexos na mudança de hábitos dos flebotomíneos e de animais silvestres, reservatórios das leishmanioses, promovendo a adaptação destes ao novo ambiente construído aumentando o risco de infecção em seres humanos (Silva et al. 2007).

1.13 Estratégias de controle das leishmanioses

Para se efetuar o controle da LV o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral, da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde baseia-se em três medidas que são a detecção e tratamento de casos humanos, controle dos reservatórios domésticos e controle de vetores. O número de cães infectantes e a capacidade da população de flebotomíneos de transmitir infecção do cão para homem estão diretamente relacionados à incidência de infecção em humanos e são a base de sustentação da teoria de estratégias de controle e intervenção da LV (Werneck et al. 2004). Dye et al. (1993) já enfatizavam que além do número de cães infectados, a sazonalidade da variação da população de flebotomíneos deveria ser considerada nos programas de controle da LV. A tendência crescente de casos de LV observado no Brasil e a propagação de transmissão para áreas anteriormente não afetadas levantam dúvidas sobre o impacto das medidas de controle em curso (Romero & Boelaert 2010).

O controle da LTA deve abranger cinco aspectos: vigilância epidemiológica, medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas, medidas administrativas e vacina (Basano & Camargo 2004). A magnitude do problema de saúde representado pelas leishmanioses combinado com a complexidade de suas epidemiologias torna necessária a melhor compreensão de todos os ligantes da rede de transmissão da doença, o que inclui os hospedeiros mamíferos não humanos, para que se desenvolvam estratégias efetivas de controle (Roque & Jansen 2014).

1.14 Diagnóstico parasitológico e imunológico das leishmanioses

A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial ajuda na confirmação dos achados clínicos além de fornecer informações epidemiológicas relevantes relacionadas à identificação da espécie circulante para uma eficaz orientação das medidas de controle a serem adotadas (Brasil 2010).

A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, com a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, com o tempo de evolução das lesões e com as formas clínicas das diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (Brasil 2010).

Recomenda-se que o diagnóstico laboratorial das leishmanioses seja realizado a partir de três grupos de exames, parasitológicos, imunológicos e moleculares (Brasil 2010). Nos exames parasitológicos a demonstração do parasito pode ser feita de maneira direta ou indireta. A demonstração direta do parasito é o procedimento de primeira escolha, na LT, uma vez que é mais rápido, mais barato e de fácil execução. Entretanto, a probabilidade de se encontrar o parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, tornando-se rara após um ano. A sensibilidade do método pode ser diminuída com a presença de infecção secundária, e esta última deve ser tratada previamente. Os procedimentos utilizados para a pesquisa direta do parasito são a escarificação da lesão, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa. A repetição do exame pode aumentar a sensibilidade desta técnica (Brasil 2010).

O diagnóstico parasitológico para a LV pode ser feito em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. O tecido coletado é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas histopatológicas ou ainda pode ser usado para isolamento do parasito em meios de cultura (NNN – *Novy-MacNeal-Nicolle*, *RMW1-1640* ou *H0-MEM*) (Brasil 2006, Prata & Silva 2005), também utilizado para LTA, ou inoculação em animais de laboratório (Gontijo & Melo 2004). A especificidade destes métodos é de 100%, entretanto a sensibilidade pode ser variável (50 a 70% em esfregaço de medula e menos de 30% em esfregaço de linfonodo) uma vez que a distribuição dos parasitos no mesmo tecido não é homogênea (Ciamarella et al. 1997, Ferrer 1999). A técnica de aspiração do baço apresenta maior sensibilidade (98%). Contudo, as punções esplênicas e de medula óssea são procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não atendendo os estudos epidemiológicos em larga escala (Gontijo & Melo 2004). Como desvantagens para o uso dos meios de cultura estão: o longo tempo (três a cinco dias), para o início do crescimento das formas promastigotas, a necessidade de laboratórios específicos e a baixa sensibilidade (Reale et al. 1999)

As técnicas parasitológicas, embora apresentem alta especificidade e sejam consideradas “padrão-ouro” no diagnóstico das leishmanioses em humanos e cães, são pouco sensíveis quando aplicadas aos espécimes silvestres devido ao baixo número de parasitos circulantes (Bonamigo & Oliveira 2009).

Para a LT o diagnóstico pode ser feito de forma indireta, a partir da mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasito - intradermorreação de Montenegro (Basano & Camargo 2004).

Os testes imunológicos, por meio da detecção da presença de anticorpos anti-*Leishmania* ou antígenos do parasito, sinalizam a infecção já que os anticorpos estão em solução no plasma, portanto são homoganeamente distribuídos, por isso são comumente utilizados e considerados indispensáveis (Schubach 2011) evitando os métodos parasitológicos, que

são invasivos (Gontijo & Melo 2004). Por outro lado, testes sorológicos não permitem afirmar de a infecção é pregressa ou recente.

Os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina no Brasil são o RIFI e o ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais (Gontijo & Melo 2004). Um limitante da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (Gontijo & Melo 2004).

O teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina (LVC) oferece o resultado em cerca de 15 minutos. O produto dispensa estrutura laboratorial e equipamentos, facilitando o uso no campo. Possui uma tecnologia de alta sensibilidade, o que agrega precisão ao diagnóstico da LVC em sangue, soro ou plasma. Por ser um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação, desonerando, desta forma, o laboratório (Biomanguinhos/Fiocruz 2014). Assis et al. (2008) validaram o teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® (DiaMed IT-LEISH®) em beira de leito, para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) em quatro áreas endêmicas do Brasil. O desempenho do IT-LEISH® foi comparado ao da reação de imunofluorescência indireta; e ao da reação imunoenzimática, usando-se antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* e recombinante K39 (rK39). O estudo incluiu 332 pacientes com quadro clínico sugestivo de LV: 213 casos de LV confirmados parasitologicamente; e 119 não-casos, com confirmação de outra etiologia. O teste apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 97%. As técnicas RIFI (imunofluorescência indireta), ELISA *L. chagasi* e ELISA rK39 apresentaram sensibilidade de 88%, 92% e 97% e especificidades de 81%, 77% e 84%, respectivamente. Os resultados obtidos permitem recomendar o teste IT-LEISH® para diagnóstico rápido de LV com o devido acompanhamento de sua implantação nos serviços de saúde, para avaliar seu desempenho em condições de uso rotineiro. Os dados obtidos por este estudo de validação também permitem a realização de avaliações de custo-efetividade, para fortalecer a tomada de decisão sobre a implantação do método nos serviços.

1.15 Diagnóstico molecular das leishmanioses

O diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. é feito por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR), desenvolvida por Mullis (1993). O método é baseado na replicação “in vitro” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. É usado para amplificar um segmento de DNA posicionado entre duas regiões de sequência conhecida. Os oligonucleotídeos são usados como “primers” (iniciadores) para uma série de reações catalizadas pela enzima. A reação se baseia na desnaturação do DNA (separação da fita dupla). Após a desnaturação, cada oligonucleotídeo ou iniciador se liga à sequência alvo. Assim, cada iniciador hibridiza para cada uma das duas fitas separadas, de forma que a extensão terminal 3’ é diretamente direcionada à outra. Depois do anelamento, ocorre extensão do iniciador sobre a fita molde a partir da DNA polimerase. A PCR se dá em repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão do iniciador. Cada ciclo é composto de uma desnaturação de DNA (92-95°C), ligação do iniciador (40-65°C) e síntese do DNA (70-75°C). Desta forma, a partir de uma única cópia, ao final de uma sucessão de ciclos, haverá a amplificação de milhões de vezes esse segmento. Os métodos moleculares, como a PCR vêm sendo largamente utilizados nos estudos epidemiológicos a fim de incriminar animais silvestres e domésticos como hospedeiros de *Leishmania* e detectar o parasito em flebotomíneos infectados experimental ou naturalmente. A sensibilidade e especificidade deste método são as principais vantagens, independentes da localização e estágio do parasito no trato digestório do vetor (Michalsky et al. 2002).

Atualmente o método da PCR é mais utilizado para fins de pesquisa e acrescenta sensibilidade e especificidade ao diagnóstico sendo promissores como ferramentas de diagnóstico em reservatórios silvestres (Brasil 2006).

1.16 Diagnóstico molecular da infecção por tripanossomatídeos utilizando genes ribossômicos

Os tripanossomatídeos possuem um complexo padrão de moléculas maduras de RNA (Hernandez et al. 1990). Os genes de RNA ribossômico (rDNA) são compostos por unidades de repetição, que consistem em unidades de transcrição (cistrons ribossômicos), intercaladas por espaçadores intergênicos (IGS) que se repetem em tandem mais de 100 vezes no genoma. Uma única unidade de transcrição, pré-rDNA, é gerada pelo processamento destes genes e após várias etapas de processamento, o pré-rDNA dá origem a três moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior). Nos tripanossomatídeos, esta última é constituída por dois fragmentos de alto peso molecular (24S alfa e 24S Beta) e quatro subunidades de baixo peso molecular (S1, S2, S4 e S6). As subunidades SSU e LSU são compostas por sequências altamente conservadas e são intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS (ITS1 e ITS2 espaçadores internos transcritos) e ETS (espaçador externo transcrito) flanqueados pelo espaçador intergenômico (IGS) que apresenta sequências altamente variáveis (Figura 4) (Borgheason 2013). Segundo o mesmo autor, a presença de diversas regiões, que sejam ou não transcritas e que exibam diferentes graus de conservação, faz desses genes excelentes alvos para identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos. Características tais como: o pequeno tamanho que permite fácil obtenção por amplificação por PCR e a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas que permitem alinhamentos altamente confiáveis, com oito regiões altamente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) fazem que as sequências do gene SSU rDNA sejam as mais utilizadas em estudos comparativos. O autor ainda enfatiza que dezenas de sequências de SSU rDNA de diferentes espécies de flagelados da família

Trypanosomatidae estão depositadas em bancos de sequências, o que permite a rápida comparação de novas sequências com as de espécies e linhagens já conhecidas (Borgheason 2013).

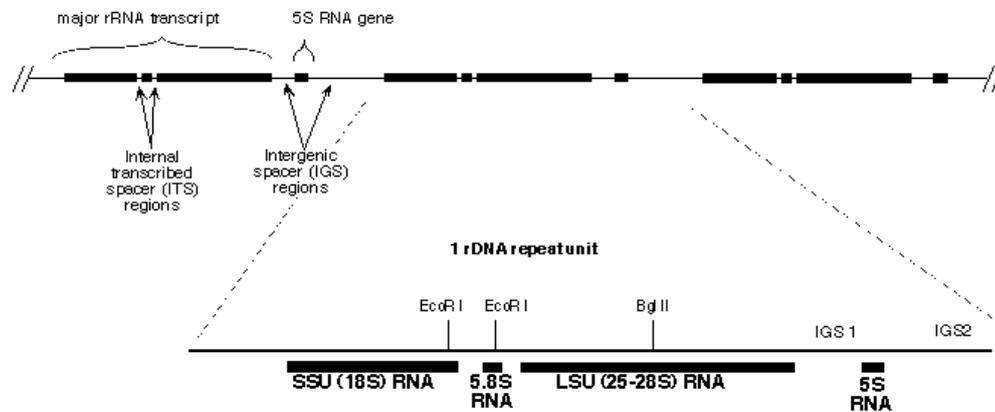


FIGURA 4 – Ilustração das subunidades SSU e LSU intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS (ITS1 e ITS2 espaçadores internos transcritos) e ETS (espaçador externo transcrito) flanqueados pelo espaçador intergenômico (IGS). Fonte: Vilgalyslab, Duke University.

2. JUSTIFICATIVA

Desde o primeiro relato de LV autóctone no DF, em 2005, novos casos humanos e caninos têm sido registrados nas mesmas regiões administrativas, bem como em novos focos. A ocorrência das leishmanioses no DF parece relacionar-se ao crescimento desordenado e acelerado das áreas urbanas, criação de bairros, condomínios e/ou estabelecimento de residências em localidades muito próximas de áreas de matas. A possibilidade de que mamíferos silvestres possam servir como fonte de infecção para flebotomíneos neste novo ambiente antropizado tem sido pouco estudada. Somado a isso, o conhecimento relacionado a transmissão enzoótica de *Leishmania* no DF ainda é escasso e a participação de mamíferos silvestres no ciclo de transmissão das leishmanioses deve ser urgentemente esclarecida em cada localidade onde estejam registrados casos de LTA ou LV em cães e/ou em seres humanos.

A compreensão da distribuição e ecologia de flebotomíneos é essencial para métodos preventivos para as leishmanioses, no entanto o conhecimento da fauna de flebotomíneos no DF ainda é incipiente. Os poucos artigos publicados geralmente são relacionados às áreas de infecção. Estudos que analisem a ocorrência e uso do habitat por flebotomíneos são escassos, dificultando a identificação das áreas de risco à transmissão das leishmanioses e a implantação das devidas medidas de controle. Logo, estudos da fauna flebotomínica e das taxas de infecção desses insetos, seja em áreas endêmicas ou de ocorrência de casos esporádicos de leishmanioses, devem ser realizados com maior frequência para que medidas direcionadas à redução do contato do homem com os vetores possam ser implementadas levando-se em conta no conhecimento comportamental dessas espécies, em diferentes períodos do ano.

De fato, todos os elos (parasito, vetor, hospedeiro/reservatório e ambiente) da cadeia epidemiológica das leishmanioses devem ser bem compreendidos assim como os fatores envolvidos na amplificação dos focos enzoóticos, que

são temporal e regionalmente específicos, para que efetivas estratégias de controle da doença possam ser determinadas.

O presente estudo aborda dois importantes elos da cadeia epidemiológica das leishmanioses no DF: os vetores e os mamíferos silvestres, que habitam as matas de galeria próximas aos centros urbanos. As áreas estudadas foram escolhidas considerando a localização geográfica Norte e Sul das mais importantes matas de galeria que sofrem da pressão antrópica no DF.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a transmissão enzoótica de *Leishmania* spp. em matas de galeria no Distrito Federal (DF).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Identificar as espécies de flebotomíneos capturadas em matas de galeria do DF.

3.2.2. Analisar a taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. em matas de galeria no DF.

3.2.3. Analisar a taxa de infecção natural de pequenos mamíferos por *Leishmania* spp. em matas de galeria no DF.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de estudo

O Distrito Federal localiza-se no Bioma Cerrado entre os paralelos 15°30' e 16°30' de latitude sul e os meridianos de 47°25' e 48°12' de longitude oeste (Ribeiro & Walter 2008), com área de aproximadamente 5.800,000 km² e população de 2.977.216 habitantes (IBGE 2016). O clima é classificado como tropical, segundo Köppen, com duas estações definidas, o período chuvoso, de outubro a abril, e o período seco, que corresponde aos meses de maio a setembro. A vegetação ocorre em gradiente de formas fisionômicas dependendo do substrato e proximidade de cursos d'água. O estudo foi realizado em matas de galeria, caracterizadas por vegetação florestal que segue acompanhando os rios de pequeno porte e os córregos das áreas estudadas. Sobre o curso d'água forma-se, então, corredores fechados – galerias. Essa fisionomia é classificada como perenifólia (caducifólia), pois, na estação seca não há queda de folhas. Normalmente, em ambas as margens da mata de galeria há faixas de vegetação não florestal onde se observa uma transição brusca com formações savânicas e campestres (Ribeiro & Walter 2008). Nas matas estudadas, a altura média do estrato arbóreo variou entre 20 e 30 metros, e a superposição das copas forneciam cobertura arbórea de 70% a 95%.

O Parque Nacional de Brasília (PNB), a mais importante Unidade de Conservação do DF, está situado na porção noroeste do DF, a cerca de 10 km do centro de Brasília (Figura 5). A área de influência do PNB compreende pouco mais de 1/3 da área territorial do DF (Plano de Manejo PNB 1997). A Fazenda Água Limpa (FAL) pertence à Universidade de Brasília e está distante 28 km da sede do Campus Universitário da Asa Norte. Possui uma área de aproximadamente 4.340 hectares (ha), destinados à preservação

(2.340 ha), à conservação, (800 ha) e à produção (1.200 ha) (Figura 5). O Jardim Botânico de Brasília (JBB) ocupa uma área de 4.518 ha, sendo 526 ha destinados à visitação (Fonseca 2001). O JBB está localizado ao sul do DF, na Região Administrativa do Lago Sul, distante cerca de 10 km do Plano Piloto (Figura 5).

A Reserva Biológica da Contagem (REBIO), administrada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA - localiza-se ao norte do DF, abrange uma área de 3.460 ha, situada próxima ao PNB. Dentro dos limites da Unidade foram identificados dois pontos de captação de água contribuindo para o abastecimento de água potável para a cidade de sobradinho e parte do Plano Piloto (Figura 5). No entorno da REBIO existem ocupações já consolidadas, embora quase sempre irregulares, ou seja, a região sofreu um processo de ocupação urbana, principalmente nos últimos 10 anos, comprometendo a cobertura vegetal da região (Arruda & Sá 2003).



FIGURA 5- Matas de Galeria amostradas em Brasília. A: Parque Nacional de Brasília. B: Fazenda água Limpa. C: Jardim Botânico de Brasília. D: Reserva Biológica da Contagem.

Em cada mata de galeria foram determinados dois transectos de 1 Km cada: PA, PB – Transectos A e B do PNB; RA, RB – Transectos A e B da REBIO; BA, BB – Transectos A e B da FAL e JA, JB – Transectos A e B do JBB (Figura 6), onde foram instaladas armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo et al. 2005) nos meses de maio e setembro de 2014. A seleção desses períodos foi baseada em estudos anteriores que indicaram uma maior ocorrência de flebotomíneos em meses secos no DF (Ferreira et al. 2014).

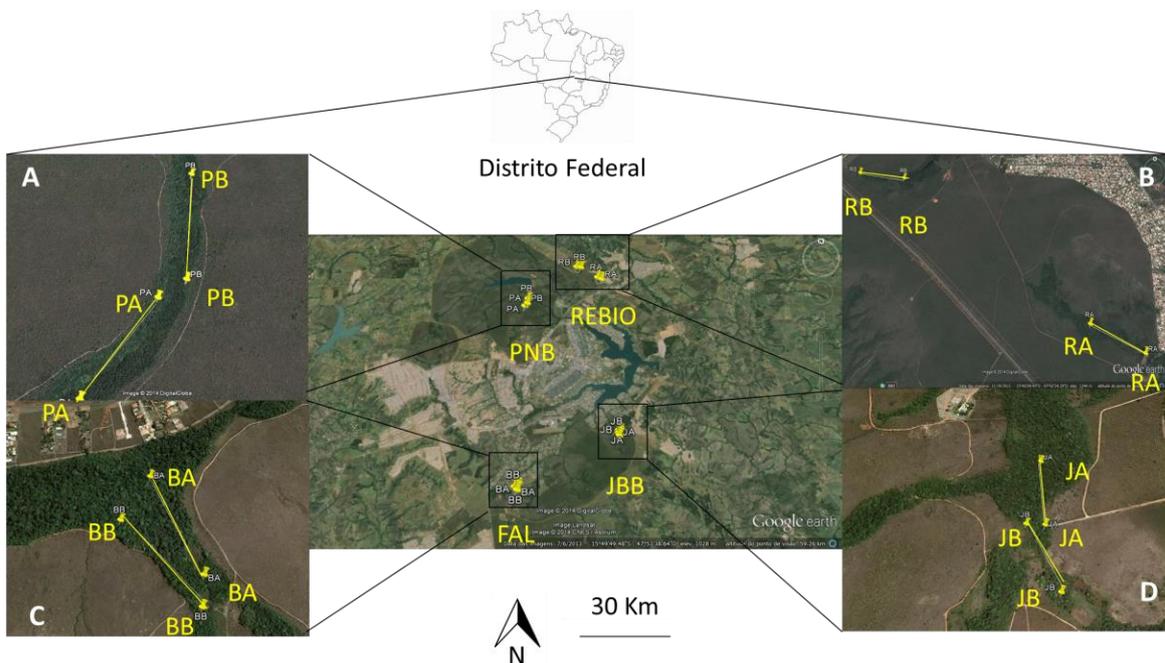


FIGURA 6. Localização geográfica das quatro áreas de estudo no Distrito Federal. A: PNB: Parque Nacional de Brasília (PA; PB); B: REBIO: Reserva Biológica da Contagem (RA; RB); C: FAL: Fazenda água Limpa da UNB (BA; BB); D: JBB: Jardim Botânico de Brasília (JA; JB). Fonte: Google Earth 2014.

4.2 Amostragem de flebotomíneos

Os flebotomíneos foram capturados usando armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo et al. 2005) (Figura 7), alimentadas com pilhas alcalinas de 1,5 volts e armadilhas de Shannon (Shannon, 1939) com isca luminosa (Figura 7). As armadilhas HPs foram instaladas a uma altura de aproximadamente 1,5 m e ficaram expostas por 12 horas a partir do crepúsculo e as capturas na Shannon tiveram duração de quatro horas (18:00 - 22:00h) como preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Em cada mata de galeria amostrada no DF foram instaladas 40 HPs em transectos lineares de aproximadamente 1.000 metros (espaçamento de 50 metros entre as HPs) durante quatro noites consecutivas e oito armadilhas do tipo Shannon em maio e outras oito em setembro. O esforço de captura total dos meses de maio e setembro foi de 1.280 armadilhas HP (160 por área em cada período) e 16 armadilhas do tipo Shannon (4h) em todo o período.



FIGURA 7 - Armadilhas utilizadas nas amostragens de flebotomíneos. A: armadilha do tipo HP. B: Armadilha do tipo Shannon.

4.3 Montagem, dissecação e identificação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos capturados foram montados em Bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula, para identificação específica segundo Galati (2015). Para montagem das lâminas de fêmeas foi separada a cabeça e a porção final do abdomen (quatro últimos segmentos) que passaram por uma bateria de clarificação: 24 horas em KOH, depois lavados com ácido acético 10% e em seguida mais dez minutos em ácido acético 100%, dez minutos em álcool 70%, dez minutos em álcool 80%, dez minutos em álcool 90%, dez minutos em álcool absoluto e 24 horas em eugenol. A cabeça e a porção final do abdomen foram montadas em lâminas e o restante do corpo (tórax, parte do abdome, asas e pernas) foi utilizado na extração de DNA para a realização das PCRs (ver detalhes no capítulo 2).

4.4 Captura dos pequenos mamíferos

Os pequenos mamíferos silvestres foram capturados, nas mesmas trilhas de captura dos flebotomíneos e no mesmo período, em armadilhas de contenção viva “live trap”, modelo Tomahawk e/ou Sherman (Figura 8), de tamanho e resistências proporcionais às espécies-alvo. As armadilhas foram alternadamente distribuídas no mesmo transecto das armadilhas dos flebotomíneos, nas áreas selecionadas. As armadilhas foram espaçadas em torno de 10 metros uma da outra, ao nível do solo, e a uma altura de um a dois metros, quando o habitat apresentava uma estratificação vertical, para que o estrato arbóreo também fosse amostrado em locais propícios à presença de pequenos mamíferos arborícolas e escansoriais, como rede de cipós e galhos das árvores (Figura 8).



FIGURA 8 - Armadilhas utilizadas para amostragens de mamíferos. A: Armadilha tipo Tomahawk localizada no solo. B. Armadilha tipo Tomahawk com pequeno mamífero capturado. C. Armadilha tipo Sherman localizada em estrato arbóreo.

As armadilhas permaneceram abertas por quatro noites seguidas. Para o monitoramento dos pequenos mamíferos foi utilizada a metodologia de captura-marcação-recaptura (Figura 9) (Krebs 1999). Este método permite uma caracterização da estrutura da comunidade de pequenos mamíferos, a partir da determinação da riqueza e diversidade de espécies.



FIGURA 9- Roedor marcado por um brinco de identificação (observar a ponta da pinça).

As armadilhas foram instaladas em locais abrigados, protegendo os animais contra as intempéries. Foram armadas e iscadas no final da tarde e vistoriadas logo ao amanhecer. Foi utilizada como isca uma mistura de pedaços de sardinha, farinha de milho, milho em conserva, pasta de amendoim e banana amassada.

4.5 Contenção e marcação dos pequenos mamíferos

Após a captura, os animais foram levados até uma base montada pela equipe (Figura 10), onde se procedeu a pesagem, anestesia para coleta de material biológico (biópsia de orelha) e foram retornados à natureza no mesmo dia da captura. Os mamíferos silvestres ficaram alojados nas próprias armadilhas por um curto tempo, suficiente para manipulação e retorno da anestesia. Durante esse período, eles tiveram disponível a própria isca como alimento.



FIGURA 10 – Base de trabalho de campo.

Os pequenos mamíferos foram contidos com o auxílio de equipamentos de proteção individual e de contenção, como luvas de raspa de couro e sacos de pano ou de plástico grosso, para retirada do animal da armadilha e pesagem.

O protocolo anestésico utilizou a associação de Tiletamina/Zolazepan – Zoletil 50[®], na dosagem de 20 a 40 mg/Kg, de acordo com a espécie do animal, via intramuscular, ou utilizando 80 mg/kg de cloridrato de quetamina e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina IM com auxílio de seringas e agulhas com dimensões proporcionais à espécie manejada.

Outros parâmetros aferidos e/ou medidos durante o período de sedação dos animais foram: sexo, medidas corporais (comprimento cabeça-corpo, comprimento da cauda, tamanho da orelha direita e comprimento da pata posterior direita, frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura foram aferidos conforme a apresentação do estado geral do animal (Figura 11). Logo em seguida, realizou-se a coleta de amostras

biológicas. As medidas corporais foram usadas em comparação à chave de identificação para roedores do Brasil de Bonvicino et al. (2008).



FIGURA 11 – Procedimentos de pesagem (A) e exame clínico geral em roedor e marsupial (B).

4.6 Coleta de material biológico

Dos animais silvestres, foi-se coletado fragmentos de pele (ponta de orelha) (Figura 12). Os fragmentos de orelha foram colocados em isopores, dentro de tubos eppendorf secos, em temperatura ambiente e identificados.



FIGURA 12 – Roedor após coleta de tecido. A seta aponta o local da coleta da ponta de orelha.

O material foi transportado no mesmo dia para o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As amostras coletadas no mês de maio, foram mantidas em freezer a temperatura de -20° durante quatro meses e juntamente com as amostras coletadas em setembro foram transferidas para freezer a temperatura de -80° por dois meses, até o processamento das amostras (ver detalhes no capítulo 3). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnBDOCn^o21793/2014) (Anexo 2). As capturas dos pequenos mamíferos nas áreas foram realizadas mediante autorização n^o 36808-6, emitida pelo Instituto Chico Medes de Biodiversidade (ICMBio) (Anexo 1) e também de autorizações das Unidades de Conservação amostradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS VIDE TÓPICO 8

6 Considerações Finais

A taxa de infecção por *Leishmania* encontrada nos mamíferos e o fato de não ter sido detectada nos flebotomíneos capturados durante o presente estudo poderiam estar relacionados ao estado de preservação das matas de galeria amostradas. Ainda que exista algum grau de degradação ambiental em função da presença humana e da conseqüente urbanização ao redor destes ecossistemas estudados, segundo (Kessing & Ostfeld 2006), comunidades mais diversas podem diminuir o risco de epizootias e epidemias ao impedir a dominância de espécies consideradas vetoras ou reservatórias de determinadas doenças.

De fato, a diversidade de espécies de flebotomíneos, incluindo novos registros para o DF e Brasil, e de mamíferos nas áreas amostradas demonstram que a fragmentação dos ambientes parece não ser suficiente para gerar um efeito de borda, onde observa-se pobreza de diversidade de espécies, generalismo e antropofilia dos vetores ou reservatórios competentes que, adaptados, se beneficiam da nova condição da fragmentação, levando à um maior risco de infecção para o homem (Nardi 2010). Entretanto, considerando-se o tempo que o ser humano habita o planeta, a urbanização é um fenômeno muito recente e a compreensão dos seus efeitos permanece um grande desafio para a saúde pública. Esta perspectiva torna-se ainda mais dramática quando se considera a urbanização em países tropicais pouco desenvolvidos (Lau et al. 2010).

A importância epidemiológica das leishmanioses nas grandes cidades brasileiras ilustra este desafio: apesar de vários estudos de diversos aspectos da doença e da implementação de medidas de controle, as infecções humana e canina ainda permanecem um sério problema (MS 2006). Além disso, uma avaliação dos impactos das medidas de controle nos cenários epidemiológicos onde a doença ocorre permanece problemática, pois um grande número de fatores pode influenciar a qualidade das medidas de

controle, mas não há procedimento padronizado para avaliar-se a qualidade das ações implementadas (MS 2006).

Nas matas de galeria do presente estudo encontrou-se elevado número de espécimes de *Bi. flaviscutellata*, principalmente na REBIO e PNB, ao norte do DF. O predomínio de *Bi. flaviscutellata* era esperado, a julgar pela frequência que tem ocorrido em áreas florestais, como também puderam observar Carvalho et al. (2010) quando compararam suas capturas de flebotomíneos em domicílio, peridomicílio e matas de galeria. Devido à presença de pequenos mamíferos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* nestas áreas (Cardoso et al. 2015), esta espécie pode ser a responsável pela circulação enzoótica deste parasito; o qual é o agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa. O mesmo aplica-se para *Ny. whitmani*, espécie capturada na REBIO, PNB e JBB, a qual é considerada transmissora da *Leishmania braziliensis* no Brasil, devido à sua presença tanto em matas de galeria, peri-domicílio e domicílio (Carvalho et al. 2010). Os resultados dos testes moleculares para infecção por *Leishmania* nos mamíferos do presente estudo, corroboram com os dados de Cardoso et al. (2015), devendo-se proceder o sequenciamento das amostras positivas para ITS para uma melhor compreensão das espécies de *Leishmania* poderiam estar envolvidas no ciclo enzoótico da doença, nessas localidades.

Modelos estatísticos complexos já utilizados para a descrição das leishmanioses (Araújo et al. 2013) estão além dos objetivos do presente estudo. Este estudo foi desenvolvido com uma metodologia que pode ser reproduzida no campo dos serviços de saúde dos municípios brasileiros e demonstra a importância de um monitoramento sistemático de flebotomíneos e de animais silvestres para a avaliação das medidas de controle das leishmanioses, principalmente o controle químico dos vetores (Saraiva et al. 2017) e identificação das espécies silvestres focalmente envolvidas no ciclo biológico do parasito.

Estudos retrospectivos dos aspectos ecológicos das áreas e o efeito da fragmentação de habitat ao longo do desenvolvimento urbano do DF, assim como a comparação da diversidade de espécies de flebotomíneos e

mamíferos no curso desses anos e dos dados de incidência de leishmanioses em animais silvestres, cães e seres humanos deveriam ser estimulados para se julgar a verdadeira influência da pressão antrópica no ciclo enzoótico de *Leishmania* do Distrito Federal.

7 Conclusões

1. *Bichromomyia flaviscutellata*, importante vetor de *L. amazonensis*, foi a espécie de flebotomíneo mais capturada nas matas de galeria do DF. *Lutzomyia longipalpis*, vetor de *L. infantum*, não foi detectada nessas matas. *Brumptomyia guimaraesi*, *Br. brumpti*, *Micropygomyia ferreirana*, *Evandromya bourrouli* e *Psathyromyia pradobarrientosi* foram registradas pela primeira vez no DF, elevando para 35 o número de espécies registradas nessa unidade da federação, revelando que a fauna flebotomínica do DF é rica e que as matas de galeria contribuem para manutenção das populações de flebotomíneos.
2. Nenhum “pool” de flebotomíneos foi positivo para *Leishmania* spp. por meio dos testes moleculares utilizados. Esse resultado não implica na inexistência de vetores infectados nestas matas de galeria, considerando que geralmente a taxa de infecção é baixa nesses insetos e que há circulação de *Leishmania* nos pequenos mamíferos capturados nas mesmas áreas e períodos.
3. Os mamíferos silvestres *Rhipidomys macrurus* e *Gracilinanus agilis* são reservatórios potenciais de espécies de *Leishmania* em matas de galeria na Fazenda Água Limpa da UnB e Jardim Botânico de Brasília, locais onde ainda não havia sido detectada infecção em roedores e marsupiais. Na Reserva Biológica da Contagem a detecção de *Leishmania* em *Didelphis albiventris* e *R. macrurus* indica que a transmissão enzoótica não é um evento pontual nessas matas considerando que infecção em pequenos mamíferos (*R. macrurus* e *G. agilis*) por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* já tinha sido registrada há três anos em outro trabalho. A não detecção de flebotomíneos e mamíferos silvestres infectados por espécies de *Leishmania* no PNB, no presente estudo, não significa ausência do ciclo enzoótico na área. Dessa forma, as matas de galeria do DF abrigam hospedeiros e potenciais vetores de espécies de *Leishmania* e têm papel importante para manutenção da transmissão enzoótica desses tripanossomatídeos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD. 2010. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: The first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105(6):796–9.

Aguiar GM & Medeiros WM. 2003. Distribuição e Hábitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, p. 297-255. In: Rangel, EF & Lainson R. (org.), Flebotomíneos do Brasil. 20ª ed. Rio de Janeiro, Fiocruz, 368p.

Aguiar GM, Azevedo ACR, Medeiros WM, Alves JRC, Rendeiro V. 2014. Aspects of the ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, Cost of Rio de Janeiro State, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical. Sao Paulo, 56(2):143-149. Doi: <https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000200010>

Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi G, Vargas Z. 1989. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 84(1): 19-28.

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P & Sereno D. 2016. An overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(3): e0004349

Alho CJR. 2003. Conservação da biodiversidade da Bacia do Alto Paraguai: Monitoramento da fauna sob impacto ambiental. MS, Ed.UNIDERP, Campo Grande.

Almeida PS, Andrade AJ, Sciamarelli A, Raizer J, Menegatti JA, Hermes S, Carvalho MSL, Gurgel-Gonçalves R. 2015. Geographic distribution of

phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Central-West Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online). 110(4), 551-559. Doi: <https://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140462>

Altamirano E, Alfredo J. et al. 2003. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. História, Ciências, Saúde. Manguinhos, 10(2): 853-82.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 7(5): e35671. doi: <http://.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

Amaral PST & Henriques RPB. 2005. Estudo das populações e comunidades de pequenos mamíferos em fragmentos de cerrado no Brasil Central. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, D.F. Departamento de Ecologia. 52p.

Antunes PCA & Coutinho JO. 1939. Notas sôbre Flebotomos Sul-Americanos. II. Descrição de *Flebotomus whitmani* n.sp. e da armadura bucal de algumas espécies. Boletim Biológico (N.S.), 4(3): 448-453.

ANVISA - Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Brasília- DF

Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Applied and Environmental Microbiology. 2000; 66(5):1933-8.

Araújo VEM, Pinheiro LC, Almeida MCDM, de Menezes FC, Moraes MHF, Reis IA, et al. 2013. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(11): e2540.

Araujo-Pereira T, Fuzari AA, Andrade 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 and Vectors*. 7(360): 2-5. Doi: <http://.doi.org/10.1186/1756-3305-7-360>

Arruda BM & Sá NSFL. *Corredores ecológicos: uma abordagem integradora de ecossistemas no Brasil - Brasília*. 2003; Ibama 220 p.

Artoli CG. 2011. *Uso de Biomantas na revegetação de um fragmento de mata de galeria no Jardim Botânico, Brasília, DF: sobrevivência e desenvolvimento de mudas*. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. 2011; Publicação: PPG/EFL/DM – 168/2011, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, DF, 51p.

Ashford RW. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*. 4(5): 523-532 doi: 10.1016/0738-081X (96)00041-7

Barbosa MD, FéNF, Marcião AH, Silva AP, Monteiro WM, Guerra JA. 2008. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a focus of American cutaneous leishmaniasis on the urban periphery of Manaus, State of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(5): 485- 91

Barretto MP & Coutinho JO. 1941. Contribuição ao conhecimento dos flebótomos de São Paulo. VI. Descrição de duas novas espécies (Diptera, Psychodidae). *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia*, 1(24): 223-236.

Barretto MP, Martins AV, Pellegrino J. 1956. Notas sobre flebotomíneos do Nordeste do Estado de Minas Gerais, com descrições de duas espécies novas (Diptera: Psychodidae). *Folia Clínica e Biológica*, 26:47-56.

Barretto, MP. 1946. Uma nova espécie de flebótomo do Estado de Goiás, Brasil, e chave para determinação das espécies afins (Diptera, Psychodidae). *Revista brasileira de biologia*, (Rio de Janeiro), 6(3): 427-434.

Basano SA & Camargo LMA. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3), 328-337. Doi: <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300010>

Becker RG. et al. 2007. Estrutura de comunidades de pequenos mamíferos e diversidade de *Necomys lasiurus* (Rodentia ,Sigmodontinae) em áreas abertas de Cerrado no Brasil central. *Mastozoologia Neotropical*, 14(2):157-168.

Biomanguinhos/ Fiocruz. 2014. On line. Acesso em 15 de agosto de 2017. <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>

Bonamigo RA, Oliveira G. 2008. Diagnóstico parasitológico de *Leishmania* sp. em animais silvestres. Iniciação Científica CNPq – PIBIC. 2008/09. Disponível em <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=425>:

Bonvicino CR, Lindbergh SM & Maroja LS. 2002. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz. J. Biol.*, 62(4B): 765-774.

Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS. 2008. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS. 120 p.

Bonvicino CR, Reitas F, Sr & D'Andrea PS. 1997. Influence of bordering vegetation, width and state of conservation of a gallery forest on the presence of small mammals. *In*: L. L. Leila & C. H. Saito (eds.), *Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado*. Editora UnB, Brasília.

Borgheason TC. 2013. Diversidade e filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros. Tese (Doutorado Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishilawa EA, Cupolilo E, Floeter-Winter L, et al. 2003. Wild and synanthropic hosts os *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97: 291-6.

Brandão-Filho SP, de carvalho FG, Debrito MEF, Almeida FD, Nascimento LA. 1994. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil -eco-epidemiologic aspects in zona da mata region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 89(3):445- 9.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª. Edição. Brasília-DF: editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.(Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2.ed. atual. –Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brazil RP & Brazil BG. 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In, Rangel, E. F. & Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, pág. 257-274.

Brazil RP, Nascimento MDSB, Macau RP. 1987. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 82: 145.

Brazil RP. 2013. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(3): 263-264. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0101-2013>

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Da Silva AVM, et al. 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 45(2): 79- 83

Cardoso RM, Nitz ZN, Romero GS, Minuzzi-Souza TTC, Dietrich AG, Mendes JD, Reis ML, Ferreira JBC, Hecht MM, Gurgel-Gonçalves R. 2015. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. Parasites & Vectors, 8: 171. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0780-y>

Carranza – Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, Bofill MIR, Rodrigues RMB, da Silva AD, Cortez SMF, Romero GAS. 2010. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(4):396-399. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000400012>

Carranza – Tamayo CO, Werneck GL e Romero GAS. 2016. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? *Braz J Infect Dis* [online]. 20(2):119-126. [cited 2017-07-16].

Carreira JCA, da Silva AVM, Pereira DD, Brazil RP 2012. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites Vectors*, 5:111.

Carrera M. Insetos de interesse médico e veterinário. Ed. UFPR, Curitiba, Brasil. 1991. 228p.

Carvalho AH. 2009. Caracterização citogenética de espécies de *Rhipidomys* (Cricetidae, Rodentia) de Minas Gerais. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral. 56 f.

Carvalho GML, Filho JDA, Falcão AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF. 2008. Naturally infected lutzomyia sand flies in a leishmania-endemic area of Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, 8(3):407–14.

Carvalho LSM, Bredt A, Meneguim SRE, Oliveira C. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiologia e Serviço de Saúde de Brasília* 19(3): 227-237. ISSN 1679-4974. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742010000300005>.

Carvalho LSM, Bredt A, Meneguim SRE, Oliveira C. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiologia e Serviço de Saúde de Brasília*, 19(3): 227-237. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742010000300005>

Carvalho LSM, Lusíosa ES, Naves HAM. 1989. Contribuição ao conhecimento da fauna flebotomínica do Estado de Goiás e Distrito Federal. II 1986-1987. Revista de Patologia Tropical, 18(1): 7-14. Doi: <https://doi.org/10.5216/rpt.v18i1.20212>

Castilho TM, Shaw JJ, Lucile M, Floeter-Winter LM. 2003. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol, 2003; 41(2):540–6.

Castro EA, et al. 2002. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos da leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 35(5): 44-251.

Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E. 2007. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). Experimental Parasitology, 117:13–21.

Cavalcanti FR. 2012. Duração dos dias em Brasília por meses. <http://doc.brazilia.jor.br/clima-de-Brasilia/luz-solar-Julho-a-Setembro.shtml>

Cavalier-Smith T. 2016. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. European Journal of Protistology, 56:250–276

Cerqueira R. 2005. Fatores ambientais e a reprodução de marsupiais e roedores no leste do Brasil. Arquivos do Museu Nacional, 63, 29-39.

Churg J, Bernstein J, Glassock RJ. Renal disease: classification and atlas of glomerular disease. 2ª. Ed. New York: Igaku-Shoin, 1985, 541p.

Ciamarella P, Oliva G, De Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Saclone A, Persechino A. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Veterinary Record, v.141, p.539-543 1997.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla M, Paláu MT. 1989. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania*

donovani chagasi in Colômbia, South America. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 83:195.

Costa Lima A & Antunes PCA. 1936. Sobre um novo phlebótomo encontrado no Norte do Brasil: Brazil Médico, 50: 419-422.

Costa Lima A. 1932. Sobre os phlebótomos americanos (Diptera, Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, (Rio de Janeiro), 26(1): 15-69.

Costa MLJ. 2005. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. Gazeta Médica da Bahia, 75(1): 3-17.

Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* I. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102(2): 149-153. Doi: <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000016>

Coutinho JO & Barretto MP. 1941. Contribuição ao conhecimento dos flebótomos de São Paulo. VII. Descrição de *Phlebotomus guimaraesi*, n.sp. e das fêmeas de *Phlebotomus pestanai* Barretto e Coutinho, 1941 e de *Phlebotomus lanei* Barretto e Coutinho, 1941 (Diptera, Psychodidae). Revista de biologia e higiene, 11(11): 74-88.

Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. 2002. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. Trans R Soc Trop Med Hyg, 96(Suppl. 1): 185-9.

Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, et al. 2013. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. Experimental parasitology, 134(3):281-9.

Cutolo AA, Galati BAE, Von Zuben JC, 2013. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from forest areas in Botucatu municipality, central western São Paulo State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 19:15. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-19-15>

Cutolo AA, Galati BAE, VonZuben JC. 2013. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from forest areas in Botucatu municipality, central western São Paulo State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19:15. Doi: <https://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-19-15>

Damasceno RG & Causey OR. 1945. Estudo sôbre Flebotomus no Vale Amazônico. Parte III. Descrição de *F.servulolimai* e *F.wilsoni* (Diptera, Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, (Rio de Janeiro), 42(3): 635-644.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48 (3): 151-156.

de Assis TS. 2008. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviço da Saude*, 17(2):107-116. on-line em, <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/ess/v17n2/v17n2a04.pdf> 01 Set 2017.

de Bruijn MHL, Barker DC. 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*, 52(1):45–58.

de Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, Pereira T de A, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho SP. 2010. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop*, 116(1):108–10.

de Souza MB, de Marzochi MCA, de Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes C dos S, Caetano JM, et al. 2003. Absence of *Lutzomyia longipalpis* in some

endemic visceral leishmaniasis areas in Rio de Janeiro municipality. *Cad Saude Publica*, 19(6):1881–5.

Dedet JP, Pajot FX, Desjeux P, Goyot P, Chippaux JP, Geoffroy B. 1985. Natural hosts of *Leishmania-mexicana-amazonensis* Lainson and Shaw, 1972 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in French-Guyana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(3): 302-5.

Dedet JP, Pratlong F, Lanotte G, Ravel C. 1999. The Parasite. In: *Clinics in Dermatology. Cutaneous leishmaniasis - A review*. Oumeish Yourself. Oumeish Editor, Glasgow, Elsevier, 17: 261-268.

Diniz MM, Ovallos FG, de Castro Gomes CM, de Oliveira Lavitschka C, Galati EA. 2014. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasites Vectors*, 31(7):139.

do Nascimento JC, de Paiva BR, Malafronte R dos S, Fernandes WD, Galati EAB. 2007. Natural infection of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 49(2):119–22.

Dorval MEC, Alves TP, Cristaldo G, Rocha HC, Alves MA, Oshiro ET, Oliveira AG, Brazil RP, Galati EAB & Cunha RV. 2010. Sand fly captures with Disney traps in area of occurrence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the State of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43: 491–495. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000500003>

Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Alves TP, Alves MA, Oshiro ET, et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:695-702. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000500005>

Dyar HG. 1929. The present knowledge of the American species of *Phlebotomus rondani* (Diptera, Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10(1): 112-124.

Dye C, Davies CR, Lainson R. 1991. Communication among phlebotomine sand flies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. *Animal Behavior*, 42: 183-192. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80549-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80549-4)

Dye C, Vidor E, Deane MP. 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiology and Infection*, 110: 647-657.

Eckert J, Souza GD. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Estrela e primeiro registro de *Lutzomyia pascalei* (Coutinho & Barretto) no Rio Grande do Sul. *Revista brasileira de Biociências*. Porto Alegre, 8(4): 399-402. on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1555>, 19 Jun 2017.

Ehrlich PR. 1988. A perda da diversidade – causas e consequências. In: *Biodiversidade*. Wilson EO, Peter FM. Editora Nova Fronteira S.A. p. 27-45.

Eiten G. 1984. Vegetation of Brasilia. *Phytocoenologia*, 12 (2/3): 271-292. DOI:10.1127/phyto/12/1984/271

Eiten G. 1984. Vegetation of Brasilia. *Phytocoenologia*, 12 (2/3): 271-292. DOI:10.1127/phyto/12/1984/271

Feliciangeli MD, Rodriguez N, de Guglielmo Z, Rodriguez A. 1998. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela: present situation of human and canine infections. *Parasite*, 5(4):317–23.

Felizola ER, Lago FPL, Galvão WS. 2001. Avaliação da Dinâmica da Paisagem no Distrito Federal. Projeto da Reserva da Biosfera do Cerrado - Fase I. In: *Anais 10 Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (SBSR)*; Foz do Iguaçu, Brasil. Foz do Iguaçu, 2001.

Ferreira JBC, Macedo MA, Rocha DA, Ferreira TS, Obara MT, Gurgel-Gonçalves R. 2014. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em matas de galeria no Distrito Federal, Brasil. *EntomoBrasilis*. 2014. 7(3) doi: <http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v7i3.398>

Ferreira ST, Minuzzi-Souza CTT, Andrade JA, Coelho OT, Rocha AD, Obara TM, Hecht M, Nitz N, Gurgel-Gonçalves R. 2015. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(6):776-779, Nov-Dec, 2015.

Ferrer LM. 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis an update. Proceedings of canine leishmaniasis Forum.* Barcelona, 1999.p. 6-10.

Figueiredo FB, Gremião ID, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, et al. 2008. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102:200-201.

Fleming TH. 1972. The reproductive cycles of three species of opossums and other mammals in the Panama Canal Zone. *Journal of Mammalogy*. 54(2):439-455.

Floch H & Abonnenc E. 1941. Phlébotomes de la Guyane Française (II). *Inst. Pasteur Guyane Territ. L'Inini*. 28: 1-16.

Floch H & Abonnenc E. 1944. Phlébotomes de la Guyane française. VII. Description de six espèces nouvelles. 20 pp. Institut Pasteur de la Guyane et du Territoire de l'Inini, Cayenne.

Fonseca FO (org.). 2001. Olhares sobre o Lago Paranoá. Brasília, Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. 425p.

Fonseca GAB. 1989. Small mammal species diversity in Brazilian tropical primary and secondary forest of different sizes. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6, 381- 422.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. 1973. Natural infection of *Oryzomys capito laticeps* in enzootic focus of cutaneous leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 7(2):181- 4.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA.1972. Natural infection of sylvatic mammals of cutaneous leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 6(3):255-61.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A & Roura X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 137(3-4), 214–21.

Freitas TPT, D'Andrea PS, Paula DAJ, Nakazato L, Dutra V, Bonvicino CR, Almeida BPF, Boa-Sorte EC, Sousa VRF. 2012. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1): 81-83. Doi:10.1089/vbz.2010.0268.

Freitas-Lidani KC, de Messias-Reason IJ, Ishikawa EAY. 2014. A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(4):442–7.

Fukutani KF, Figueiredo V, Celes FS, Cristal JR, Barral A, Barral-Netto MO. 2014. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 4(1): 422. Doi: 10.1186/1471-2334-14-422

Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo GE, Marcos A, Rocha HC, Garcia WB. 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 30(2): 115-128. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101996000200002>.

Galati EAB. 2015. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae *Vol. I*.

Galvão ALA & Coutinho JO. 1939. Contribuição ao estudo dos Flebotomus do Estado de São Paulo. *Flebotomus sallesi*, n.sp. (Diptera, Psychodidae): *Anais da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo*, 15: 125-139.

Garcia FN, Ferreira LG, Leite JF. 2011. Áreas Protegidas no Bioma Cerrado: fragmentos vegetacionais sob forte pressão. In: XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2011, Curitiba - PR. Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR. São José dos Campos: INPE, 2011. p. 4086-4093.

Gentile B, Lepont F, Pajot FX, Besnard R. 1981. Dermal leishmaniasis in French Guiana -the sloth (*Choloepus didactylus*) as a reservoir host. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 75(4):612-3

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC & Alves LC. 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. Veterinary Journal (London, England : 1997), 175(1), 45–52.

Gontijo B & Carvalho MLR. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36(2): 71-80.

Gontijo CMF; Melo MN. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas / Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. Rev. bras. epidemiol; 7(3):338-349.

Gueler-Costa C. 2006. Distribuição e abundância de pequenos mamíferos em relação à paisagem da Bacia do Rio Passa-Cinco, São Paulo, Brasil. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quiroz. 90p. CDD639.9

Helhazar M, Leitão J, Duarte A, Tavares L, Fonseca IP. 2013. Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal. Parasites & Vectors, 6:88. Doi:10.1186/1756-3305-6-88

Herenio EM, Fortes RC, Rincon G.2014. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. Journal Health Sciency Institute, 32(2):126-9

Hernandez R, Rios P, Valdes AM, Pinero D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA coding regions: comparison with other Tripanosomatids. Mol Biochem Parasitol, 57 (3): 626-9.

Humberg RM, Oshiro ET, Cruz Mdo S, Ribolla PE, Alonso DP, Ferreira AM, et al. 2012. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 87(3):470-2

IBGE2015

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/estimativa_tcu.shtm

Jones TC, Hunt RD, King NW. Patologia Veterinária. 6ª edição, São Paulo: Manole, 2003, 1415p.

Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. 1993. Pathology of Domestic Animals. 4ª edição, Volume 3. 653p.

Karagiannis-Voules DA, Scholte RG, Guimaraes LH, Utzinger J, Vounatsou P. 2013. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. PLoS Neglected Tropical Diseases, 3; 7(5):e2213.

Kárita Cláudia Freitas Lidani, Fabiana A. Andrade, Maria R.P.A. Tizzot, Magda C.V. Costa-Ribeiro, Marcia H. Beltrame and Lara J. Messias-Reason. 2017. Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of *Leishmania* in *Lutzomyia longipalpis* in Latin America. Chapter from the book The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/the-epidemiology-andecology-of-leishmaniasis> <http://dx.doi.org/10.5772/65787>

Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in Dermatology, 17(3): 279-89.

Klink CA and Machado RB. 2005. Conservation of Brazilian Cerrado
Conservation Biology; 19:707-713. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00702>

Krebs CJ. Ecological Methodology, 2nd ed., Addison-Welsey Educational Publishers, Inc., Menlo Park, CA. 1999; 620 p.

Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. 1969. Leishmaniasis in Brazil. Fox, *Cerdocyon thous*(l) as a reservoir of *Leishmania-donovani* in Para-state, Brazil. 1969. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 63(6):741

Lainson R, Shaw JJ, Povia M. 1981. The importance of edentates (sloths and anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of “pianbois” in north Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 75: 611–612. Doi: 10.1016/0035-9203(81)90222-4

Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Povia M. 1981. Leishmaniasis in Brazil. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north para state, with particular reference to *L. braziliensis-guyanensis* causative agent of pian-bois. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 75(4):530-8

Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD.1979. Leishmaniasis in Brazil. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north para state. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 73(2):239-42

Lainson R, Shaw JJ. 1968. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* Mangabeira as the vector in the lower Amazonian basin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 62 (3): 385-395.

Lainson R, Shaw JJ. 1970. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and

observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 64 (5): 654-667.

Lainson R, Shaw JJ. 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. British Medical Bulletin, 28: 44-48.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT & Braga RR. 1987. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81: 517.

Larrousse, F. 1920. Nouvelle espèce américaine du genre Phlebotomus, *Phlebotomus brumpti*, sp.nov: Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 12: 659-662.

Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. 2010. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? Trans R Soc Trop Med Hy, 104(10): 631-8.

Laurenti MD. Patologia e patogenia das leishmanioses. 84 f. Tese (Livro-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Le Pon, F, Matias A, Mariñez E, Dujardin JP. 2004. Phlébotomes de Bolivie: description de quatre nouvelles espèces de *Lutzomyia* (Diptera, Psychodidae). Bulletin de la Société entomologique de France, 109 (2): 145-154. ISSN0037-928XCODENBSEFA4.

Le Pont F, Martinez EM, Torres M, Dujardin JP. 1998. Description de 5 nouvelles espèces de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) de Région Subandine. Bull Soc Entomol France, 103: 159-173.

Le Pont F, Matias A, Mariñez E, Dujardin JP. 2004. Phlébotomes de Bolivie: description de quatre nouvelles espèces de *Lutzomyia* (Diptera, Psychodidae). Bulletin de la Société entomologique de France, 109 (2): 145-154. ISSN: 0037-928XCODEN: BSEFA4

Lourenço, João Lucas Magner. Ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) no Distrito Federal, Brasil. 2016. 82 f., il. Dissertação (Mestrado em Zoologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Lutz A & Neiva A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, (Rio de Janeiro), 4(1): 84-95.

Luz B, Castro EA, Dereure J, Pralong F, Medice E, Brousseau RA. 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Phlebotomidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. Ann Trop Med Parasitol, 94(6):623–31.

Luz KG, Da Silva VO, Gomes EM, Machado FC, Araújo MA, Fonseca HE, Freire TC, D'Almeida JB, Palatnik M, Palatinik-de-Souza CB. 1997. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiples transfused hemodialysis patients. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 57:168-171

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MCA 2006. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 100 (5): 442-445.

Madeira MF, Uchoa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM Serra CMB. 2003. *Leishmania (viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36: 551-555.

Maia C & Campino L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Veterinary Parasitology, 158(4), 274–87.

Mangabeira FO. 1942. Descrição dos machos de 24 novas espécies: 7ª Contribuição ao estudo dos flebotomos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 37:259-387.

Mangabeira, O. 1938. Sobre duas novas espécies de *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 33:349-356.

Mares MA & Ernest KA. 1995. Population and community ecology of small mammals in a gallery forest of central Brazil. *Journal of Mammalogy*, 76(3):750-768.

Martinez-Moreno A, Moreno T, Martinez-Moreno FJ, Acosta I, Hernandez S. 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48: 209-220.

Martins AV, Falcão AL & Silva JE. 1962. Nota sobre os flebotomos do Estado de Goiás, com a descrição de duas espécies novas e da fêmea de *Lutzomyia longipennis* (Barretto, 1946) e a redescricao do macho da *L.evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936) (Diptera, Psychodidae). *Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais*, (Rio de Janeiro), 14(4): 379-399.

Martins AV, Falcão AL & Silva JE. 1964. Um novo flebotomo do Estado de Goiás, *Lutzomyia teratodes* sp.n. (Diptera, Psychodidae). *Revista brasileira de biologia*, (Rio de Janeiro), 24(3): 321-324.

Martins AV, Falcão AL, Silva JE. 1965. Notas sobre flebotomos do Território de Rondônia, com a descrição de seis espécies novas (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 25(1): 1-20.

Martins AV, Souza MA, Falcão AL. 1962. Estudos sobre os flebotomos do Estado de Minas Gerais. IV: Descrição de duas novas espécies do sub-gênero "*Lutzomyia*" França, 1924 (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 22(1): 39-46.

Martins AV, Williams P & Falcão AL. 1978. American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro.

Marzochi MCA. 1992. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). *Journal Brazilian Medicine*, 63 (5/6): 81-105.

Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL. 2005. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Hinrichsen SL., editor. DIP – Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro, Brazil: Guanabara Koogan; 2005: 398–409

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista Inst Med Trop São Paulo*, 44:255-9.

Millán J, Travaini A, Zanet S, López-Bao JV, Trisciuglio A , Ferroglio E, Rodríguez A. 2016. Detection of *Leishmania* DNA in wild foxes and associated ticks in Patagonia, Argentina, 2000 km south of its known distribution area. *Parasites & Vectors*, 9:241. Doi: 10.1186/s13071-016-1515-4

Montoya-Lerma J, Lane RP. 1996. Factors affecting host preference of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Bull Entomol Res*, 86(01):43.

Moraes JLP, Santos CLC, Bastos VJC, Pereira ACN, Moraes LS, Moraes JR, Costa MC, Rebêlo JM. 2015. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em matas ciliares na transição entre a Amazônia úmida e o Nordeste semi-árido do Brasil. *Entomotrópica* 30(3): 20-29.

MS - Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2006. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf.

Mullis K. 1993. Nobel lecture: the polymerase chain reaction. The Royal Swedish Academy of Sciences Nobel Prize: Chemistry The Royal Swedish Academy of Sciences, Sweden, p. 8.

Nardi MS. 2010. Pesquisa de *Leishmania* sp. Em flebotomos e mamíferos silvestres de fragmentos florestais da região do Pontal de Paranapanema, SP. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo – USP. 63F.il

Negrão GN, Ferreira MEMC. 2009. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas Américas. *Revista Percurso*, 1(1): 85-103.

Negrão GN, Ferreira MEMC. 2014. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. *Revista Percurso - NEMO Maringá*, 6 (1): 147- 168.

Neto GSP & Melo, FR. 2013. Comunidade de roedores e marsupiais do sudeste goiano. *Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão – CONPEEX (2013)*, p 6627-6638.

O'Connell MA. 1989. Population dynamics of Neotropical small mammals in seasonal habitats. *Journal of Mammalogy*. 70(3):532-548.

Oviedo M, Moreno GGD. 1995. Bionomía de los vectores de leishmaniasis visceral en el Estado Trujillo, Venezuela. III. Colonización de *Lutzomyia evansi*. *Bol Dir MalariolSaneam Ambient*, 35(Suppl 1):269–76.

Pádua TTF, D'Andrea PS, de Paula DAJ, Nakazato L, Dutra L, Bonvicino CR, Almeida ABPF, Boa-Sorte EC, Sousa VRF. 2011. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 12(1): 81-3 Doi: 10.1089/vbz.2010.0268

Paglia AP. 2012. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers in Conservation Biology*. Conservation International, Arlington, VA, 6(2)

Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS. 2010. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Trop*. 115: 126–130. Accessed at: <http://producao.usp.br/handle/BDPI/26527>, 19 Jun 2017.

Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Junior HFA, et al. 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sand- flies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop*, 99(2–3):252–9.

Paiva-Cavalcanti M, Felinto de Brito ME, de Souza WV, de Miranda Gomes Y, Abath FG. 2009. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *The Veterinary Journal*, 189:356-8.

Palmer SR, Soulsby EJJ and Simpson DIH. *Zoonoses: biology, clinical practice, and public health control*. Oxford University Press, Oxford ; New York, 1998. 948p

Paparelle A, Henkes JA. 2013. Devastação da cobertura vegetal nativa no bioma Cerrado do Distrito Federal caracterizando a extinção de espécies da flora. *Revista Gestão da sustentabilidade ambiental*, 1(2):241 – 256.

PARNA [1997]. Plano de Manejo do Parque Nacional de Brasília. Convênio IBAMA x FUNATURA. Encartes: 4-6. Accessed at: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/PARNA%20Brasilia.pdf>, 23 may, 2016.

Perez JE, Veland N, Espinosa D, Torres K, Ogusuku E, Llanos-Cuentas A, et al. 2007. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(5):655–8.

Périco E, Cemin, G, Lima DFB, Rempel, C. 2005. Efeitos da fragmentação de habitats sobre comunidades animais: utilização de sistemas de informação geográfica e de métricas de paisagem para seleção de áreas adequadas a testes. *Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil*, 16-21 abril 2005, INPE, p. 2339-2346.

Pifano FRM. 1964. Investigaciones epidemiológicas sobre la leishmaniasis visceral en la isla de Margarita. Estado Nueva Esparta, Venezuela. *Gac Med Caracas*, 72:425–30.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VMWG, Gebhard D, Real G, Ruitenberg EJ. 1995. *Leishmania infantum* specific T lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major

histocompatibility complex restricted manner. *European Journal of Immunology*, 25:1594-1600

Pinelli E, Killick-Kendric R, Wagenar J, Bernadina W, Del Real G, Ruitenberg J. 1994. Cellular and humoral imune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 629(1):229-235

Pinelli E, Rutten MWGV, Ruitenberg EJ. 1999. Cellular imune responses in canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of a canine leishmaniasis. Forum, Barcelona, 1999.* p. 60-64.

Pinto C. 1926. *Phlebotomus neivai* e *Phlebotomus fischeri* n.sp. Sôbre o aparelho espicular dos phlebotomos e seu valor especifico: *Sciencia Medica*, (Rio de Janeiro), 4(7): 370-375.

Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C. 2008. Detection of natural infec- tion 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*,107(1):66–9

Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TdeA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. 2011. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. *Acta tropica*, 120(3):273-5

Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. 2009. 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(4):593-5.

Plano de Manejo - Parque Nacional de Brasília Convênio IBAMA – FUNATURA, 1997. <http://docplayer.com.br/7539000-Indice-geral-do-plano-de-manejo-do-parque-nacional-de-brasilia.html> Acesso em 21.10.2016

Prata A, Silva LA. 2005. Calazar. In: Coura, JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.713-732.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. 2005. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38: 70-72, Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000100017>

Quaresma PF, Rego FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Junior AJ, Teixeira Neto RG, et al. 2011. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105(10):579-85.

Quintal APN; Ribeiro ES, Rodrigues FP; Rocha FS; Floeter-Winter LM, Nunes CM. 2010. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. Veterinary Parasitology, 176:112-119

Ready PD. 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annual Review of Entomology, 58:227-50.

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesgo G. 1999. Detention of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph nodes aspirates and blood. Journal of Clinical Microbiology, 37: 2931-2935

Redford KH & Fonseca GAB. 1986, The role of Gallery Forests in the Zoogeography of the Cerrado's non-volant Mammalian Fauna. Biotropica, 18(2): 126-135.

Rêgo FD, Rugani JMN, Shimabukuro PHF, Tonelli GB, Quaresma PF, Gontijo CMF. 2015. Molecular Detection of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies

(Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniasis Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. Sturtevant J, ed. PLoS ONE, 10(4). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122038>

Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Rezende AV. Importância das matas de galeria: manutenção e recuperação. In: Ribeiro JF. (ed) Cerrado: Matas de Galeria. Planaltina: Embrapa – CPAC. 1998. 164p.

Ribeiro JF & Walter BMT. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In Cerrado: ecologia e flora (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina, p.151 -212.

Rocha LS, Falqueto A, dos Santos CB, Ferreira AL, da Graça GC, Grimaldi-Jr G, Cupolillo E. 2010. Survey of natural infection by *Leishmania* in sandfly species collected in southeastern Brazil. Philosophical Trans RS Trop Med Hyg, 104: 461–466.

Rodrigues ACM, Silva RA, Melo LM, Luciano MCS, Bevilaqua CML. 2014. Epidemiological survey of *Lutzomyia longipalpis* infected by *Leishmania infantum* in an endemic area of Brazil. Rev Bras Parasitol veterinária, 23:55–62.

Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg, 93:47–9.

Romero GA, Boelaert M. 2010. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. PLoS Neglected Tropical Disease, 4(1):e584.

Roque AL, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. 2013 a. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(2):e589.

Roque AL, Xavier SC, Gerhardt M, Silva MF, Lima VS, D'Andrea PS, et al. 2013 b. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Para State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Veterinary Parasitology*, 193(1-3):71-7.

Roque ALR & Jansen AM. 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3: 251-262.

Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. 2010. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 4: 1–8. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000589

Roque ALR, Jansen AM. 2014a. Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* sp. e sua importância na manutenção dos Ciclos de Transmissão nos ambientes silvestre e Sinantrópico. In: Conceição-Silva F, De-Simone SG, Alves CR, Porrozzi R. *Questões atuais em leishmanioses do continente americano*. Editora Fiocruz, 2014.

Roque ALR, Jansen AM. 2014b. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2014; 3:251–262

Sábio PB, Andrade AJ, Galati EAB. 2014. Assessment of the taxonomic status of some species included in the shannoni complex, with the description of a new species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology* 51(2): 331-341. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/ME13153>

Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P, et al. 2011. Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PLoS One*, 6(5): e19851

Salomón OD, Andrade FJD, Fernández MS, Rosa JR, Szelag EA, Santini MS. 2010. Nuevos registros de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) para la Argentina. *Revista da Sociedade Entomológica Argentina*, 69 (3-4): 261-265.

Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Rangel EF. 2015. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 110(7): 831-846. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150207>

Salotra P, Sreenivas G, Pogue GP, Lee N, Nakhasi HL, Ramesh V, et al. 2001. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. J Clin Microbiol, 39(3):849–54.

Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Tauil PL. 2009. Study on the transmission of American cutaneous leishmaniasis in the Federal District. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42: 686-690. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000600015>

Sampaio RNR, Rocha RAA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. 1980. Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do Hospital Escola da UnB. Anais Brasileiros de Dermatologia 55: 69-76, 1980.

Santos-Filho M. 2000. Uso de habitat por mamíferos não-voadores na Estação Ecológica Serra das Araras, Mato Grosso, Brasil. Dissertação de Mestrado em Ecologia/INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.

Santos-Filho MS, D. J.; Sanaiotti, T. M. 2008. Variação sazonal na riqueza e na abundância de pequenos mamíferos, na estrutura da floresta e na disponibilidade de artrópodes em fragmentos florestais no Mato Grosso, Brasil. *Biota Neotrop*, 8(1) Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v8n1/pt/abstract?article+bn02508012008>>.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, de Carvalho DA, de Souza CM, Freitas CR, et al. 2011. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Trop*, 117(2): 137-45

Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva SO, de Andrade ASR, Melo MN. 2010. 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*, 105(8): 1033-9

Saraiva L, Leite CG, Lima ACVMR, Carvalho LOA, Pereira AAS, Rugani N, Rego FD, Gontijo CMF, Andrade Filho JD. 2017 Seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* DNA detection in vector species in an area with endemic visceral leishmaniasis *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(4): 309-318

Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Veterinary Parasitology* 160: 18-24.

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N et al. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47: 349–358.

Schubach EYP. 2011. Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. Brasília. [Dissertação]. Brasília - Universidade de Brasília; 2011.

SEBRAE/DF - BRASÍLIA, Coração Brasileiro - Brasília, 1995

SES/DF-Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no DF (Leishmaniose Visceral e Tegumentar Americana), Ano 4, nº 2 -Maio de 2012.

SES/DF-Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no DF (Leishmaniose Visceral e Tegumentar Americana), Ano 4, nº 2 -Maio de 2012.

Shannon R. 1939. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. *Am. J. Trop. Med*, 19: 131-140

Shannon RC & Del Ponte E. 1927. Cuatro notas sobre especies nuevas de dipteros nematóceros, hematófagos o no, de la República Argentina. *Revista del Instituto bacteriológico*, 4(1): 724-726.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(4):511.

Sherlock IA. 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(6):671- 83

Shimabukuro PHF, Andrade AJ, Galati EAB. 2017. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys*, 660: 67–106. Doi: <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>

Shimabukuro PHF, Galati EAB. 2010. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropica* 11(1a):1-20. Accessed at <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/pt/abstract?inventory+bn0361101a2011>, 20 Apr 2016

Silva DF, Freitas RA, Franco AMR. 2007. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru (AM). *Neotropical Entomology*, 36(1): 138-144.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. 2001. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 285-291.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA, Souza AAA. 1991. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia)*

lainsonido roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 33(1):18-22

Slappendel RJ. 1988. Canine leishmaniasis A review based on 95 cases in Netherlands. Veterinary Quartely, 10:1-16

Souza NP, de Almeida A, de Freitas TPT, da Paz RCR, Dutra V, Nakazato L, et al. 2010. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 43(3):333-5

Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, Le Pont F, Brenière SF. 1994. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolívia identified by kDNA-polymerase chain reaction. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94(1): 5-6.

Teodoro U, Salvia-Filho V, Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEC, Silveira TGV. 1997. Influence of peridomicilar environmental conditions in the dispersion and proliferation of phlebotomine sandflies in Paraná State, Southern Brazil. Arquivos de Biologia e Tecnologia, 40 (3): 747-751.

Travi BL, Arteaga LT, Leon AP, Adler GH. 2002. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97: 887–892. Doi: 10.1590/s0074-02762002000600025

Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Vélez ID. 1994. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colômbia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 84: 676-677.

Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Velez ID. 1996. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. J Med Entomol, 33(3):278–85.

Travi BL, Osorio Y, Guarín N, Cadena H. 1998. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected

Didelphis marsupialis, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v.88, p.73-75.

Travi BL, Velez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J.1990. *Lutzomyia evansi*, an alter-nate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(5):676–7.

Travi BL; Osório Y; Becerra MT; Adler GH. 1998 (a). 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* 92(3): 275- 8. 1998 a)

Tribe CJ. 2005. A new species of *Rhipidomys* (Rodentia, Muroidea) from north-eastern Brazil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 63 (1): 131-146.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM.1994 Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41: 324–330. doi: 10.1111/j.1550-7408.1994.tb06085.x.

UNESCO. *Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço*. 1st ed. Brasília: Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura – UNESCO. 2002.

Urias EVR, Carvalho SFG, Oliveira CL, Carvalho MLM, Teles LF, Rodrigues MC. et al. 2009. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, [Internet]. 31(5): 348-354. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000500013&lng=en. Epub Sep 25, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-848420090005000073>.

Van der Meide, W. F., Schoone, G. J., William, R., Zeegelaar, J. E., Vries, H. J. C. De, Özbek, Y., Schallig, H. D. F. H. 2005. Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay as a New Molecular Tool for Detection and Quantification of Leishmania Parasites in Skin Biopsy Samples Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay as a New Molecular Tool for Detection and Quantification. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5560–5566.

Vieira MV. 1996. Dynamics of a rodent assemblage in a Cerrado of Southeast Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*. 57(1):99-107.

Vieira MV. 2002. Seasonal niche dynamics in coexisting rodents of the Brazilian Cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 38(1):7-15.

Vieiro GP, Ferreira JHD; Arantes EJ. 2014. Quantificação da demanda hídrica utilizando o balanço de água no solo e o levantamento agrícola por imagens de satélite. *Brazilian Journal of Irrigation and Drainage*, 19(4) <http://dx.doi.org/10.15809/irriga.2014v19n4p675>

Vilela ML, Pita-Pereira D, Azevedo CG, Godoy RE, Britto C, Rangel EF. 2013. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban áreas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(5): 578-585 Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762013000500007>

Werneck GL, Pereira TJCF, Farias GC, Silva FO, Chaves FC, Gouvêa MV, Costa CHN, FAA. 2004. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004*

WHO - Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire 3 JUNE 2016, 91th YEAR / 3 JUIN 2016, 91e ANNÉE No 22, 2016, 91, 285–296 <http://www.who.int/wer> Annual subscription / Abonnement annuel Sw. fr. / Fr. s. 346.– 06.2016 ISSN 0049-8114 Printed in Switzerland

WHO-World Health Organization. 2009. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

WHO-World Health Organization. Diseases covered by NTD Department, 2008. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.

WHO-World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

WHO-World Health Organization. Media Centre: leishmaniasis [Internet]; 2014. Disponível P., em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

Young DG & Duncan MA. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera : Psychodidae). 881 pp. Associated Publishers, Gainesville (Florida) (United States of America). Accessed at: [ADA285737](#), 19 Jun 2017.

Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. 2016. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of Leishmania Species. Debrabant A, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases;10(2):e0004485.

Bryceson ADM. Leishmaniasis. In: Cook GC, editor. Manson's tropical diseases. 12thEd. London: WB Saunders. 1996.p. 1213-45.

Neitzke HC, Scodro RBL, Castro KRR, Sversutti ACD, Silveira TGV, Teodoro U. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná - Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008; 41(1):17-22.

Sampaio RNR, Paula CDR. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba. 1999; 32 (5):523-528. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821999000500009>

Paiva BR, Costa NF, Secundino PF, Pimenta P, Galati E AB, Junior HFA, Malafronte RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2007; 23(1):87-94.

Silva AC, Gomes AC. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Viannia, 1911. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34:187-91.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa Britto CC. 2005. 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; 99: 905-913.

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; 93:47-9.

Lara e Silva FO. Leishmaniose Tegumentar Americana em Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores. Dissertação Mestrado em Ciências na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias. – Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, 2010.

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A. 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; 97(2): 185-188.

Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39(6): 540-543.

Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JC, Brazuna JCM. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Experimental Parasitology. 2008; 119: 343–348.

Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MVZ, Legriffon CMO, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira TGV. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the State of Paraná, Southern Brasil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2011; 11: 137-143.

Dias ES, Michalsky EM, Nascimento JC, Ferreira EC, Lopes JV, Fortes-Dias CL. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology*. 2013; 38 (1).

Dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MD, De Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*. 1998;12(3):315-7.

THOMAS-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MARTINI-DUMAS, A. & SERRES, E., 1993. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*, 68: 107-108.

Sergent, Edmond *et alii* 1921 'Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (*Phlebotomus papatasi* Scop.)'. *Comp. Rendum Academic de Science*, nº 173, pp. 1030-2.

Rogers, D. *et al.* 1904 'Cachexial fever in India associated with Cunninham-Leishman-Donovan bodies'. *British Medical Journal*, nº 2, pp. 644-5.

Rabello, Eduardo 1925 'Contribuição ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil I. História e sinonímia'. *Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia*, nº 1, pp. 3-29.

Nicolle, Charles J. 1908 'Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie'. *Archives du Institute Pasteur de Tunisia*, nº 3, pp. 1-26.

Chagas, Carlos 1908 'Trypanosoma minascense. Nota preliminar'. 1908 *O Brasil Médico*, 22:48, p. 471.

Aragão, Henrique 1922 'Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*'. *O Brasil Médico*, 36, p. 129.

Killick-Kendrick, R. 1990. Phlebotomine vectors of the Leishmaniasis: A review. *Med. Vet. Ent.*, 4: 1-24.

Killick-kendrick R, Ward RD 1981. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology* 82: 143-152.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza A, Silveira T. Amazonian visceral leishmaniasis - distribuição of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 135-137.

De Lima, Hector, De Guglielmo, Zoraya, Rodríguez, Armando, Convit, Jacinto, & Rodriguez, Noris. (2002). Cotton Rats (*Sigmodon hispidus*) and Black Rats (*Rattus rattus*) as Possible Reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(2), 169-174. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000200004>

P. B. Sábio, A. F. Brilhante, M. G. Quintana, A. J. Andrade, E. A. B. Galati; On the Synonyms of *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Dyar, 1929) and *Pa. bigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1941) and the Resuscitation of *Pa. pifanoi* (Ortiz, 1972) With the Description of Its Female (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) . *J Med Entomol* 2016; 53 (5): 1140-1147. doi: 10.1093/jme/tjw094

Barretto, M.P., 1962. Novos subgêneros de *Lutzomyia* Franc, a, 1924 (Diptera, Psychodidae, subfamília Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 4, 91–100

Paiva, Bianca Regina de, Secundino, Nagilá Francinete Costa, Pimenta, Paulo Fillemon Paulocci, Galati, Eunice Aparecida Bianchi, Andrade Junior, Heitor Franco, & Malafronte, Rosely dos Santos. (2007). Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cadernos de*

Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sand flies. *Insect Mol Biol* 2002; 11:117-22.

Lee A. Smith, Alexandre A. Peixoto & Jeffrey C. Hall. 2009. RNA Editing in the *Drosophila* Dmcaia Calcium-Channel $\alpha 1$ Subunit Transcript Pages 227-240 | Received 10 Feb 1998, Published online: 11 Jul 2009 <http://dx.doi.org/10.3109/01677069809108560>

Lainson, Ralph, & Rangel, Elizabeth F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8), 811-827. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>

Lessa, L. G., & de Souza Paula, C. (2014). Estrutura da comunidade de pequenos mamíferos em uma área de mata ciliar savânica no Parque Estadual do Rio Preto, Minas Gerais, Brasil. *Neotropical Biology & Conservation*, 9(2).

Mello DA. 1980. Estudo populacional de algumas espécies de roedores de cerrados (norte do município de Formosa, GO). *Revista brasileira de Biologia*, 40:843-860.

Gastal, M. L. A. (1997). *Ecologia de Comunidades de Pequenos Mamíferos em Matas de Galeria de Brasília, DF*. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências da Universidade de Brasília, Brasília, DF 123p.

FERNANDEZ, F.A.S. & PIRES, A.S. 2006. Perspectivas para a sobrevivência dos marsupiais brasileiros em fragmentos florestais: o que sabemos e que ainda precisamos saber? *In Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução* (N.C. Cáceres & E.L.A. Monteiro-Filho, eds.). Editora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, p. 191-201.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS 2005. 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* 129: 219-227.

Briones MR, Souto RP, Stalf BF, Zingales B. 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rDNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Bioch. Parasitol*, 104:219-32.

Souto RP, Vargas N, Zingales B. 1999. *Trypanosoma rangelli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the çarge subunit ribossomal RNA gene. *Exp. Parasitol*, 91: 306-14.

Schijman AG, Lauricella MA, Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Bisio M, et al. 2006. Differential detection of *Blastochrithidia triatomae* and *Trypanosoma cruzi* by amplification of 24 alpha ribossomal RNA genes in faeces os silvatic triatomine species from rural northwestern Argentina. *Acta Tropi*, 99:50-4.

Keesing, F., R.D. Holt, and R.S. Ostfeld. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* 9:485-498. [PDF](#)

ANEXOS

Anexo 1. Autorização para coleta



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: 36808-3	Data da Emissão: 07/04/2014 17:18	Data para Revalidação*: 07/05/2015
* 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 a 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: Rodrigo Gurgel Gonçalves	CPF: 864.037.531-34
Título do Projeto: Biologia de tripanosomatídeos e seus vetores no Brasil Central	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	CNPJ: 00.038.174/0001-43

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de flebotomíneos	10/2012	10/2015
2	Captura de Mamíferos	04/2014	05/2016

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Andréy José de Andrade	Pesquisador	042.450.886-99	M9163430 PC-MG	Brasileira
2	JONATAS BARBOSA CAVALCANTE FERREIRA	pesquisador	714.867.201-53	2087016 SSP-DF	Brasileira
3	Aline Machado Rapello do Nascimento	Pesquisadora	874.167.351-49	1789791 SSP-DF	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		DF	RESERVA BIOLÓGICA DA CONTAGEM	UC Federal
2	BRASILIA	DF	Fazenda Agua Limpa UnB	Fora de UC Federal
3		DF	AREA DE RELEVANTE INTERESSE ECOLÓGICO CAPETINGA/TAQUARA	UC Federal
4		DF	PARQUE NACIONAL DE BRASÍLIA	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Oligoryzomys, Gracilinanus, Psychodidae, Rhipidomys macrurus, Didelphidae, Akodon, Proechimys, Nectomys rattus, Oecomys bicolor, Necromys lasiurus, Oryzomys, Calomys
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Gracilinanus, Rhipidomys macrurus, Nectomys rattus, Oryzomys, Oecomys bicolor, Proechimys, Necromys lasiurus, Akodon, Oligoryzomys, Calomys, Didelphidae
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Psychodidae (*Qtde: 600)
4	Marcação de animais silvestres in situ	Proechimys, Gracilinanus, Oryzomys, Akodon, Calomys, Necromys lasiurus, Oecomys bicolor, Oligoryzomys, Didelphidae, Nectomys rattus, Rhipidomys macrurus

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de captura/coleta(Shannon), Armadilha luminosa
3	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
4	Método de marcação (Outros mamíferos)	Bnnco

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	

Anexo 2. CEUA

	Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal
Brasília, 11 de abril de 2014.	
DECLARAÇÃO	
Declaramos que o projeto intitulado "EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS SOBRE A INFECÇÃO NATURAL DE VETORES E RESERVATÓRIOS DE LEISHMANIA SPP. NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL", UnBDOC n.º 21793/2014, sob responsabilidade do Professor Rodrigo Gurgel Gonçalves foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.	
 Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues Coordenador da CEUA	
*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.	

Anexo 3. Carta da editora da Checklist

Kirstern Lica Follmann Haseyama licahaseyama@gmail.com

mar. 13/06, 14:03

Vous;

Andrey José Andrade (bioandrey@gmail.com);

+5 autres

Aline Machado Rapello: We have reached a decision regarding your submission to Check List, "Na updated list of sand flies (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) in the Federal District of Brazil".

Our decision is to: Accept after required revisions

