UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
MESTRADO EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

CASSIANA MIKI ISHIMI

FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM FRAGMENTOS DE MATA DA ÁREA URBANA DE DOURADOS, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

DOURADOS, MS

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
MESTRADO EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

CASSIANA MIKI ISHIMI

FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM FRAGMENTOS DE MATA DA ÁREA URBANA DE DOURADOS, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice A. Bianchi Galati
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Elizabeth M. C. Dorval

DOURADOS, MS

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

595.77
I798f

Ishimi, Cassiana Miki.
Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em Fragmentos de Mata da Área Urbana de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil / Cassiana Miki Ishimi. – Dourados, MS : UFGD, 2012.
68 f.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati.
Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Flebótomo – Mato Grosso do Sul. 2. Flebotomíneo. 3. Vetor da Leishmaniose. I. Título.

"Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em fragmentos de mata em área urbana de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil"

Por

CASSIANA MIKI ISHIMI

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Entomologia

Profª. Drª. Eunice Aparecida Bianchoi Galati
Orientadora - USP

Profª. Drª. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval
Co-orientadora – UFMS

Profª. Drª. Vânia Lúcia Brandão Nunes
Membro Titular – Uniderp

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho
Membro Titular – Fiocruz

Prof. Dr. Fabio Juliano Negrão
Membro Titular – UFGD

Aprovado em: 30 de agosto de 2012

Agradeço e dedico este trabalho a Deus,
Aos meus pais, Yukio e Francisca
Ao meu esposo Nilton e minha filha Thifany,
pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade recebida, ter-me feito perseverante e colocado em meu caminho pessoas como vocês...

À Prof.ª Dr.ª Eunice Aparecida Bianchi Galati, pela orientação, confiança e dedicação desde o início do trabalho, e disposição para sanar minhas dúvidas.

À Prof.ª Dr.ª Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval, pela coorientação, amizade e dedicação.

À bióloga MSc. Magda Freitas Fernandes pela amizade e apoio, por não medir esforços, por compartilhar a sua sabedoria, pelo incentivo para cursar o mestrado, o meu muito obrigada. Deus te abençoe sempre!

Ao biólogo MSc. Kleiton Maciel dos Santos pela amizade, por me ensinar muito do que sei sobre flebotomíneos, por estar sempre disposto a sanar minhas dúvidas, pelas contribuições durante as etapas deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), pela oportunidade de realização desse trabalho de pesquisa.

Ao ex Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, FCBA, Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes pela ajuda financeira para compra de materiais indispensáveis na execução da pesquisa.

Ao atual Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, FCBA, Prof. Dr. Josué Raizer, pelo esforço e colaboração.

A Capes pela bolsa de mestrado concedida para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

À Divisão de Transporte da UFGD, na pessoa do Sr. Carlos Paulino Ramos e aos motoristas que ajudaram na execução dos trabalhos de campo.

Agradeço de maneira especial, ao meu esposo Nilton Silva Figueiredo, pelo incentivo, companheirismo, compreensão e pela ajuda nos dias cansativos de coleta. Muito obrigada!

Aos meus familiares, meus pais Yukio Ishimi e Francisca Cherri Ishimi pelo amor e incentivo. À minha querida filha Thifany Ishimi Figueiredo, pelas horas de ausência, e pelo abraço gostoso ao chegar das capturas.

Ao amigo Marcos Daniel Valdez Martinez que cuidou de minha filha Thifany para que junto ao meu esposo pudéssemos realizar as capturas.

À Prof.ª Dr.ª Alessandra Gutierrez de Oliveira - UFMS pelo grande esforço e pelos recursos financeiros para a análise molecular. Às biólogas MSc. Mirella Ferreira da Cunha Santos - UNIDERP (doutoranda no PPG-DIP/UFMS) e Aline Etelvina Casaril (mestranda no PPG-DIP/UFMS) pela dedicação e execução da análise molecular.

Ao biólogo Lucas Lopes da Silveira Peres pelo auxílio nas coletas.

À bióloga Ana Claudia Verlindo Canesin pela amizade e incentivo.

Aos colegas da equipe de estudos dos flebotomíneos pela aquisição das armadilhas luminosas (CDC).

A todos que de alguma forma direta ou indiretamente, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada, Deus abençoe a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS viii
LISTA DE TABELAS ix
LISTA DE ABREVIAÇÕES x
RESUMO xi
ABSTRACT xii
APRESENTAÇÃO xiii
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA
1.1 Flebotomíneos 1
1.2 Peridomicilização de espécies vetoras 4
1.3 Cobertura vegetal X Diversidade de flebotomíneos 4
1.4 Relação matas X Proximidade das casas 5
1.5 Agentes etiológicos de leishmanioses 6
1.6 Reservatórios de *Leishmania* sp 7
1.7 As leishmanioses 8
1.7.1 Leishmaniose Tegumentar (LT) 9
1.7.2 Leishmaniose Visceral (LV) 10
1.8 Infecção Natural e Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR -) 11
2 JUSTIFICATIVA 13
3 OBJETIVOS
3.1 Objetivo Geral 14
3.2 Objetivos Específicos 14
4 MATERIAL E MÉTODOS
4.1 Área de estudo 15
4.2 Locais de captura de flebotomíneos 15
4.3 Captura de flebotomíneos 21
4.4 Dissecação e identificação dos flebotomíneos 22
4.5 Reação em cadeia da polimerase em flebotomíneos 22
4.5.1 Extração do DNA de *Leishmania* 22
4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR -) 23
4.5.3 PCR-RFLP 23

4.5.3.1Incubação com HAE III 24
4.6 Análise populacional 24
5 RESULTADOS
5.1 Fauna flebotomínea 26
5.2 Infecção natural 32
5.2.1 Exame parasitológico 32
5.3 Reação em cadeia da polimerase 32
6 DISCUSSÃO 35
7 CONCLUSÕES 41
REFERÊNCIAS 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Pontos de captura de flebotomíneos, ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, MS, Brasil. Fonte: Imagens de satélite CBERS 2B, INPE; sensor HCR, de 07 de janeiro de 2009 e sensor CCD, de 21 de abril de 2009.....17
Figura 2- A- aspectos da Mata Guaicurus (M1), **B**- armadilha (CDC) copa e **C**- armadilha (CDC) solo, Dourados, MS, 2011 18
Figura 3- A- aspectos da Mata Irmãos Maristas (M2), **B**- armadilha (CDC) copa e **C**- armadilha (CDC) solo, Dourados, MS, 2011 18
Figura 4- Aspectos das Matas, **A** e **B** Horto Florestal (M3) e **C** e **D** Vila Almeida (M4), Dourados, MS, 2011 19
Figura 5- Aspectos da Mata do Novo Horizonte (M5), Dourados, MS, 2011 19
Figura 6- Aspectos das Matas, **A** e **B** Chácara Caiuás (M6), **C**- Jardim Monte Alegre (M7), Dourados, MS, 2011 20
Figura 7- Aspectos das Matas, **A** e **B** Chácara Flora (M8), **C** e **D** Mosteiro Irmãs Clarissas (M9), Dourados, MS, 2011.....20
Figura 8- Aspectos da Mata Jardim das Primaveras (M10), Dourados, MS, 2011 ...21
Figura 9- Tendência sazonal em relação à média mensal aritmética e média de Williams, **A**- *Nyssomyia whitmani*, **B**- *Pintomyia pessoai*, **C**- *Migonemyia migonei*, **D**- *Brumptomyia brumpti*, **E**- *Psathyromyia aragaoi* capturados em ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, MS, Brasil.....30
Figura 10- Distribuição mensal das espécies *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei* e *Pintomyia pessoai*. **A**- Médias mensais da umidade relativa do ar (%). **B**- Número total de indivíduos com as médias mensais da precipitação pluviométrica (mm) e temperatura (°C), período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, MS, Brasil.....31
Figura 11- Resultado de amplificação com PCR – oligonucleotídeos LITSR e L5.8S. Amostra 37: infecção por *Leishmania* sp. em amostra de *Nyssomyia whitmani* individualizada.....33
Figura 12- Digestão das regiões amplificadas ITS1 da espécie de *Le. infantum chagasi* com endonuclease de restrição HAE III 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número absoluto, índice de abundância de espécies padronizado (IAEP) e frequência de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil 27

Tabela 2- Distribuição mensal das espécies de flebotomíneos capturados em ambiente de mata e frequência relativa, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil 28

Tabela 3- Flebotomíneos capturados em ambiente de mata de acordo com a espécie e ecótopo, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil 29

Tabela 4- Taxa mínima de infecção por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi* para as espécies *Ny. whitmani* e *Pi*. *pessoai* em ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil 34

LISTA DAS ABREVIAÇÕES

Brumptomyia	*Br.*
Evandromyia	*Ev.*
Irmãos Maristas	I. Maristas
Jardim	Jd.
Leishmania	*Le*.
Leishmaniose Tegumentar	LT
Leishmaniose Visceral	LV
Leishmaniose Visceral Canina	LVC
Lutzomyia	*Lu.*
Micropygomyia	*Mi.*
Migonemyia	*Mg.*
Monte Alegre	M. Alegre
Novo Horizonte	N. Horizonte
Nyssomyia	*Ny.*
Parque Alvorada	Pq. Alvorada
Pintomyia	*Pi.*
Psathyromyia	*Pa.*
Sciopemyia	*Sc.*
Viannia	*Vi*.
Vila Almeida	V. Almeida
Sistema Nacional de Agravos de Notificação	SINAN
World Health Organization	WHO
Índice de abundância de espécies padronizado	IAEP

RESUMO

Em Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul (MS), região intermediária entre a Mata Atlântica e o Cerrado, dois biomas de grande importância na epidemiologia das leishmanioses, já foram encontradas, em ambientes urbanos, espécies de flebotomíneos vetores de agentes das leishmanioses, tegumentar e visceral. A manutenção dos ambientes naturais propicia o desenvolvimento desses insetos e de reservatórios de *Leishmania* sp., e o homem em contato com esses ecossistemas, pode participar acidentalmente da cadeia de transmissão dessas parasitoses. O objetivo deste estudo foi identificar a fauna de flebotomíneos que ocorre em ecossistemas florestais urbanos de Dourados para conhecer a diversidade, abundância, riqueza e distribuição mensal das espécies. Foram amostrados 10 pontos em matas urbanas, por meio de armadilhas automáticas luminosas, instaladas mensalmente, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011. As fêmeas foram dissecadas para identificação e observação de flagelados em seus tubos digestivos e submetidas à análise molecular para identificação da espécie de *Leishmania*. Para calcular a abundância das espécies, foi utilizado o índice de abundância das espécies padronizado (IAEP). A fauna flebotomínea constituiu-se de 18 espécies: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia cunhai*, *Brumptomyia galindoi*, *Brumptomyia pintoi, Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Micropygomyia acanthopharynx*, *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia aragaoi*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia shannoni*, *Pintomyia christenseni*, *Pintomyia misionensis*, *Pintomyia pessoai* e *Sciopemyia sordellii*. As espécies mais abundantes foram *Nyssomyia* whitmani, *Brumptomyia brumpti*, *Psathyromyia aragaoi* e *Pintomyia pessoai*. A maior frequência (17,8%) dos espécimes foi em Setembro. Uma fêmea de *Nyssomyia whitmani* foi encontrada infectada por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*. Em conclusão, o estudo confirmou a presença de vários vetores de agentes de leishmanioses tegmentar e visceral em fragmentos de florestas urbanas de Dourados, MS.

Palavras-chave: Leishmanioses, vetores, *Leishmania*, fauna.

ABSTRACT

Dourados is situated in a transitional region between Atlantic Forest and Cerrado - two important biomes in epidemiology of leishmaniasis - sandfly vectors of visceral and cutaneous leishmaniasis agents have been found. The preservation of natural environments favors the survival of these insects and reservoirs of *Leishmania* sp., and human in contact with these ecosystems may become part of the chain of parasite transmission. This study sought to investigate the sandfly fauna in urban forest ecosystems of Dourados to identify its diversity, abundance and richness species, the monthly distribution of the species, as well as to investigate natural infection by flagellates in females. A total of 10 urban forest areas were sampled with automatic light traps installed once monthly from November 2010 to October 2011. The females captured were dissected for the investigation of flagellates in their digestive tracts and were then submitted to polymerase chain reaction to identify the *Leishmania* species. Species abundance was calculated by the Standardized Index of Species Abundance (SISA). The sandfly fauna consisted of 18 species: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia cunhai*, *Brumptomyia galindoi*, *Brumptomyia pintoi, Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Micropygomyia acanthopharynx*, *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia aragaoi*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia shannoni*, *Pintomyia christenseni*, *Pintomyia misionensis*, *Pintomyia pessoai* and *Sciopemyia sordellii*. The most abundance species were *Nyssomyia whitmani*, *Brumptomyia brumpti*, *Psathyromyia aragaoi* and *Pintomyia pessoai*. The greatest frequency (17,8%) of specimens was captured in September. One female of *Nyssomyia whitmani* was found to be infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*. In conclusion, the study confirmed the presence in fragmentary urban forests of several vectors of agents of visceral and cutaneous leishmaniases.

Key words: Leishmaniasis, vectors, *Leishmania*, fauna.

APRESENTAÇÃO

Os flebotomíneos são importantes vetores de agentes etiológicos que afetam o homem e animais. Transmitem protozoários do gênero *Leishmania*, outros tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e numerosos arbovírus. Dentre estes agentes, destacam-se as leishmânias, que atuam na etiologia das leishmanioses tegumentar (LT) e visceral (LV), sendo transmitidas ao homem, quando as fêmeas praticam hematofagia (SHERLOCK, 2003).

A ação antrópica tem contribuído para que esses insetos, habitantes de ambientes naturais, principalmente florestas, encontrem em áreas urbanas, condições favoráveis para o seu desenvolvimento, tais como abrigo, alimentação e reprodução, e consequente mantendo o ciclo de transmissão das leishmanioses mais próximo do homem (MARINHO *et al*., 2008; LAINSON e SHAW, 2005).

Dourados é a segunda maior cidade do Estado de Mato Grosso do Sul. Em seu processo de expansão, conjuntos habitacionais e residenciais de luxo foram construídos cada vez mais próximos a fragmentos de matas. Bairros localizados no entorno dos fragmentos possuem casas distando menos de 20 metros da borda da mata.

O levantamento da fauna flebotomínea nos pontos amostrados possibilitou verificar áreas de risco para a transmissão de leishmanioses e pode contribuir para medidas preventivas de controle dessas doenças.

Foi realizada a caracterização da área de estudo e apresentado o método de coleta de flebotomíneos, de dissecação das fêmeas, identificação das espécies e análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Verificou-se a diversidade, abundância, composição das espécies de flebotomíneos nos ambientes de mata e espécies de parasitas identificadas em flebotomíneos capturados durante o desenvolvimento dos trabalhos.

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e constituem um grupo de insetos de grande interesse em saúde pública, em virtude de suas fêmeas estarem envolvidas na transmissão de leishmanioses, tegumentar e visceral, doenças de alta incidência no mundo (MEDEIROS, RODRIGUES, ROSELINO, 2002; MICHALSKY *et al*., 2002).

As fêmeas de flebotomíneos, excluindo raríssimas espécies autógenas, necessitam do sangue de vertebrados, daí a importância na transmissão de doenças ao homem e aos animais (SHERLOCK, 2003; AGUIAR e MEDEIROS, 2003; RANGEL e LAINSON, 2003). Algumas espécies alimentam-se de sangue apenas uma vez entre as posturas, enquanto outras podem praticar hematofagia múltiplas durante um único ciclo de oviposição, o que as potencializa como vetores. Algumas picam exclusivamente determinados grupos de vertebrados, porém outras têm hábitos ecléticos, alimentando-se indiferentemente em várias espécies de mamíferos. Machos sugam apenas sucos vegetais ou açúcares (SHERLOCK, 2003).

A atividade hematofágica dos flebotomíneos é predominantemente noturna, porém, algumas espécies podem exercê-la durante o dia em ambientes com pouca luminosidade como cavernas e áreas florestais (GOMES *et al*., 1989; GALATI *et al*., 2003a, 2006).

Machos e fêmeas ingerem substância açucarada, que é estocada no divertículo de onde é levada lentamente ao trato digestivo e então absorvida. É provável que a passagem dos açúcares do divertículo para o trato digestivo se dê apenas no instante em que as atividades ou o momento fisiológico do inseto requeiram o consumo de energia. Os carboidratos tem papel importante no desenvolvimento e infectividade de leishmânia, não só como controlador da flora bacteriana intestinal, agindo como bacteriostáticos, mas também como fonte de energia para os parasitas que parecem se multiplicar mais facilmente no trato digestivo dos flebotomíneos na presença de açúcares (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

Insetos de pequeno porte medindo de 2 a 3 mm os flebotomíneos possuem corpo delgado coberto com intensa pilosidade, pernas longas e delgadas. São facilmente reconhecíveis pela atitude que adotam quando em repouso, pois as asas

permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas, em posição de asa delta. Como os dípteros em geral, os flebotomíneos são holometabólicos; suas formas imaturas desenvolvem-se em solos úmidos, ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal ao abrigo da luz solar direta. Muitas vezes o criadouro funciona também como local de abrigo para os adultos, que pela fragilidade à dessecação nesta fase, necessitam de lugares úmidos, ao abrigo da luz e da movimentação do ar, como em troncos, ocos de árvores, raízes expostas, fendas nas rochas, tocas de animais e cavernas (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; BRAZIL e BRAZIL, 2003; AGUIAR e MEDEIROS, 2003).

As fêmeas que invadem as casas, frequentemente, estão à procura de repasto sanguíneo, e os machos, da cópula. Ambos os sexos podem pousar nas paredes internas por certo período, deixando o local de abrigo e se localizando nas instalações dos animais domésticos ou outras áreas próximas ao domicílio, inclusive matas residuais (AGUIAR e MEDEIROS, 2003).

Estão distribuídos por quase todas as regiões faunísticas do mundo, sendo conhecidas mais de 900 espécies. Nas Américas são cerca de 500 espécies descritas e aproximadamente 60 delas estão implicadas (suspeitas ou comprovadas) na veiculação de *Leishmania* sp. (KILLICK-KENDRICK, 1990; DEDET, 1993; SANTOS *et al*., 1998; CIPA GROUP, 1999; GALATI, 2003; SHERLOCK, 2003). No Brasil foram registradas cerca de 280 espécies (GALATI, 2008).

A fauna flebotomínica em Mato Grosso do Sul (MS) é relativamente bem conhecida, principalmente nas mesorregiões Sudoeste e Pantanal, mas grande parte das mesorregiões Centro Norte e Leste foram pouco estudadas. Até o momento a fauna em MS compõe-se de aproximadamente 63 espécies, associadas tanto a áreas rurais quanto urbanas (GALATI *et al*., 1996, 1997, 2003b, 2006; OLIVEIRA *et al*., 2001, 2003; NUNES *et al*., 2008; DORVAL *et al*., 2009; ANDRADE *et al*., 2009, 2011; SANTOS, 2010; ALMEIDA *et al*., 2010; CANESIN, 2011; FERNANDES *et al*., 2011).

Lutzomyia longipalpis (Lutz e Neiva, 1912) foi identificada por Chagas em 1936, como vetora do agente da leishmaniose visceral (LV) pela primeira vez no Estado de Sergipe e teve a sua participação confirmada como transmissora por Pessôa, em 1953, no município de Sobral no Estado do Ceará (PESSÔA e MARTINS, 1977).

Gomes, Rabelo e Galati (1978) relataram a importância epidemiológica de *Lu. longipalpis* na cadeia de transmissão da LVA no Brasil. A espécie é comumente coletada em habitações humanas nos Estados de Rio de Janeiro (AGUIAR *et al*., 1996), São Paulo (COSTA *et al*., 1997), Rio Grande do Norte (XIMENES *et al*., 2007), Piauí (ANDRADE FILHO, SILVA, FALCÃO, 2001a), Tocantins (ANDRADE FILHO *et al*., 2001b), Minas Gerais (SOUZA *et al*., 2004; MONTEIRO *et al*., 2005; RESENDE *et al*., 2006; SOUZA, BORGES, ANDRADE, 2009), Mato Grosso (MISSAWA e LIMA, 2006), Mato Grosso do Sul (ALMEIDA *et al*., 2010), entre outros.

A espécie *Lu*. *cruzi* (Mangabeira, 1938) foi incriminada como vetor de LV em Corumbá e Ladário, MS, pois foi encontrado com infecção natural por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi* e pela ausência de *Lu*. *longipalpis* na região (SANTOS *et al*., 1998; LAINSON e RANGEL, 2003). No Estado de Mato Grosso pesquisas entomológicas indicam a presença desse vetor em vários municípios com alta incidência de casos humanos de LV sugerindo sua participação na cadeia de transmissão (MISSAWA e LIMA, 2006; MESTRE e FONTES, 2007; MISSAWA *et al*., 2011).

Em Dourados, MS, estudos de fauna flebotomínea de 2003 até 2011 registraram 27 espécies: *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), *Brumptomyia avelari* (Costa Lima, 1932), *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira, 1942), *Brumptomyia galindoi* (Fairchild e Hertig, 1947), *Evandromyia bacula* (Martins, Falcão e Silva, 1965), *Evandromyia cortelezzii* (Brèthes, 1923), *Evandromyia evandroi* (Costa Lima e Antunes, 1936), *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Evandromyia teratodes* (Martins, Falcão e Silva, 1964), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão e Silva, 1964), *Lutzomyia longipalpis, Micropygomyia longipennis* (Barretto, 1946), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia antunesi* (Coutinho, 1939), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (Antunes e Coutinho, 1939), *Pintomyia christenseni* (Young e Duncan, 1994), *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Pintomyia mamedei* (Oliveira, Afonso, Dias e Brazil, 1994), *Pintomyia pessoai* (Coutinho e Barretto, 1940), *Psathyromyia aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Psathyromyia campograndensis* (Oliveira, Andrade Filho, Falcão e Brazil, 2001), *Psathyromyia hermanlenti* (Martins, Silva e Falcão, 1970), *Psathyromyia punctigeniculata* (Floch e Abonnenc, 1944), *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon e Del Ponte, 1927) (DOURADOS, 2009; SANTOS, 2010; FERNANDES *et al*., 2011; CANESIN, 2011).

1.2 Peridomicilização de espécies vetoras

Muitas espécies de flebotomíneos, comumente encontradas em florestas e cavernas vêm se adaptando ao peridomicílio em função de alterações ocasionadas pelo homem nesses ambientes, e consequente dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação para as fêmeas (GOMES *et al*., 1989) em áreas rurais e urbanas, sendo frequentemente encontradas em abrigos de animais domésticos e interior das habitações (GALATI *et al*., 2003a, 2003b; LAINSON e RANGEL, 2005; MISSAWA *et al*., 2008). Uma vez atraídas ao peridomicílio podem aí se estabelecer e passam a representar um risco constante como vetores de *Leishmania* sp., pois podem manter o ciclo de transmissão do parasita entre animais domésticos, sinantrópicos e humanos (VEXENAT *et al*., 1986; BARBOSA *et al*., 1999; BRASIL, 2010; MESTRE e FONTES, 2007; MARINHO *et al.*, 2008).

A ação antrópica além de levar à dispersão de reservatórios naturais de *Leishmania* sp. e à criação de ecótopos adequados à proliferação de vetores pode atuar na seleção das espécies de flebotomíneos e mamíferos reservatórios desse parasita, de modo que aqueles com maior valência ecológica passam a se adaptar ao ambiente modificado (LAINSON e SHAW, 2005; FONTELES *et al*., 2009). A presença desses insetos e de reservatórios no domicílio e peridomicílio, explica em parte, a persistência das leishmanioses nesses ambientes. Além disso, as residências em locais inadequados e a construção de abrigos de animais domésticos no peridomicílio favorece a infecção (LIMA *et al*., 2002).

1.3 Cobertura vegetal X Diversidade de flebotomíneos

A abordagem ambiental pela epidemiologia paisagística tem sido cada vez mais utilizada para estudos de enfermidades que afligem os seres humanos, através da utilização de geoprocessamento e sensoriamento remoto (APARÍCIO e BITENCOURT, 2004).

Tanto na escala regional como na local, os modelos espaciais e temporais das distribuições das populações de flebotomíneos são influenciados pela umidade, temperatura, luminosidade e altitude (FORATTINI, 1973). Ao analisar a vegetação, indiretamente todos esses fatores são observados (APARÍCIO e BITENCOURT, 2004).

A epidemiologia paisagística parte da premissa de que conhecendo as exigências ambientais dos vetores e reservatórios de agentes de doenças é possível prever riscos epidemiológicos por meio de informações das variáveis ambientais, o que pode auxiliar na seleção de medidas profiláticas ou de controle da enfermidade, e a LT é uma das enfermidades cuja relação com a paisagem permite seu estudo sob este aspecto (APARÍCIO, 2001; MIRANDA, MASSA, MARQUES, 1996; MIRANDA, MARQUES, MASSA, 1998; LIMA *et al*., 2002).

Ao se conhecer a fauna e os hospedeiros que ocorrem em cada tipo de paisagem, pode-se predizer que doenças seriam esperadas em cada uma delas. Em muitos casos as doenças transmitidas por vetores estão relacionadas à presença de florestas; a destruição delas pode levar à eliminação de patógenos e vetores relacionados a certas doenças, ou pode forçar a adaptação dessas populações a outros ambientes que não necessariamente as florestas (APARÍCIO, 2001).

Segundo Marinho *et al*. (2008), alterações em florestas provocam a restrição dos espaços ecológicos. A capacidade de espécies de flebotomíneos se adaptarem onde houve profundas mudanças nos seus habitats naturais (florestas) e a tendência desses insetos invadirem o ambiente antrópico, são fatores importantes atribuídos ao contato desses vetores com o homem.

Quando uma floresta é fragmentada, há consequências ecológicas na composição de espécies, muitas delas desaparecem ou se tornam raras, enquanto outras não são afetadas ou podem até se tornarem mais abundantes (LAURENCE e VASCONCELOS, 2009).

1.4 Relação matas X Proximidade das casas

A transmissão da LT ainda está relacionada à presença de matas. A persistência da infecção de forma endêmica tem relação com matas remanescentes. Nessas áreas é evidente a adaptação de flebotomíneos e reservatórios silvestres de *Leishmania* sp., propiciando a formação do ciclo de transmissão desse parasita no peridomicílio, zonas rurais e na periferia de centros urbanos (BARROS *et al*., 1985; GOMES *et al*., 1990; MIRANDA, MASSA, MARQUES, 1996; ROBERTO *et al*., 1997; LIMA *et al*., 2002).

Aparício e Bitencourt (2004) consideram a hipótese de que os flebotomíneos transitam entre as casas e a mata através de vegetação suficientemente densa ao

redor das bordas das matas, formando corredores entre o fragmento e as habitações.

Miranda, Massa e Marques (1996), Dourado *et al*. (1989) e Corte *et al*. (1996) consideram a relação entre a proximidade da casa e a mata como fator importante para a ocorrência das leishmanioses.

1.5 Agentes etiológicos de leishmanioses

Os agentes etiológicos das leishmanioses, tegumentar e visceral, são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania.* São parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. Apresentam duas formas principais: a promastigota, flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e a amastigota, aflagelada encontrada nos tecidos de hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010).

Estes parasitas acometem o homem e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos em todo o mundo. As espécies do gênero *Leishmania* têm uma ampla distribuição em países tropicais e subtropicais (LAINSON e SHAW, 1992; MURRAY *et al*., 2005; WHO, 2011).

Das espécies que acometem o homem no Brasil, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* Cunha e Chagas, 1937 é o agente etiológico da forma visceral (CUNHA *et al*., 1995; BRASIL, 2006) e associadas à leishmaniose tegumentar (LT), já foram identificadas sete espécies distribuídas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*: *Leishmania* (*Le*.) *amazonensis* Lainson e Shaw, 1972; *Le.* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911*; Le.* (*Vi.*) *guyanensis* Floch, 1954; *Le.* (*Vi.*) *lainsoni* Silveira, Shaw, Braga e Ishikawa, 1987; *Le.* (*Vi.*) *naiffi Lainson e Shaw*, *1989*; *Le.* (*Vi*.) *shawi* Lainson, Braga, Souza, Povoa e Ishikawa, 1989 e *Le.* (*Vi.*) *lindenbergi* Silveira, Ishikawa, De Souza e Lainson, 2002 (LAINSON, 1997; SILVEIRA *et al*., 1997; BRASIL, 2010). As mais amplamente distribuídas são: *Le*. (*Vi*.) *braziliensis* e *Le*. (*Le*.) *amazonensis* (GRIMALDI Jr, DAVID, MCMAHON-PRATT, 1987; BASANO e CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010).

1.6 Reservatórios de *Leishmania* sp.

Os mamíferos são importantes reservatórios para a manutenção do ciclo de vida de muitas espécies de *Leishmania* (BATES, 2007). Infecções por *Leishmania* são descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, marsupiais, equídeos, felídeos e roedores) (BRASIL, 2010).

O principal reservatório urbano de *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi* é o cão doméstico (*Canis familiaris*) (MORENO e ALVAR, 2002).

Para *Le*. (*Vi*.) *braziliensis* apesar de numerosos registros de infecção em cães (FALQUETO *et al*., 1991; DAVIES *et al*., 2000; SANTOS *et al*., 2005; ZANZARINI *et al*., 2005; DANTAS-TORRES, 2007), o Ministério da Saúde admite que faltam evidências que comprovem o papel destes animais como reservatórios e os considera como hospedeiros acidentais (BRASIL, 2010).

Algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres são considerados importantes reservatórios de agentes de LT (BRASIL, 2010).

Forattini (1960) constatou a presença de *Leishmania* sp. em três espécies de roedores silvestres, *Kannabateomys amblyonyx* (rato da taquara), *Cuniculus paca* (paca) e *Dasyprocta azarae* (cutia). Figueiredo *et al*. (2008) registraram no Estado de Mato Grosso, o primeiro caso de infecção por *Le*. (*Le*.) *chagasi* em cachorro vinagre (*Speothos venaticus*). Savani *et al*. (2010) registraram a presença de morcegos com *Le*. (*Le*.) *amazonensis* e *Le*. (*Le*.) *chagasi* no município de São Paulo, SP. Raposas (*Dusicyon vetulus*) e lobinhos (*Cerdocyon thous*) foram encontrados infectados com *Le*. (*Le*.) *chagasi* nas regiões Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Amazônica e; marsupiais didelfídeos (*Didelphis albiventris*) no Brasil e na Colômbia (BRASIL, 2006).

Gatos domésticos foram encontrados naturalmente infectados por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi* no Estado de São Paulo e por *Le*. (*Le*.) *amazonensis* em Mato Grosso do Sul (SAVANI *et al*., 2004; SOUZA *et al*., 2005; 2009).

1.7 As leishmanioses

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as seis doenças tropicais de maior impacto que afligem a população humana. Em importância só são superadas pela malária e possuem uma estimativa de aproximadamente 15 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas vivendo em área de risco. Para a LT a incidência anual é de um a 1,5 milhões de casos e de 500.000 casos para a forma visceral (WHO, 2011).

No continente americano a distribuição dessas parasitoses estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O Brasil é o país com mais registros de casos, tanto da forma tegumentar como da visceral (WHO, 2011).

Os casos de leishmanioses no Brasil estão presentes em todos os Estados, com incidência elevada, em decorrência de mudanças ambientais provocadas pela ação antrópica, que vêm modificando o perfil epidemiológico nas áreas florestais e periurbanas, onde os animais domésticos participam da manutenção e transmissão de *Leishmania* (DEANE e GRIMALDI, 1985; SHAW, 2002; BRASIL, 2006; BRASIL, 2010).

As leishmanioses constituem importantes agravos à população humana devido à gravidade de algumas de suas manifestações clínicas, ampla distribuição geográfica e a crescente tendência à urbanização. Ressaltam-se as dificuldades para o seu controle, em virtude da complexidade de seus quadros epidemiológicos e de indefinições quanto à melhor forma de tratamento (NUNES *et al*., 2001).

A LT ocorre nas populações com atividades que levam os indivíduos ao contato estreito com o ambiente florestal ou que residem em habitações próximas desse ambiente, portanto, ao alcance dos vetores (APARÍCIO, 2001).

A demanda por novas estratégias de educação em saúde e prevenção das leishmanioses é crescente. Todavia, as diferenças geográficas regionais no quadro epidemiológico dessas parasitoses, associadas à diversidade ecológica, com muitas espécies de possíveis vetores e aproximadamente 100 espécies de potenciais reservatórios dificultam as medidas de controle. Há também, dificuldades no diagnóstico e na manutenção do tratamento. A impossibilidade do acesso e produção de drogas ativas, prescrição incorreta e a pouca compreensão sobre a doença, impedem a atuação correta nos casos diagnosticados e perpetuam a

infecção humana, estimulando a resistência às drogas (GUERIN *et al*., 2002; GONTIJO e MELO, 2004; MURRAY *et al*., 2005).

Os sintomas clínicos variam de acordo com a espécie de *Leishmania* infectante e se diferenciam em dois tipos patológicos principais: um predominantemente visceral e outro cutâneo (SHERLOCK, 2003).

1.7.1 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A LT é uma doença infecciosa, não contagiosa causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. É uma enfermidade polimórfica da pele e mucosas, que se apesenta em três formas clínicas. A forma cutânea simples é caracterizada pela presença de lesões ulcerosas indolores com formato arredondado ou ovalado, bordas bem delimitadas e elevadas. A do tipo difusa (anérgica) manifesta-se por múltiplas lesões nodulares não ulceradas recobrindo grandes extensões cutâneas. E, as lesões mucocutâneas que podem causar sérias deformidades afetam a mucosa nasobucofaringeana após infecção cutânea inicial (MURRAY *et al*., 2005; BRASIL, 2010).

Na década de 80 era assinalada em 19 Estados brasileiros. Sua expansão geográfica tornou-se evidente, quando, no ano de 2003, foram confirmados casos autóctones em todos os Estados (BRASIL, 2010).

Ocorre primariamente em focos silvestres, em ambientes naturais, onde há circulação do parasita entre animais silvestres e os insetos transmissores (PROENÇA e MULLER, 1979).

Dentre as espécies de *Leishmania* que atuam na etiologia da LT, *Le*. (*Vi*.) *braziliensis* é a que apresenta maior complexidade em sua epidemiologia. São várias espécies vetoras envolvidas, vários reservatórios silvestres e domésticos, tendo sido detectada em cães, equídeos e roedores sinantrópicos (FALQUETO *et al*., 1986; AGUILAR *et al*., 1987; PIRMEZ *et al*., 1988; YOSHIDA *et al*., 1990; MARZOCHI, 1992; BRANDÃO-FILHO *et al*., 2003).

Entre os vetores de LT no Brasil, no Estado do Paraná, as espécies *Nyssomyia whitmani, Migonemyia migonei, Pintomyia pessoai, Nyssomyia neivai* e *Pintomyia fischeri* têm sido as mais frequentes em abrigos de animais domésticos, nas matas e no domicílio (MEMBRIVE *et al*., 2004; TEODORO *et al*., 2006).

Nyssomyia whitmani é uma das principais espécies vetoras de *Le*. (*Vi*.) *braziliensis* no Brasil (RANGEL e LAINSON, 2003). Levantamentos da fauna flebotomínea realizados em algumas áreas de Mato Grosso do Sul têm mostrado que é uma espécie abundante no Estado, fato que coincide com achados de sua infecção por flagelados em área com a presença de casos humanos atribuídos a *Le*. (*Vi*.) *braziliensis* (GALATI *et al*.,1996). Essa espécie é apontada como provável transmissora desse agente no município de Corguinho (GALATI *et al*.,1996). Faz-se também presente em áreas rurais da Serra da Bodoquena (GALATI *et al*., 2006); no Pantanal sul-mato-grossense (BRAGA-MIRANDA, MIRANDA, GALATI, 2006), no município de Antônio João, fronteira com o Paraguai (NASCIMENTO *et al*., 2007), na área urbana de Campo Grande (OLIVEIRA *et al*., 2006) e de Bonito (NUNES *et al*., 2008; ANDRADE *et al*., 2009). Em Bela Vista, MS a LT humana está relacionada com a infecção por *Le*. (*Le*.) *amazonensis* (DORVAL *et al*., 2006).

No Mato Grosso do Sul, no período de 2007 a 2011, do total de 361 casos novos autóctones de LT notificados, duzentos e setenta e três (75,6%) foram no sexo masculino e oitenta e oito (24,4%) no sexo feminino, o que aponta para um caráter de transmissão ocupacional. No mesmo período, duzentos e noventa (80,3%) casos da doença foram da forma cutânea e setenta e um (19,7%) da forma mucosa. No período de janeiro a junho de 2012, 38 novos casos autóctones de LT foram notificados em MS, no município de Dourados de 2007 a 2011 foram notificados quatro casos da doença (SINAN, 2012).

1.7.2 Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, caracterizada por febre prolongada, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, emagrecimento e debilidade progressiva (MURRAY *et al.*, 2005).

Dos casos de LV que ocorrem nas Américas, a maioria são registrados no Brasil e em especial na Região Nordeste (BRASIL, 2006; WHO, 2011). A sua importância não reside somente na alta incidência de casos e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada à má nutrição e infecções concomitantes, como a infecção pelo vírus HIV (GONTIJO e MELO, 2004; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006).

A LV apresenta-se amplamente distribuída com notificações da doença em quase todos os Estados. Entre os anos de 2000 e 2008 os maiores números de casos foram registrados no Estado do Maranhão com 5.138 casos, seguido por Minas Gerais 3.406, Ceará 3.346 e Pará 2.685 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

De acordo com o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (2012), em Mato Grosso do Sul, de janeiro de 1999 até dezembro de 2011 foram notificados e confirmados 2.526 casos humanos de LV, com registro de 220 óbitos. No município de Dourados até 2011, não existiam registros de casos humanos da doença; porém, de 2003 a 2011 foram notificados 5.320 casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (DOURADOS, 2011).

Em 2012, de janeiro a junho foram notificados e confirmados 152 casos humanos de LV em 22 municípios do Estado de Mato Grosso do Sul e houve o primeiro registro de caso humano em Dourados (SINAN, 2012).

1.8 Infecção Natural e Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR –)

A taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e a identificação específica de *Leishmania* em uma determinada espécie de flebotomíneo são de grande importância na epidemiologia das leishmanioses (MICHALSKY *et al.*, 2002; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2006).

O encontro de protozoários no tubo digestivo de flebotomíneos tem sido frequentemente relatado, a natureza dessas infecções por *Leishmania* pode ser determinada pela realização de técnicas de isolamento e inoculações experimentais (MICHALSKY *et al*., 2002) ou PCR.

O encontro de flagelados na dissecação de flebotomíneos seguido de PCR pode resultar na identificação da espécie do parasita (NEITZKE *et al*., 2008), pois esta é uma técnica altamente sensível e específica, podendo detectar o DNA ou RNA do parasita nos insetos (MICHALSKY *et al*., 2002; PAIVA *et al*., 2004, 2007). Esta técnica também pode identificar o parasita proveniente de material humano (SILVA *et al*., 2004) e caninos (LACHAUD *et al*., 2002; SHALLIG e OSKAM, 2002).

A técnica da PCR é capaz de detectar a presença de *Leishmania* a partir de um único indivíduo (PITA-PEREIRA *et al.*, 2005).

O Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP –) é uma técnica utilizada para a identificação de espécies de *Leishmania*. As enzimas de restrição reconhecem sequencias específicas no DNA produzindo fragmentos de comprimentos definidos que podem ser visualizados através de eletroforese em gel de agarose separando os fragmentos de acordo com o seu tamanho molecular e tem sido utilizado para a identificação (BOTSTEIN *et al*.,1980).

Utilizando análise molecular Santos *et al.* (2011) na aldeia indígena Jaguapiru em Dourados, encontraram infecção por *Leishmania* sp. em sete espécies de flebotomíneos: *Ny. whitmani*, *Pi. pessoai*, *Pa. shannoni*, *Pa. punctigeniculata*, *Ev. cortelezzii*, *Pi. christenseni* e *Br. galindoi*. Canesin, (2011) registrou em peridomicílio, infecção em *Ny. whitmani*, *Pa. shannoni* e *Lu. longipalpis*.

2 JUSTIFICATIVA

A manutenção de uma endemia metaxênica em determinada área depende da presença de populações de espécies envolvidas em sua cadeia de transmissão (agentes etiológicos, reservatórios e vetores) e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (XIMENES *et al*., 2007).

Estudos realizados em Dourados, MS de 2003 a 2011, mostraram expressiva diversidade de espécies de flebotomíneos, a presença de *Lu. longipalpis*, vetor do agente da LV, e de espécies implicadas na transmissão de agentes de LT: *Bi. flaviscutellata*, *Ny. antunesi*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. pessoai* (DOURADOS, 2009; SANTOS, 2010; FERNANDES *et al*., 2011; CANESIN, 2011) e a ocorrência de casos autóctones de LT e LV e LVC (SINAN, 2012) aliados ao fato de que no processo de expansão da cidade, conjuntos habitacionais e residenciais alto padrão foram construídos cada vez mais próximos a fragmentos de mata, redutos de possíveis reservatórios de *Leishmania* sp., justificam estudos sobre flebotomíneos em matas de sua área urbana e a identificação das espécies de *Leishmania* que podem transmitir.

Segundo Fonteles *et al.* (2009), a realização de levantamento de fauna flebotomínea em ecossistemas naturais é importante para ampliar o conhecimento das áreas de ocorrência desses insetos, subsidiar projetos conservacionistas e reduzir o contato deles com o homem. Além disso, a compreensão da dinâmica populacional desses dípteros pode se revelar um fator importante para a implantação de políticas de vigilância epidemiológica das doenças cujos agentes são transmitidos por eles, e de manejo florestal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar a fauna flebotomínea e alguns de seus aspectos comportamentais em fragmentos de mata em área urbana de Dourados e investigar a infecção natural por *Leishmania* sp.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a riqueza de espécies de flebotomíneos;
- ✓ Estimar a abundância relativa das populações, a diversidade das espécies segundo os ambientes amostrados e a distribuição mensal das espécies;
- ✓ Investigar em fêmeas de flebotomíneos a infecção natural por flagelados; e
- ✓ Identificar as espécies de *Leishmania* encontradas nas fêmeas de flebotomíneos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Dourados está localizado a 22º13’16”S, 54º48’20”W, no Cone Sul do Estado de Mato Grosso do Sul, Centro-Oeste do Brasil. O relevo é plano com suaves ondulações, estando em uma altitude média de 430m. As matas são fragmentos de mata Atlântica. O clima no verão é tropical úmido e no inverno tropical seco. O tipo de solo é o latossolo vermelho distroférico e distrófico, com alto potencial para atividade agrícola. A área total do município é de 4.086,38 Km^2, a área urbana ocupa 857,40 Km^2, com nove distritos e a área rural indígena, 35,33 Km^2 (IBGE, 2012).

4.2 Locais de captura de flebotomíneos

Os pontos de captura foram distribuídos em 10 fragmentos de mata, localizados na área urbana (Figura 1):

Mata 1 - M1 (Guaicurus) - 22º15’23.7” S; 54º45’11.2” W. O ponto localiza-se próximo ao bairro Parque das Nações II (Figura 2);

Mata 2 - M2 (Irmãos Maristas) - 22º13’59.4” S; 54º46’02.0” W. Ponto próximo ao bairro João Paulo II, propriedade do Recanto Maristas, onde se localiza uma escola (Figura 3);

Mata 3 - M3 (Horto Florestal) - 22º15’13.6” S; 54º47’34.2” W. Ponto próximo ao bairro Canaã III; é parte do Horto Florestal (Figura 4);

Mata 4 - M4 (Vila Almeida) - 22º14’35.0” S; 54º49’44.4” W. Ponto próximo ao bairro Vila Almeida; próximo à mata está sendo pavimentada uma estrada (Figura 4);

Mata 5 - M5 (Novo Horizonte) - 22º14’00.9” S 54º50’26.2” W. Ponto próximo ao bairro Novo Horizonte, é rodeado por residências e recentemente foi construído um conjunto habitacional com casas a menos de 20m de distância da mata (Figura 5);

Mata 6 - M6 (Caiuás) - 22º11’55.5” S; 54º47”44.3” W. Ponto próximo ao bairro Chácara Caiuás; muito próximo a reserva indígena Jaguapiru (Figura 6);

Mata 7 - M7 (Monte Alegre) - 22º11’34.6” S 54º49’39.1” W. Ponto próximo ao bairro Jardim Monte Alegre; próximo à mata estão sendo construídos residenciais de

alto padrão, e recentemente foi realizada pavimentação asfáltica para construção do anel viário (Figura 6);

Mata 8 - M8 (Flora) - 22º12’37.6” S; 54º49’25.6” W. Ponto próximo ao bairro Chácara Flora (Figura 7);

Mata 9 - M9 (Mosteiro) - 22º12’22.7” S; 54º50’03.6” W. Ponto próximo ao bairro Parque Alvorada, pertence ao Mosteiro Santa Maria dos Anjos – Irmãs Clarissas (Figura 7);

Mata 10 - M10 (Primaveras) - 22º13’25.7” S; 54º51’09.5” W. Ponto próximo ao bairro Jardim das Primaveras; há alguns anos, foi construído um conjunto habitacional muito próximo à mata, com casas a menos de 50m de distância de sua borda (Figura 8).

Figura 1- Pontos de captura de flebotomíneos, ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, MS, Brasil. Fonte: Imagens de satélite CBERS 2B, INPE; sensor HCR, de 07 de janeiro de 2009 e sensor CCD, de 21 de abril de 2009.

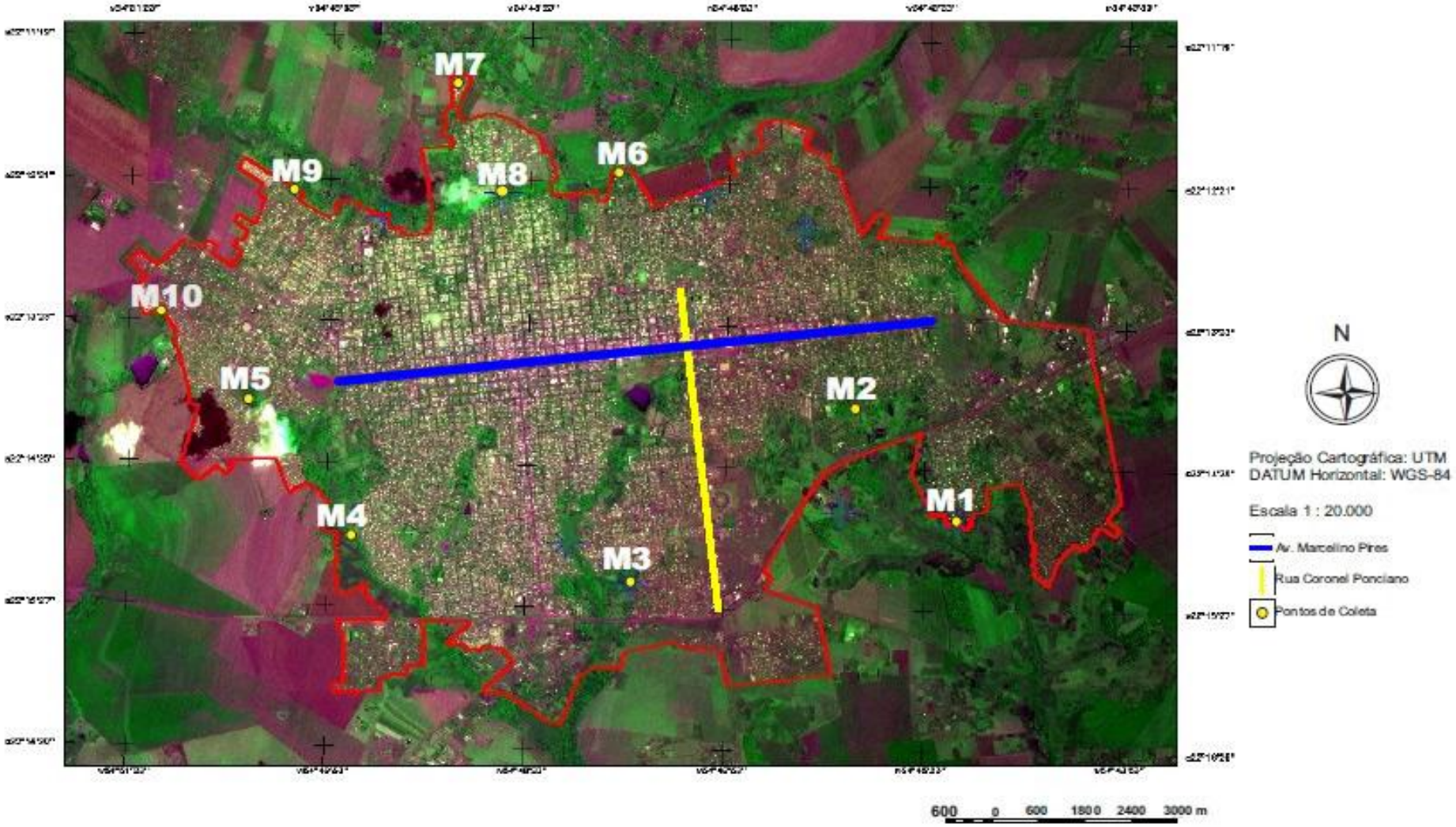

Figura 2- A- aspectos da Mata Guaicurus (M1), **B**- armadilha (CDC) copa e **C**- armadilha (CDC) solo, Dourados, MS, 2011.

Figura 3- A- aspectos da Mata Irmãos Maristas (M2), **B**- armadilha (CDC) copa e **C**- armadilha (CDC) solo, Dourados, MS, 2011.

Figura 4- Aspectos das Matas, **A** e **B** Horto Florestal (M3) e **C** e **D** Vila Almeida (M4), Dourados, MS, 2011.

Figura 5- Aspectos da Mata do Novo Horizonte (M5), Dourados, MS, 2011.

Figura 6- Aspectos das Matas, **A** e **B** Chácara Caiuás (M6), **C**- Jardim Monte Alegre (M7), Dourados, MS, 2011.

Figura 7- Aspectos das Matas, **A** e **B** Chácara Flora (M8), **C** e **D** Mosteiro Irmãs Clarissas (M9), Dourados, MS, 2011.

Figura 8- Aspectos da Mata Jardim das Primaveras (M10), Dourados, MS, 2011.

4.3 Captura de flebotomíneos

O levantamento da fauna flebotomínea foi realizado no período de novembro de 2010 a outubro de 2011. Em virtude da distância entre as matas, cinco delas foram amostradas numa noite e as outras, na noite seguinte.

Os espécimes de flebotomíneos foram capturados com armadilhas automáticas luminosas, tipo CDC (NATAL *et al.*, 1991). Em cada mata foram instaladas duas armadilhas, uma no solo e outra na copa, totalizando 20 armadilhas. As armadilhas foram instaladas no interior da mata (em média 50m da borda) às 18h e retiradas às 7h do dia seguinte, em média, a 1m de altura (nível de solo) e a 4m de altura (nível de copa), uma vez ao mês, sem obedecer ao horário de verão.

O material capturado foi triado, dissecado e identificado no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/FCBA na Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD, e submetido a exame para verificação e identificação de *Leishmania*, pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR –) no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS.

4.4 Dissecação e identificação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram separados por sexo. Os machos foram submetidos ao processo de clarificação e diafanização em hidróxido de potassa a 10% segundo técnica descrita por Forattini (1973), para posterior identificação.

As fêmeas foram dissecadas segundo procedimento utilizado por Johnson, Mcconnell, Hertig (1963) e Lainson (1997) como a seguir: colocou-se duas gotas de solução salina sobre lâmina esterilizada; em uma delas colocou-se a fêmea, que sob microscópio estereoscópico e com auxílio de dois estiletes foi dissecada. Com um estilete o tórax foi fixado na lâmina e com o outro se separou os segmentos terminais do abdômen, na altura do 8° tergito. A seguir, com movimento de tração, as espermatecas e todo o tubo digestivo foram expostos. O restante do corpo foi transferido para outra gota. A gota contendo o tubo digestivo e a parte terminal do abdômen foi coberta com lamínula e examinada sob microscópio óptico, em aumento de 400X, à procura de protozoários flagelados no tubo digestivo e identificação específica do flebotomíneo, por meio das espermatecas. Quando necessário foram observadas estruturas nas antenas e cibário para auxiliar na identificação da espécie de flebotomíneo.

As fêmeas dissecadas e identificadas foram acondicionadas em *pools* de no máximo 10 indivíduos por espécie, considerando-se a data e ecótopo, em tubos cônicos de polietileno (1,5mL) com álcool isopropílico e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento do exame para diagnóstico da espécie de *Leishmania* por meio da reação em cadeia da polimerase.

A nomenclatura adotada para identificação das espécies de flebotomíneos seguiu a proposta de Galati (2003) e a abreviação dos gêneros Marcondes (2007).

4.5 Reação em cadeia da polimerase em flebotomíneos

4.5.1 Extração do DNA de *Leishmania*

As extrações foram realizadas com flebotomíneos individualmente ou em *pools* de até 10 insetos da mesma espécie, data e ponto de coleta por tubo. Os espécimes, após a identificação, foram triturados com auxílio de pistilo plástico em tubos de 1,5 mL em 300 µL da solução de resina Chelex® Molecular Biology Grade

Resin (Bio-Rad Laboratories) a 5%. A solução foi misturada com ajuda de *vortex* por 15s e posteriormente centrifugada por 20s a 13000 rpm. Foi deixada então em banho-maria a 80ºC por 30 min e após este tempo o procedimento foi repetido. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo cônico de polietileno, devidamente esterilizado, e depois congelado a – 20ºC por um mês. (LOXDALE e LUSHAI, 1998)

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR –)

A PCR foi realizada tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de 350 a 360 bp de *Leishmania*. Para um volume final de 25µL de reação foi adicionado 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega) e 5,5µL de água (milli Q autoclavada); e 1µL de cada oligonucleotídeo LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') e 5 µL de amostra, segundo El Tai *et al.* (2000).

As condições de amplificação foram: 95ºC por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 53ºC por 30 segundos, 72ºC por 1 minuto, com pós-extensão a 72ºC por 5 minutos, em termociclador (BIOER XP Cycler). Como controle negativo foi utilizado uma reação com água e como controle positivo DNA extraído de cão positivo para *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi*. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% tendo como marcador inicial 100pb e corados com gel red® e visualizados sob luz ultravioleta. Para tanto, 8µL dos produtos amplificados foram homogeneizados com 2µL de solução de azul de bromofenol (blue /orange 6x Looding Dye) e 3µL de gel red® e submetidos a corrida eletroforética a 100 volts, por 1h40min. em tampão tris-acetato de EDTA (TAE) 1x. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300nm.

4.5.3 PCR-RFLP

Os produtos das PCR foram submetidos à digestão com enzima de restrição HAE III (isolada de *Haemophilus aegyptius*), que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG▼CC....3'

3'....CC▲GG....5'

4.5.3.1 Incubação com HAE III

De acordo com o fabricante, foi adicionado 2μL de buffer 10x, uma unidade (0,5μL) de enzima Hae III, 5μL de DNA da PCR, completando-se o volume de 12,3μL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C por três horas. Após este período, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE por três horas.

A enzima HAE III é capaz de clivar o DNA de *Leishmania* em bandas com 120, 80 e 40 bp, possibilitando a identificação da espécie *Le.* (*Le*.) *infantum chagasi,* conforme descrito por Schönian *et al*. (2003).

4.6 Análise Populacional

Para analisar a abundância das espécies considerando-se todos os fragmentos de matas amostrados foi utilizado o índice de abundância de espécies padronizado (IAEP), segundo Roberts e Hsi (1979).

$$\mathbf{IAE = \frac{a + RJ}{K}}$$

Onde:

a= número de fragmentos de mata onde se fez coletas em que a espécie esteve ausente x C

C = maior valor obtido no ‘ranking’ das espécies, segundo suas frequências em cada fragmento, considerando todos os fragmentos + 1.

RJ = somatória das posições no ‘ranking’ de cada espécie

K = número de fragmentos de captura

Convertendo-se os valores obtidos em IAE em uma escala entre zero e 1 obtém-se o índice de abundância de espécies padronizado (IAEP). Neste índice, o valor 1 ou mais próximo de 1 corresponde à espécie mais abundante e o mais próximo de zero a menos abundante. A fórmula para o cálculo de IAEP:

$$\mathbf{IAEP = \frac{C - IAE}{C - 1}}$$

Média aritmética e Média geométrica de Williams (HADDOW, 1960). Ambas utilizadas para analisar a variação sazonal. Para se obter a média geométrica de Williams, para cada valor das coletas mensais acresce-se o valor 1. Com estes dados a média geométrica é calculada. Do valor obtido, subtrai-se 1. Quando o número de insetos capturados for aproximadamente regular as duas médias coincidem, quando houver muita variância no número de insetos capturados as médias se distanciam, a média aritmética tende a ser maior do que a geométrica de Williams. Através da média geométrica de Williams é possível saber realmente qual é o período de maior frequência e regularidade. Ela elimina o efeito explosão da frequência e mostra de fato a estação em que ela poderia oferecer maior risco para a transmissão dada a sua frequência mais elevada e constante.

A taxa mínima (TM) de infecção de flebotomíneos, por estarem acondicionados em *pools* de 10, foi calculada com a seguinte fórmula (PAIVA *et al.*, 2004, 2006, 2007, 2010; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2006):

$$\textbf{TM} = \frac{\textbf{Nº de grupos positivos X 100}}{\textbf{Nº total de fêmeas}}$$

5 RESULTADOS

5.1 Fauna flebotomínea

Foram capturados 589 espécimes de flebotomíneos, 305 (51,8%) machos e 284 (48,2%) fêmeas. Razão macho/fêmea total de 1,07:1.

A fauna flebotomínea constituiu-se de 18 espécies: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia cunhai*, *Brumptomyia galindoi*, *Brumptomyia pintoi* (Costa Lima, 1932), *Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Micropygomyia acanthopharynx* (Martins, Falcão e Silva, 1962), *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia aragaoi*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia shannoni*, *Pintomyia christenseni*, *Pintomyia misionensis* (Castro, 1959), *Pintomyia pessoai* e *Sciopemyia sordellii*.

A subtribo que contribuiu com o maior número de espécies foi Lutzomyiina com 09 espécies (*Ev*. *cortelezzii*, *Ev*. *lenti*, *Ev*. *termitophila*, *Lu*. *longipalpis*, *Mg*. *migonei*, *Pi*. *christenseni*, *Pi*. *misionensis*, *Pi*. *pessoai* e *Sc*. *sordellii*), seguida de Brumptomyiina (*Br*. *brumpti*, *Br*. *cunhai*, *Br*. *galindoi* e *Br*. *pintoi*) e Psychodopygina (*Ny*. *whitmani*, *Pa*. *aragaoi*, *Pa*. *campograndensis* e *Pa*. *shannoni*) com 04 espécies cada uma e Sergentomyiina (*Mi*. *acanthopharynx*) com uma espécie. Destas subtribos, Psychodopygina contribuiu com a grande maioria de espécimes, num total de 326 (55,3%).

A maior diversidade ocorreu na mata (M7) Jardim Monte Alegre (14) seguida pela mata (M6) Chácara Caiuás (10), mata (M1) Jardim Guaicurus e a mata (M2) Irmãos Maristas (9) (Figura 1 e Tabela 1).

Micropygomyia acanthopharynx, *Pi*. *pessoai* e *Br*. *pintoi* espécies registradas pela primeira vez na cidade de Dourados.

Tabela 1- Número absoluto, índice de abundância de espécies padronizado (IAEP) e frequência de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

	Matas																																											
	Guaicurus				I. Maristas				Horto Florestal				V. Almeida				N. Horizonte				Caiuás				Monte Alegre				Flora				Mosteiro				Primaveras							
Ecótopos	solo		copa		solo		copa		solo		copa		solo		copa		solo		copa		solo		copa		solo		copa		solo		copa		solo		Copa		solo		copa		Total Geral			
Espécies sexo	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	%♂	%♀	IAEP	P
Br. brumpti	2	-	2	6	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	2	4	13	13	5	6	-	6	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	9,5	13,0	0,67	2ª
Br. cunhai	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1,1	0,06	14ª
Br. galindoi	4	2	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	2	-	6	7	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	4,9	6,7	0,36	7ª
Br. pintoi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	0,7	0,0	0,08	13ª
Ev. cortelezzii	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1,1	0,20	9ª
Ev. lenti	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	0,7	0,7	0,14	12ª
Ev. termitophila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,0	1,4	0,18	11ª
Lu. longipalpis	-	-	-	-	4	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	1,1	0,21	8ª
Mg. migonei	-	1	7	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	6	19	20	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,8	12,7	0,19	10ª
Mi. acanthopharynx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,0	0,03	16ª
Ny. whitmani	1	1	6	13	1	2	-	-	5	4	20	10	1	-	-	-	-	-	-	-	25	10	78	38	-	4	4	3	-	-	1	-	4	1	1	2	-	-	-	-	48,2	31,0	0,71	1ª
Pa. aragaoi	2	1	1	1	2	1	-	-	2	5	1	2	-	-	-	-	1	2	-	10	1	-	1	2	3	7	-	1	-	-	-	-	1	2	1	-	2	12	-	1	5,9	16,5	0,67	2ª
Pa. campograndensis	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	1,6	2,5	0,42	5ª
Pa. shannoni	-	-	2	1	-	1	1	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3,0	1,8	0,44	4ª
Pi. christenseni	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	1	-	1	-	2	-	4	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	0,0	5,6	0,38	6ª
Pi. misionensis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,4	0,04	15ª
Pi. pessoai	-	-	3	-	2	3	-	-	5	1	4	2	10	1	1	-	-	-	-	-	2	-	3	3	1	1	4	1	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	12,5	4,2	0,56	3ª
Sc. sordelli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	0,4	0,01	17ª
Subtotal	10	5	23	38	10	10	1	2	12	11	26	15	14	8	3	3	3	4	0	12	37	21	122	87	11	29	12	15	1	0	1	0	7	5	5	4	6	13	1	2	-	-	-	-
Total	76				23				64				28				19				267				67				2				21				22				-	-	-	-
Total Geral	589																																											

P= Posição no ranking, %♂= Frequência machos, %♀= Frequência fêmeas, *Br*.= *Brumptomyia*, *Ev*.= *Evandromyia*, *Lu*.= *Lutzomyia*, *Mg*.= *Migonemyia*, *Mi*.= *Micropygomyia*, *Ny*.= *Nyssomyia*, *Pa*.= *Psathyromyia*, *Pi*.= *Pintomyia*, *Sc*.= *Sciopemyia*

Tabela 2- Distribuição mensal das espécies de flebotomíneos capturados em ambiente de mata e frequência relativa, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Espécies	Ano												Geral	
	2010		2011											
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	Total	%
Br. brumpti	19	5	11	5	7	7	2	2	-	-	2	6	66	11,2
Br. cunhai	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0,8
Br. galindoi	23	4	1	-	-	1	1	1	-	-	1	2	34	5,8
Br. pintoi	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	2	0,3
Ev. cortelezzii	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	5	0,8
Ev. lenti	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	4	0,7
Ev. termitophila	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-	4	0,7
Lu. longipalpis	-	-	1	-	-	-	5	-	-	1	-	-	7	1,2
Mg. migonei	8	3	4	18	-	10	1	-	-	6	7	9	66	11,2
Mi. acanthopharynx	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,2
Ny. whitmani	17	1	10	10	8	34	21	21	3	26	63	21	235	39,9
Pa. aragaoi	21	7	14	1	2	6	5	2	1	1	2	3	65	11,0
Pa. campograndensis	1	-	5	-	-	-	2	-	1	-	1	2	12	2,0
Pa. shannoni	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	4	6	14	2,4
Pi. christenseni	4	3	1	2	2	-	1	-	-	1	-	2	16	2,7
Pi. misionensis	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2	0,3
Pi. pessoai	4	4	4	2	-	1	2	-	-	4	22	7	50	8,5
Sc. sordellii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0,2
Total	102	30	55	39	20	62	41	28	6	41	105	60	589	100,0

%= Frequência relativa, *Br*.= *Brumptomyia*, *Ev*.= *Evandromyia*, *Lu*.= *Lutzomyia*, *Mg*.= *Migonemyia*, *Mi*.= *Micropygomyia*, *Ny*.= *Nyssomyia*, *Pa*.= *Psathyromyia*, *Pi*.= *Pintomyia*, *Sc*.= *Sciopemyia*

Os maiores números de espécimes foram capturados na mata (M6) Chácara Caiuás (267), seguido pela mata (M1) Jardim Guaicurus (76) e (M7) Jardim Monte Alegre (67) (Tabela 3).

O índice de abundância padronizado (IAEP) das espécies de flebotomíneos capturados nos diversos ecótopos é apresentado na Tabela 1. *Ny. whitmani* foi a mais abundante com 0,71, seguida de *Br*. *brumpti e Pa. aragaoi* com 0,67 e *Pi. pessoai* com 0,56.

Br. *brumpti* foi a espécie melhor distribuída, presente em nove das 10 matas; *Ny. whitmani, Pa. aragaoi e Pa. shannoni* em oito matas, *Pa. campograndensis* e *Pi. pessoai* em sete.

As espécies *Ny. whitmani e Pa. aragaoi* estiveram presentes em todos os meses do estudo; *Pi. pessoai e Mg. migonei* ausentes apenas nos meses de março, junho e julho (Tabela 2).

Dentre os 589 flebotomíneos capturados (Tabela 3), *Ny. whitmani* predominou, seguida por *Br. brumpti*, *Mg. migonei*, *Pa. aragaoi* e *Pi. pessoai*.

Tabela 3- Flebotomíneos capturados em ambiente de mata de acordo com a espécie e ecótopo, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

	Matas										
Espécies	Guaicurus	I. Maristas	Horto Florestal	V. Almeida	N. Horizonte	Caiuás	M. Alegre	Flora	Mosteiro	Primaveras	Total
Br. brumpti	10	1	1	2	1	32	17	1	1	-	66
Br. cunhai	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Br. galindoi	11	-	-	4	-	15	2	-	2	-	34
Br. pintoi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
Ev. cortelezzii	1	-	-	1	1	-	2	-	-	-	5
Ev. lenti	-	1	-	-	-	-	1	-	-	2	4
Ev. termitophila	-	-	-	-	1	-	2	-	-	1	4
Lu. longipalpis	-	5	1	1	-	-	-	-	-	-	7
Mg. migonei	17	-	-	-	-	48	1	-	-	-	66
Mi. acanthopharynx	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Ny. whitmani	21	3	39	1	-	151	11	1	8	-	235
Pa. aragaoi	5	3	10	-	13	4	11	-	4	15	65
Pa. campograndensis	-	2	-	1	1	2	3	-	1	2	12
Pa. shannoni	3	2	1	2	1	3	1	-	1	-	14
Pi. christenseni	-	1	-	4	1	3	6	-	1	-	16
Pi. misionensis	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2
Pi. pessoai	3	5	12	12	-	8	7	-	3	-	50
Sc. sordelli	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Total	76	23	64	28	19	267	67	2	21	22	589

Br.= Brumptomyia, *Ev.= Evandromyia*, *Lu.= Lutzomyia*, *Mg.= Migonemyia*, *Mi.= Micropygomyia*, *Ny.= Nyssomyia*, *Pa.= Psathyromyia*, *Pi.= Pintomyia*, *Sc.= Sciopemyia*

A ocorrência de *Ny. whitmani* associada à estação do ano mostra que embora no inverno (julho\ agosto\ setembro) tenha sido capturado o maior número de espécimes (média de 30,7 insetos), graças a uma coleta que se destacou (63 insetos em setembro), a maior média geométrica de Williams foi obtida no outono (abril\ maio\ junho), indicando que nesta estação a espécie se apresenta com frequências relativamente elevadas e constantes nos três meses (Figura 9 A).

Para *Pi. pessoai* a média aritmética foi maior no inverno, mas foi mais constante na primavera (outubro\ novembro\ dezembro) (Figura 9 B).

Para *Mg. migonei* a média aritmética foi maior no verão (janeiro\ fevereiro\ março), mas a maior média geométrica de Williams indica que é na primavera que essa espécie se mantém constante (Figura 9 C).

A distribuição mensal de *Ny*. *whitmani*, *Mg*. *migonei*, *Pi*. *pessoai* no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, MS, estão plotados na Figura 10.

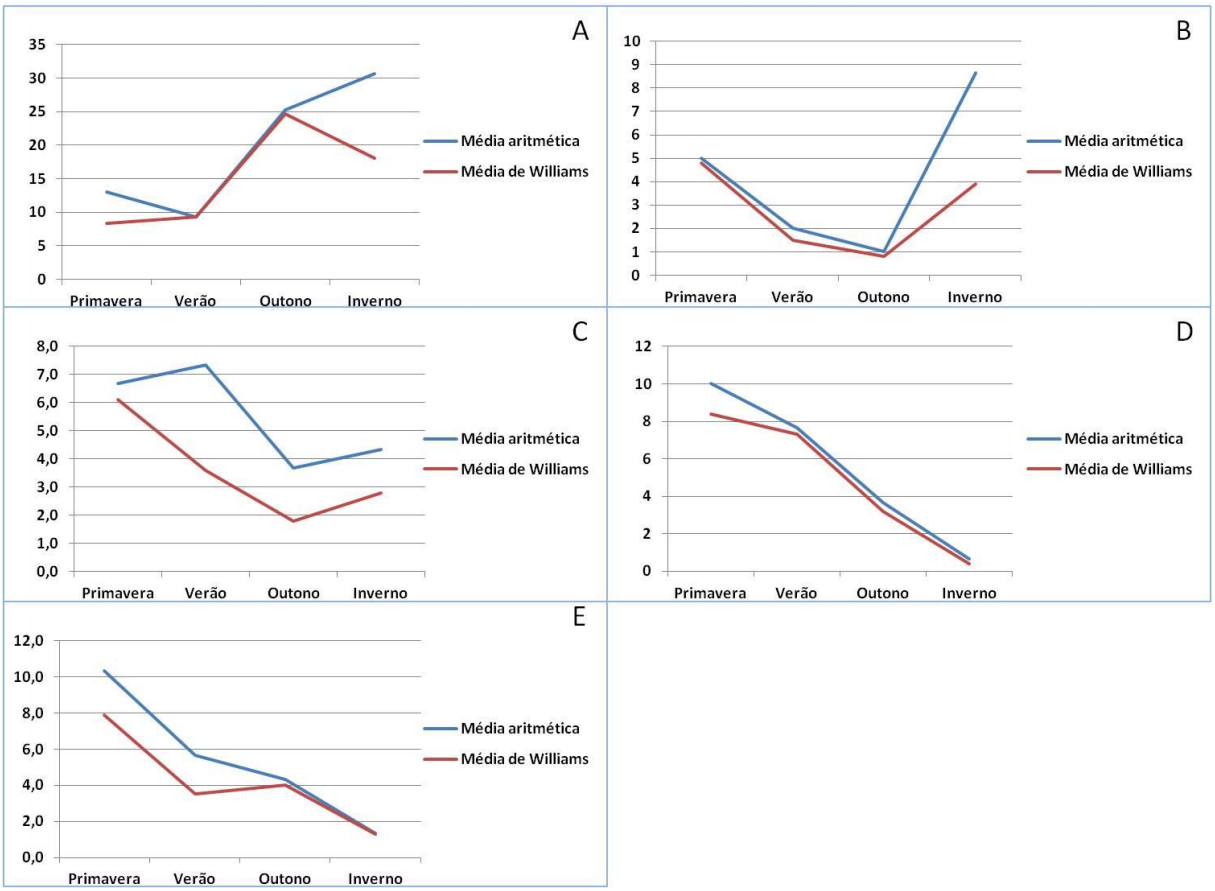

Figura 9- Tendência sazonal em relação à média mensal aritmética e média de Williams, **A**- *Nyssomyia whitmani*, **B**- *Pintomyia pessoai*, **C**- *Migonemyia migonei*, **D**- *Brumptomyia brumpti*, **E**- *Psathyromyia aragaoi* capturados em ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, MS, Brasil.

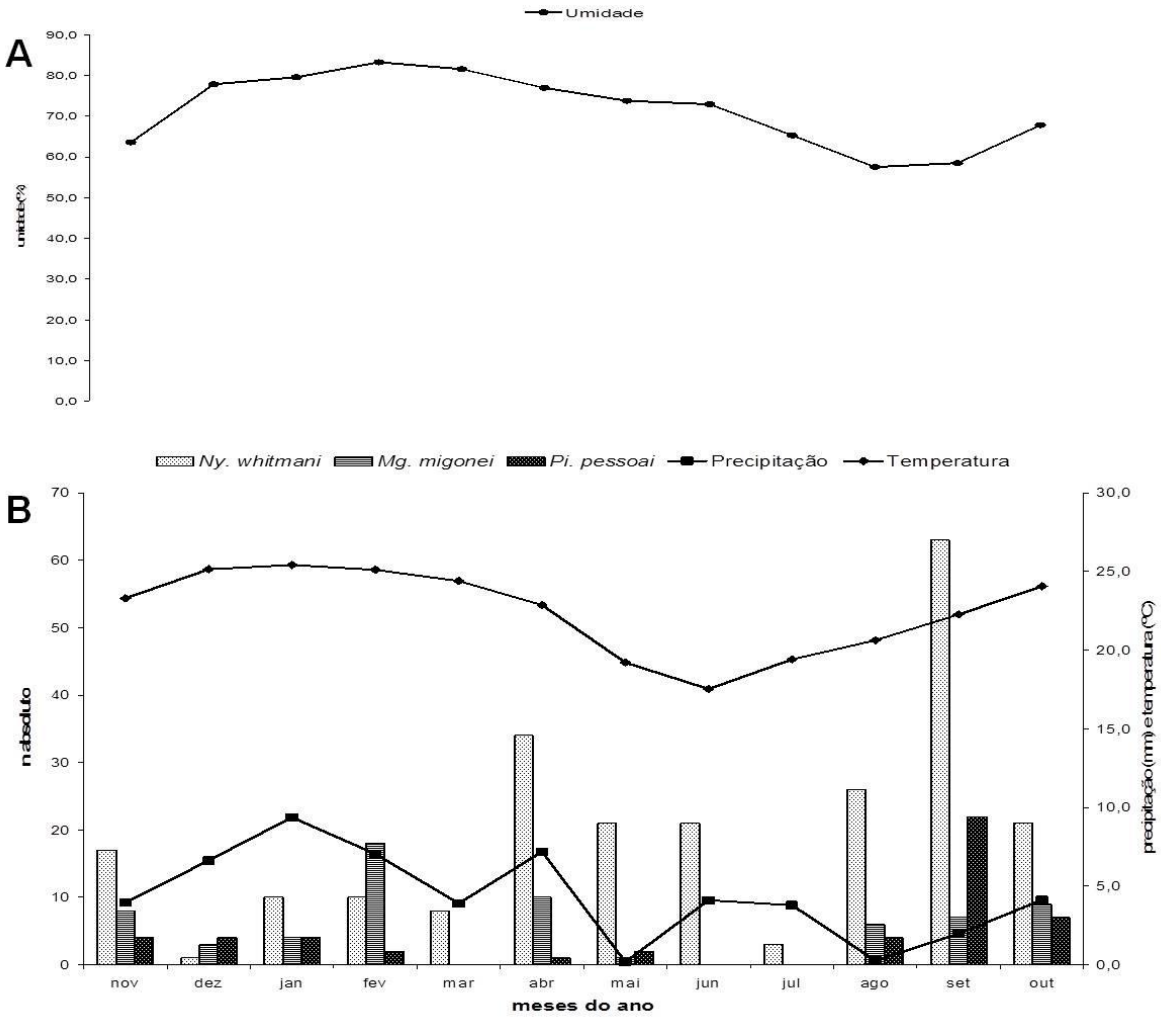

Figura 10- Distribuição mensal das espécies *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei* e *Pintomyia pessoai*. **A**- Médias mensais da umidade relativa do ar (%). **B**- Número total de indivíduos com as médias mensais da precipitação pluviométrica (mm) e temperatura (°C), período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, MS, Brasil.

5.2 Infecção natural

5.2.1 Exame parasitológico

Foi realizado o exame parasitológico em 284 fêmeas de flebotomíneos e não foi possível observar formas flageladas ao microscópio óptico.

5.3 Reação em cadeia da polimerase

Foram analisadas 284 fêmeas de flebotomíneos, distribuídas em 16 espécies: *Br. brumpti* (37), *Br. cunhai* (03), *Br. galindoi* (19), *Ev. cortelezzii* (03), *Ev. lenti* (02), *Ev. termitophila* (04), *Lu. longipalpis* (03), *Mg. migonei* (36), *Ny. whitmani* (88), *Pa. aragaoi* (47), *Pa. campograndensis* (07), *Pa. shannoni* (05), *Pi. christenseni* (16), *Pi. misionensis* (01), *Pi. pessoai* (12), *Sc. sordellii* (01). As fêmeas foram separadas de acordo com a data de captura e o ecótopo em 52 *pools* de 2 a 10 exemplares e 119 individualizadas.

Os resultados de amplificação com PCR revelaram que os oligonucleotídeos LITSR e L5.8S detectaram infecção por *Leishmania* em amostra com uma fêmea de *Ny*. *whitmani*, essa amostra apresentou produtos de amplificação de 350pb a 360pb (Figura 11).

Após a digestão com a enzima HAE III foi possível identificar infecção por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi* em *Ny*. *whitmani* e *Pi*. *pessoai* com 180pb e os fragmentos menores 50pb e 20pb (Figura 12).

As amostras positivas são referentes a um espécime de *Ny. whitmani* capturada no Jardim Monte Alegre (M7) em dezembro de 2010, onde também ocorreu a maior diversidade e um espécime de *Pi*. *pessoai* capturada no João Paulo II - Irmãos Maristas (M2) em agosto de 2011. A taxa mínima de infecção para a espécie *Ny*. *whitmani* foi de 1,13% e *Pi*. *pessoai* de 8,33% (Tabela 4)

Duas outras amostras apresentaram infecção por *Leishmania* sp., negativas para *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi*, mas ainda serão submetidas à análise para outras espécies de *Leishmania*, essas amostras correspondem às espécies *Ny*. *whitmani* e *Mg*. *migonei* capturadas na Chácara Caiuás (M6) em outubro de 2011.

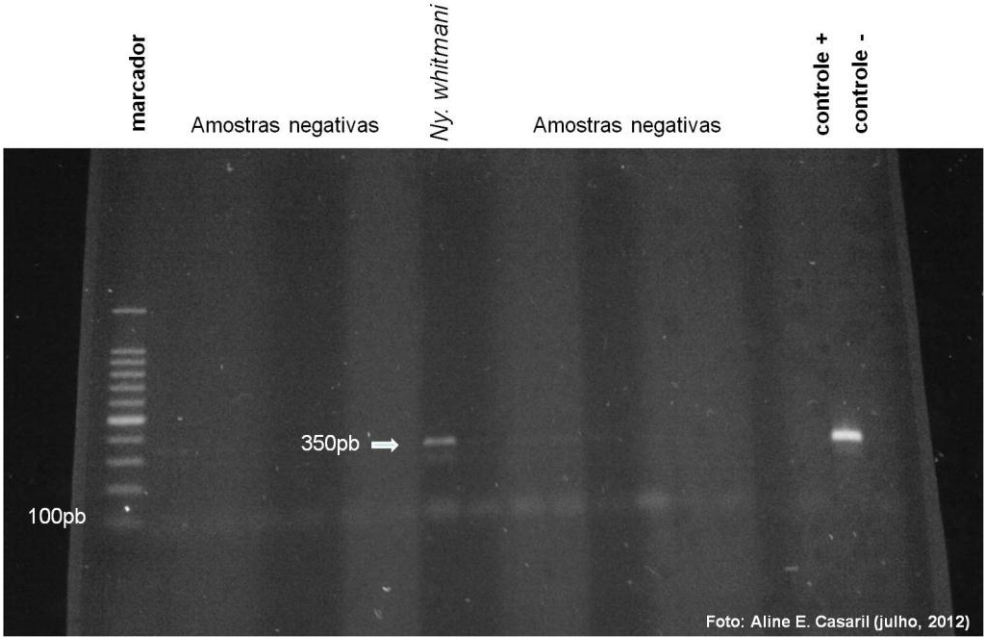

Figura 11- Resultado de amplificação com PCR – oligonucleotídeos LITSR e L5.8S. Amostra 37: infecção por *Leishmania* sp. em amostra de *Nyssomyia whitmani* individualizada.

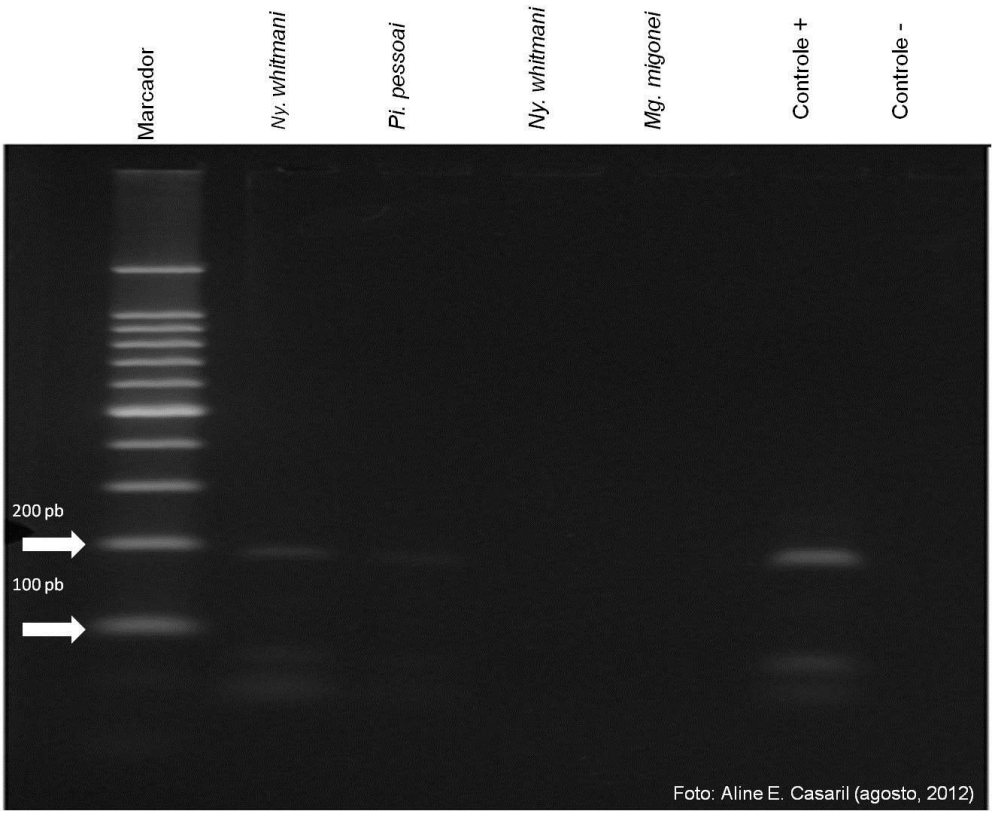

Figura 12- Digestão das regiões amplificadas ITS1 da espécie de *Le. infantum chagasi* com endonuclease de restrição HAE III.

Tabela 4- Taxa mínima de infecção por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi* para as espécies *Ny. whitmani* e *Pi. pessoai* em ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Espécies	Espécimes	*Pools*	Taxa Mínima (%)
Ny. whitmani	88	1	1,13
Pi. pessoai	12	1	8,33

6 DISCUSSÃO

O ano de 2011 foi um ano atípico com fortes chuvas, que quase sempre coincidiam com o período de coleta, o que pode justificar o reduzido número de espécimes capturados, pois a densidade de flebotomíneos é influenciada, dentre outros fatores, pelas alterações climáticas e do microhabitat de seus criadouros (FERRO *et al*., 1997).

A elevação da umidade em decorrência das chuvas tem como consequência a emergência de formas aladas (FORATTINI, 1973). Os dados (Figura 10) mostram que a densidade das espécies *Ny. whitmani*, *Mg. migonei*, *Pi. pessoai* não corresponderam com a elevação da precipitação durante o período de captura; neste período a umidade manteve-se em condições favoráveis para a sobrevivência dos flebotomíneos. Segundo Brazil e Brazil (2003) os flebotomíneos não sobrevivem por muito tempo em condições de umidade abaixo de 50%. A baixa densidade dessas espécies nos meses de dezembro a março pode estar relacionada às chuvas mais intensas que podem ter comprometido as capturas, pode-se inferir que o aumento excessivo da precipitação pode ter comprometido a reprodução dos flebotomíneos, com a lavagem dos criadouros (CARVALHO, 2006).

Embora a utilização apenas de CDC não seja suficiente para identificar a fauna flebotomínea em seus aspectos qualitativo e quantitativo, as capturas mensais possibilitaram evidenciar uma grande diversidade de espécies nas matas residuais da área urbana de Dourados.

Estudos anteriores realizados nessa cidade identificaram um maior número de espécies de flebotomíneos, porém, os locais amostrados incluíram além de matas remanescentes, domicílios e abrigos de animais domésticos (SANTOS, 2010; CANESIN, 2011; FERNANDES *et al*., 2011), o que pode ter influenciado na maior diversidade.

A riqueza de espécies de flebotomíneos em geral foi elevada nas diferentes matas. A maior ocorreu no Jardim Monte Alegre (M7) uma mata relativamente preservada e o maior número de indivíduos capturados na Chácara Caiuás (M6) situada próxima a território indígena. Esta mata, apesar de preservada, mantém uma abertura em seu centro utilizada como estrada por indígenas e moradores do entorno, que ao adentrarem a mata em horários de atividade dos flebotomíneos, encontram-se expostos às picadas desses insetos, com risco de adquirir LT pela

presença de *Ny*. *whitmani* e *Mg*. *migonei*, espécies incriminadas na transmissão de agentes dessa parasitose. O hábito de higiene precária, falta de saneamento básico e a criação de animais no peridomicílio pode favorecer a domiciliação dos insetos. Santos (2010) encontrou espécies envolvidas na tansmissão de agentes das leishmanioses em intra e peridomicílios indígenas. Esta presença de vetores em ambiente domiciliar provavelmente seja facilitada pela fragmentação das matas, localização das moradias próximas às matas e oferta de fonte alimentar às larvas e fêmeas de flebotomíneos, principalmente em função da criação de animais.

*Ny*ssomyia *whitmani* e *Pa*. *aragaoi* estiveram presentes em todos os meses do ano, mesmo em meses com baixas temperaturas, mas a frequência das duas espécies é muito distinta. *Ny*ssomyia *whitmani* esteve presente em 80,0% das matas estudadas, confirmando sua ocorrência frequente em matas residuais alteradas de ambientes urbanos como observado por Teodoro *et al.* (1998) e Oliveira *et al*. (2000). Essa espécie é de importância devido a sua antropofilia, alta densidade e pelo seu encontro naturalmente infectada por formas flageladas (GALATI *et al.*, 1996) e por *Leishmania braziliensis* no Paraná (LUZ *et al*., 2000). Essa espécie se adapta a habitats menos especializados ou mais diversificados, em condições de matas alteradas e capacidade de se adaptar a ambiente antrópico (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; TEODORO *et al*., 1998). Em outros estudos em MS essa espécie foi encontrada no peri e intradomicílio indicando uma possível adaptação a esses ambientes (ANDRADE *et al*., 2009; SANTOS, 2010).

Nesse estudo *Ny. whitmani* foi encontrada infectada por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi*. Essa espécie é considerada a principal vetora de *Le*. (*Vi*.) *braziliensis* em diversas regiões do país, foi incriminada como vetora de *Le.* (*Le.*) *amazonensis* no Nordeste, Sudeste, Centro Oeste e Sul do Brasil, *Le.* (*Vi.*) *shawi* no Norte e de *Le.* (*Vi.*) *guyanensis* na Amazônia (AZEVEDO *et al.*, 1990a; RANGEL e LAINSON, 2003; COSTA *et al.*, 2007). Saraiva *et al*. (2010) relataram pela primeira vez essa espécie infectada por *Le.* (*Le.*) *infantum chagasi* em Belo Horizonte, MG e Canesin (2011) também encontrou essa espécie infectada por *Le.* (*Le.*) *infantum chagasi* em Dourados, MS.

Brumptomyia brumpti presente em quase todos os meses do ano e em 90,0% das matas, confirmando o comportamento selvático do gênero *Brumptomyia*, já observado por outros autores (FORATINI, 1973; GALATI, 1990).

Migonemyia migonei, espécie incriminada na transmissão de agentes de LT, coletada em apenas três matas, esteve bem distribuída durante o ano, mais frequente na copa e foi mais abundante na Chácara Caiuás e Jardim Guaicurus, aparentemente matas mais preservadas. Silva *et al*. (2008) coletaram essa espécie em números elevados em floresta estacional semidecidual que ainda conservam aspectos paisagísticos primitivos. No Estado de São Paulo essa espécie tem papel de vetor secundário de *Leishmania* (CAMARGO NEVES *et al*., 2002). No Paraná, tem sido a segunda ou terceira espécie mais numerosa, inclusive no domicílio (TEODORO *et al*., 1993, MASSAFERA *et al*., 2005). Em estudos realizados no MS, foi registrada em Campo Grande (OLIVERA *et al*., 2003), Bodoquena, Jardim (ALMEIDA *et al*., 2010) e Dourados, onde foi capturada tanto em fragmento de mata quanto na área urbana (SANTOS, 2010; CANESIN, 2011; FERNANDES *et al*., 2011). É uma espécie antropofílica (FORATTINI, 1973; GOMES *et al*., 1989) e foi incriminada como vetor na transmissão de *Le*. (*Vi*.) *braziliensis* em diferentes regiões do Brasil (AZEVEDO *et al*. 1990b; PITA-PEREIRA *et al*., 2005).

Psathyromyia aragaoi esteve distribuída por 80,0% das matas estudadas, sua presença constante e em todos os meses do ano confirma a preferência dessa espécie por ambientes silvestres como já assinalado em outras regiões do Mato Grosso do Sul (OLIVEIRA *et al*., 2003).

Lutzomyia longipalpis foi capturada na mata dos Irmãos Maristas (M2), no Horto Florestal (M3) e na mata da Vila Almeida (M4), e destaca-se por seu papel já comprovado na veiculação de *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi*. Em estudos realizados nas matas dos Irmãos Maristas e no Horto Florestal nos anos de 2004 e 2005 Fernandes *et al.* (2011) não capturaram essa espécie, já no ano de 2008 foi relatada pela primeira vez em Dourados na mata da Vila Almeida, o que ressalta a importância de pesquisas frequentes sobre fauna flebotomínea e infecção por *Leishmania* sp. Apesar da baixa densidade, sua presença em algumas matas remanescentes urbanas representa uma ameaça para a instalação de leishmaniose visceral.

O Horto Florestal situa-se no bairro Canaã III, onde recentemente foi confirmado o primeiro caso de LV humana na cidade de Dourados (SINAN, 2012) e no qual há alguns anos já vinham sendo notificados muitos casos de LVC (DOURADOS, 2011), os quais precedem os casos humanos da doença (BEVILACQUA *et al*., 2001; BRASIL, 2006).

A mata dos Irmãos Maristas localiza-se no bairro João Paulo II, ao lado de uma escola, que utiliza a mesma para realização de trilha com os alunos. Além disso é aberta à visitação pública durante os finais de semana. Além de *Lu*. *longipalpis*, espécie vetora de LV, foram capturadas *Ny*. *whitmani* e *Pi*. *pessoai* espécies incriminadas na transmissão de agentes de LT.

A introdução da LV na cidade é muito preocupante, pois não há controle da circulação de cães possivelmente portadores da doença, principalmente nas proximidades dos bairros João Paulo II, Canaã III e Vila Almeida, onde *Lu*. *longipalpis* foi encontrado.

Micropygomyia acanthopharynx apresentou-se em baixa frequência, com apenas um espécime macho capturado na Chácara Caiuás em armadilha instalada próximo ao solo. Assim como *Sc. sordellii* pertence a grupos que, provavelmente, alimentam-se de animais de sangue frio (GALATI, 1990).

Psathyromyia shannoni esteve presente em praticamente todos os ecótopos, excetuando-se as matas da Chácara Flora e do Jardim das Primaveras. Segundo Galati *et al*. (1996), essa espécie mostrou-se com potencial de importância epidemiológica, pois foi frequente em capturas com armadilha de Shannon e isca humana.

Pintomyia misionensis apresentou-se em baixa frequência, apenas uma fêmea e um macho ambos em armadilha próxima ao solo, essa espécie tem preferência por ambientes silvestres como observado por Silva e Grunewald (1999), que relataram o primeiro encontro dessa espécie com infecção por *Le*. (*Viannia*) sp. no Brasil.

Pintomyia christenseni foi coletado em várias matas, representado apenas por exemplares fêmeas, o que pode gerar confusão com *Pi. mamedei*, que só possui fêmeas na população. Para elucidar a dúvida é necessário a reprodução em laboratório. Santos (2010), utilizando a PCR observou infecção natural por *Leishmania* sp. em exemplar desta espécie de flebotomíneo, capturado em ambiente de mata na aldeia Jaguapiru na cidade de Dourados.

Evandromyia cortelezzii, *Ev. lenti* e *Ev. termitophila* não foram frequentes. *Ev. cortelezzii* já foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* sp. em Dourados, MS (SANTOS, 2010), e por *Leishmania chagasi* em Ponta Porã, MS (ANDRADE *et al*., 2011) e em Minas Gerais (CARVALHO *et al*., 2008) apontando para a possibilidade dessa espécie participar do ciclo de transmissão de *Leishmania*. Mais investigações fazem-se necessárias, uma vez que a competência vetorial de

flebotomíneos é determinada pela aptidão das formas promastigotas sobreviverem, multiplicarem e se diferenciarem no aparelho digestivo e posteriormente serem transmitidas aos hospedeiros vertebrados (PIMENTA *et al*., 2003).

Brumptomyia brumpti, *Br. cunhai*, *Br. galindoi* e *Br. pintoi* segundo Forattini (1973), não representam risco, pois não estão associadas à transmissão de leishmanias ao homem a aos animais. As espécies do gênero *Brumptomyia*, em sua totalidade, sugam o sangue de dasipodídeos (tatus) e são encontradas sempre em tocas desses animais. Santos (2010) encontrou um espécime de *Br. galindoi* positiva para *Leishmania* pela técnica de PCR.

A razão macho/fêmeas das espécies coletadas encontra-se muito próxima de 1/1, com exceção de *Ny. whitmani* e *Pi. pessoai,* podendo ser explicada pela possibilidade dos machos atraídos pelas fêmeas para cópula se apresentarem em maior quantidade, sabendo-se que machos de flebotomíneos formam agregados com o propósito de acasalamento (FELICIANGELI, 1987).

Através de métodos moleculares o encontro de espécies de flebotomíneos positivos para *Leishmania* é cada vez mais comum. Espécies que não são consideradas vetoras também são encontradas infectadas, muitas não são levadas em consideração por possuírem hábitos alimentares que não envolvem o homem, mas se uma espécie é capaz de encontrar novos locais de criadouro e abrigo, na falta da sua fonte alimentar não seriam capazes de se alimentar em outras fontes? Em Dourados, o vetor de *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi* foi capturado em 2008 apesar de muitos levantamentos previamente realizados e até 2011 não foram registrados casos de LV humano, mas muitos casos de LVC foram diagnosticados, levantando a hipótese de que outras espécies poderiam estar atuando como vetores. A espécie *Ny*. *whitmani* foi a espécie mais abundante nos fragmentos de mata e encontrada com infecção por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi*. Canesin (2011) também capturou essa espécie em abundância no peridomicílio e com infecção por *Le*. (*Le*.) *infantum chagasi*. Para elucidar se *Ny*. *whitmani* ou outras espécies são capazes de transmitir o parasita é necessária a realização de capacidade vetorial.

A presença de *Ny. whitmani*, *Mg. migonei*, *Pi. pessoai* e *Lu. longipalpis* é motivo de alerta para a possibilidade de surtos de LV e LT nos bairros Jardim Guaicurus, João Paulo II, Canaã III, Vila Almeida, Chácara Caiuás, Jardim Monte Alegre, Chácara Flora, Parque Alvorada e outros próximos às matas estudadas.

A leishmaniose na área urbana é uma manifestação do lugar, resultado de situações ambientais, sociais e principalmente estruturais em que a cidade se desenvolveu. A falta de planejamento urbano e informação da população pode promover condições para infecções por *Leishmania* sp. nos bairros próximos as matas estudadas (PIGNATTI, 2004; ALHO, 2012).

Não é possível criar barreiras evitando que os flebotomíneos transitem entre os fragmentos de mata e as residências, mas é possível reduzir o contato do homem e de seus animais domésticos com o habitat natural desses insetos, através de barreiras fisicas e educação ambiental, enfatizando o poder de atração que a criação de porcos e galinhas na área urbana exerce sobre os flebotomíneos, aliado aos métodos de higiene precários que favorecem a instalação do ciclo das leishmanioses no peridomicílio.

Depois de estabelecido o ciclo na área urbana, a falta de controle de cães possivelmente infectados e principalmente de animais sinantrópicos, a doença caracterizada como exclusiva da zona rural e de população pobre, passa a não ter barreiras entre as classes sociais, acometendo ricos e pobres.

A identificação dos lugares de risco e a relação desses lugares com a região, bem como a relação com a população, devem servir como alerta para possíveis surtos nas áreas onde os vetores foram encontrados.

A questão ambiental está totalmente ligada à etiologia da doença e deveriam fazer parte das reflexões sobre a necessidade de incorporação dos estudos das áreas de preservação e conservação ambiental com as Políticas Ambientais (PIGNATTI, 2004).

Considerando a importância dos flebotomíneos e a localização das matas remanescentes nas proximidades das residências, é aconselhável manter contínua vigilância na zona de entorno das matas estudadas. Segundo Fonteles *et al*. (2009), o conhecimento das áreas de ocorrência desses insetos, é importante para subsidiar projetos conservacionistas e reduzir o contato deles com o homem, logo, conhecendo-se os fragmentos de mata onde ocorrem espécies envolvidas na transmissão de agentes das leishmanioses, e a presença do agente etiológico, é possível alertar os órgãos competentes em saúde pública para criação de políticas de manejo florestal e vigilância epidemiológica dessas doenças.

7 CONCLUSÕES

A fauna flebotominea de fragmentos de mata da área urbana de Dourados, MS constituiu-se de 18 espécies. A mata do Jardim Monte Alegre apresentou a maior riqueza de espécies.

Nyssomia whitmani foi a espécie mais abundante e frequente.

Constatou-se a presença de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* agente etiológico da leishmaniose visceral em *Nyssomyia whitmani* e *Pintomyia pessoai*.

Brumptomyia pintoi, *Micropygomyia acanthopharynx* e *Pintomyia misionensis* são relatadas pela primeira vez em Dourados, MS.

A presença de *Lutzomyia longipalpis, Nyssomyia whitmani, Migonemyia migonei* e *Pintomyia pessoai*, espécies envolvidas na transmissão de *Leishmania* sp. no Brasil circulando em ambiente de mata próxima às residências deve servir como alerta para órgãos competentes em saúde pública pela possibilidade de surtos de leishmanioses em Dourados,MS.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M.; DE MARCO, T.S.; SANTOS, S.C., GAMBARDELLA, S. 1996. Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública,* 12(2):195-206.

AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. *In: Flebotomíneos do Brasil*, Rangel EF e Lainson R. RJ: Fiocruz. p.207-255.

AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GRIMALDI-FILHO, G.; MOMEN, H. 1987. Alta frequência de leishmaniose tegumentar canina em foco endêmico do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82(1):56.

ALHO, C.J.R. 2012. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. *Estudos Avançados*, 26(74):151-165.

ALMEIDA, P.S.; NASCIMENTO, J.C.; FERREIRA, A.D.; MINZÃO, L.D.; PORTES, F.; MIRANDA, A.M.; FACCENDA, O.; ANDRADE FILHO, J.D. 2010. Espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em ambiente urbano em municípios com transmissão de leishmaniose visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 54(2):304-310.

ANDRADE, A.R.O.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; ARRUDA, C.C.P.; SANTOS, M.F.C.; ROCCA, M.E.G.; AQUINO, R.B. 2009. Epidemiological study on leishmaniasis in na área of environmental tourism and ecoturism, State of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(5):488-493.

ANDRADE, A.R.O.; DORVAL, M.E.C.; ANDRADE, S.M.O.; MARQUES, A.; JÚNIOR, M.S.C.L.; SILVA, B.A.K.; ANDREOTTI, R. 2011. First report of natural infection of phlebotomines for *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* captured in Ponta Porã, on the border between Brazil and Paraguay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1(4):253-258.

ANDRADE FILHO, J.D.; SILVA, A.C.L.; FALCÃO, A.L. 2001a. Phlebotominae sand flies in the state of Piauí, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(8):1085-1087.

ANDRADE FILHO, J.D.; VALENTE, M.B.; ANDRADE, W.A.; BRAZIL, R.P.; FALCÃO, A.L. 2001b. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34(4):323-329.

APARÍCIO, C. 2001. Utilização de geoprocessamento e sensoriamento remoto orbital para análise espacial de paisagem com incidência de leishmaniose tegumentar americana [dissertação de mestrado]. São Paulo: Instituto de Biociências da USP. 104p. Disponível em *www.teses.usp.br*

APARÍCIO, C.; BITENCOURT, M.D. 2004. Modelagem espacial de zonas de risco da leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Saúde Pública*, 38(4):511-516.

AZEVEDO, A.C.R.; RANGEL, E.F.; COSTA, E.M.; DAVID, J.; VASCONCELOS, A.W.; LOPES, U.G. 1990a. Natural infection of *L.* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes e Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(2):251.

AZEVEDO, A.C.R.; RANGEL, E.F.; QUEIROZ, R.G. 1990b. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(4):479.

BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; FORTES-DIAS, C.L.; COSTA, R.T.; SILVA, J.C.; VIEIRA, E.P.; PRATA, A.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. 2004. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5):481-487.

BARBOSA, G.M.; MARZOCHI, M.C.A; MASSARD, C.L.; LIMA, G.P.S.; CONFORT, E.M. 1999. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 15(3):641-646.

BARROS, G.C.; SESSA, P.A.; MATTOS, E.A; CARIAS, V.R.D.; MAYRINK, W.; ALENCAR, J.T.A.; FALQUETO, A.; JESUS, A.C. 1985. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 19(2):146-153.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3):328-337.

BATES, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotominae sand flies. *International Journal of Parasitology*, 37(10-3):1097-1106.

BEVILACQUA, P.D.; PAIXÃO, H.H.; MODENA, C.M.; CASTRO, M.C.P.S. 2001. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,* 53(1):1-8.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32(3):314-331.

BRAGA-MIRANDA, L.C.; MIRANDA, M.; GALATI, E.A.B. 2006. Phlebotominae fauna in a rural área of the Brazilian Pantanal. *Revista de Saúde Pública*, 40(2):324-326.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E.A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J.J. 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3):291-296.

BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose visceral americana. Brasília: Ministério da Saúde, 120p.

BRASIL. 2010. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília: Ministério da Saúde, 180p.

BRAZIL, R.P.; BRAZIL B.G. 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: *Flebotomíneos do Brasil*. Rangel EF e Lainson R. RJ: Fiocruz. p.207-255.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; GOMES, A.C.; ANTUNES, J. L. F. 2002. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(4):299-306.

CANESIN, A.C.V. 2011. Fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e infecção por *Leishmania* spp. na Cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. [dissertação de mestrado]. Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) 73p.

CARVALHO, G.M.L. 2006. Flebotomíneos vetores e prevalência da Leishmaniose visceral canina, em área endêmica do município de Santa Luzia, região metropolitana de Belo Horizonte [Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde – Centro de Pesquisa René Rachou, FioCruz, Belo Horizonte-MG] 129p.

CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; LIMA, A.C.V.M.R.; GONTIJO, C.M.F. 2008. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies in a *Leishmania*-endemic área of Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(3):407-414.

CIPA GROUP. 1999. A programe for computer aided identification of phlebotomine sandflies of the Américas (Cipa) – presentation and check-list of American species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(2):221-230.

CORTE, A.A.; NOZAWA, M.R.; FERREIRA, M.C.; PIGNATTI, M.G.; RANGEL, O.; LACERRA, S.S. 1996. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas. *Cadernos de Saúde Pública*, 12(4):465-472.

COSTA, A.I.P.; CASANOVA, C.; RODAS, L.A.C.; GALATI, E.A.B. 1997. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 31(6):632-633.

COSTA, S.M.; CECHINEL M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J.C.; LAINSON, R. RANGEL, E.F. 2007. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani s.l.* (Antunes e 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.

CUNHA, S.M.; FREIRE, M.; EULÁLIO, C.; CRISTÓVÃO, J.; NETTO, E.; JOHNSON, W.D.; REED, S.G.; BADARÓ, R. 1995. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 89(2):115-158.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(3):151-156.

DANTAS-TORRES, F. 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149(3-4):139-146.

DAVIES, C.R.; REITHINGER, R.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; FELICIANGELI, D.; BORGES, R.; RODRIGUEZ, N. 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saúde Pública*, 16(4):925-950.

DEANE, L.M.; GRIMALDI Jr, G. 1985. Leishmaniasis in Brazil. *In*: Chang JP, Bray RS (eds) Leishmaniasis. *Elsevier Science Publishing*, *Amsterdam*, p.247-281.

DEDET, J.P. 1993. *Leishmania* et leishmanioses du contiente américan. *Annales de L' Institute Pasteur*, 4(1):3-25.

DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A.C.C.; ALVES, T.P. 2006. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(1):43-46.

DORVAL, M.E.M.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; ALVES, T.P.; ALVES, M.A.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.G.; BRAZIL, R.P.; GALATI, E.A.B.; CUNHA, R.V. 2009. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic área in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5):695-702.

DOURADO, M.I.C.; NORONHA, C.V.; ALCANTARA, N.; ICHIHARA, M.Y.; LOUREIRO, S. 1989. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública*, 23(1):2-8.

DOURADOS (Município). 2009. Secretaria de Saúde, Centro de Controle de Zoonoses, Relatório de notificações de leishmaniose visceral canina e levantamento entomológico da fauna flebotomínea, Dourados, MS.

DOURADOS (Município). 2011. Secretaria de Saúde, Centro de Controle de Zoonoses, Relatório de notificações de leishmaniose visceral canina, Dourados, MS.

EL TAI, N.O.; OSMAR, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.H.; SCHÖNIAN, G. 2000. Genetic heterogenecity of ribossomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. *Transactions of the Royal Sociedade Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5):575-579.

FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI, J.R.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D.; JESUS, A.C.; ALENCAR, J.T.A. 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81(2):155-163.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; BARROS, G.C.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR, G. 1991. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(4):499-500.

FELICIANGELI, M.D. 1987. Ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. II. Species composition in relation to habitat, catching method and hour of catching. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82(1):125-131.

FERNANDES, M.F.; SANTOS, K.M.; FERREIRA-JUNIOR, J.S.; SILVA, R.A.; VERLINDO, A.C.; STEFANELI, M.; ISHIMI, C.M.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; GALATI, E.A.B.; LOPES, C.C.S.; PERES, L.L.S.; MEIRA, R.O.; ANDRADE FILHO, J.D.; CAMPOS, J.G.; FERNANDES, W.D.; RAIZER, J. 2011. Phlebotomine fauna in Forest and anthropic area, Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. 7 ISOPS - International Symposium on Phlebotomine Sandflies, 25-30 April 2011 Kusadasi - Turkey.

FERRO, C.; PARDO, R.; TORRES, M.; MORRISON, A.C. 1997. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Pschodidae) in endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 34(6):719-728.

FIGUEIREDO, F.B.; GREMIÃO, I.D.F.; PEREIRA, S.A.; FEDULO, L.P.; MENEZES, R.C.; BALTHAZAR, D.A.; SCHUBACH, T.M.P.; MADEIRA, M.F. 2008. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Sociedade Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2):200-201.

FONTELES, R.S.; COSTA E VASCONCELOS, G.; AZEVÊDO, P.C.B.; LOPES, G.N.; MORAES, J.L.P.; LOROSA, E.S.; KUPPINGER, O.; REBÊLO, J.M.M. 2009. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(6):647-650.

FORATTINI, O.P. 1960. Sobre reservatórios naturais de leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 2(4):195-203.

FORATTINI, O.P. 1973. *Entomologia médica*. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp, v.4, 658p.

GALATI, E.A.B. 1990. Sistemática dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas. São Paulo. Tese de Doutoramento da Faculdade de Saúde Pública da USP.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CRISTALDO, G.; ESPÍNDOLA, M.A.; ROCHA, H.C.; GARCIA, W.B. 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.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.; REGO-JR, F.A.; OSHIRO, E.T.; RODRIGUES, M. 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 31(4):378-390.

GALATI, E.A.B. 2003. Morfologia e taxonomia. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. e Lainson, R. (orgs.). RJ: Fiocruz, p.23-51.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C. 2003b. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 32(2):235-261.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; BOGGIANI, P.C.; DORVAL, M.E.M.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; OSHIRO, E.T.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; NAUFEL, G. 2003a. Phlebotominaes (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(2):283-296.

GALATI, E.A.B; NUNES, V.L.B; BOGGIANI, P.C; DORVAL, M.E.M.C; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; OSHIRO, E.T; DAMASCENO-JUNIOR, G.A. 2006. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(2):175-193.

GALATI, E.A.B. 2008. Classificação de Phlebotominae. Apostila do Curso de Entomologia Médica. São Paulo, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública/USP, vol.I 123p.

GOMES, A.C.; RABELO, E.X.; GALATI, E.A.B. 1978. Flebotomíneos encontrados em galinheiros experimentais nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Brasil) e algumas observações ecológicas. *Revista de Saúde Pública*, 12(3):403-407.

GOMES, A.C.; BARATA, J.M.; ROCHA e SILVA E.O.; GALATI, E.A.B. 1989. Ecologic aspects of american tegumentary leishmaniasis. 6. Antrhopophilic Phlebotomus fauna of residual forests located in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,* 31(1):32-39.

GOMES, A.C.; COUTINHO, S.G.; PAIM, G.V.; OLIVEIRA, S.M.O.; GALATI, E.A.B.; NUNES, M.P.; CAPINZAIKI, A.N.; YAMAMOTO, Y.I.; ROTTER, P. 1990. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8. Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil (1). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32(2):105-115.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3):338-349.

GRIMALDI Jr, G.; DAVID, J.R.; MCMAHON-PRATT, D. 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania species* characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies The *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(2):270-287.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.;BRYCESON, A.D. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(8):494-501.

HADDOW, A.J. 1960. Studies on the biting-habits and medical importance of East African mosquitoes in the genus *Aedes*. I. Subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Nunnius*. *Bulletin of Entomological Research*, 50(4):759-779.

IBGE. 2012. (Instituto Brasileiro de Geografias e Estatística). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.html>

JOHNSON, P.T.; MCCONNELL, E.; HERTIG, M. 1963. Natural infections of Leptomonad flagelates in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. *Experimental Parasitology*, 14(1):107-122.

KILLICK-KENDRICK, R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(1):1-24.

LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DRERE URE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1):210-215.

LAINSON, R. 1997. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*, 11(1):29-40.

LAINSON, R.; RANGEL, E. 2003. *Lutzomyia longipalpis* e a Eco-epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. e Lainson, R. (orgs.). RJ: Fiocruz, p.311-336.

LAINSON, R.; RANGEL, E. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8):811-827.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. 1992. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the American with particular reference to Amazonian Brazil. *Journal of the Brazilian Association for Advencement of Science*, 44(2/3):94-106.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. 2005. New World leishmaniasis. *In*: Cox F. E. G., Kreier, J. P. e Wakelin, D. (eds). Topley e Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology, Arnold, London, Sydney, Auckland, 17:313-349.

LAURENCE, W.F.; VASCONCELOS, H.L. 2009. Consequências ecológicas da fragmentação na Amazônia. *Oecologia Brasiliensis*, 13(3):434-451.

LIMA, A.P.; MINELLI, I.; COMUNELLO, E.; TEODORO, U. 2002 . Distribuição da Leishmaniose Cutânea Americana por imagens de sensoriamento remoto orbital, no estado do Paraná, sul do Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 77(6):681-62.

LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. 1998. Molecular markers in entomology (Review). *Bulletin of Entomological Research*, 88(6):577-600.

LUZ, E.; MEMBRIVE, N.; CASTRO, E.A; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, A.; PANDEY, A.; THOMAZ SOCCOL, V. 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) como vetor de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* no estado do Paraná, sul do Brasil**.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94(6):623-631.

MARCONDES, C.B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abreviations for Phlebotomine sandflies (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. *Entomological News*, 118(4):351-356.

MARINHO, R.M.; FONTELES, R.S.; VASCONCELOS, G.C.; AZEVEDO, P.C.B.; MORAES, J.L.M.; REBÊLO, J.M.M. 2008. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(1):112-116.

MARZOCHI, M.C.A. 1992. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). *Jornal Brasileiro de Medicina*, 63(6):81-105.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthropozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, 10(2):359-375.

MASSAFERA, R.; SILVA, A.M.; CARVALHO, A.P.; SANTOS D.R.; GALATI, E.A.B.; TEODORO, U. 2005. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no estado do Paraná. *Revista de Saúde Pública*, 39(4):571-577.

MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUES, S.S.; ROSELINO, A.M.E. 2002. Comparison of the especificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(4):421-424.

MEMBRIVE, N.A.; RODRIGUES, G.; MEMBRIVE, U.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. 2004. Flebotomíneos de municípios do norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Entomologia y Vectores*, 11(4):673-680.

MESTRE, G.L.C.; FONTES, C.J.F. 2007. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1):42-48.

MICHALSKY, É.M.; FORTES-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C.; DIAS, E.S. 2002. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(5):255-259.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Vigilância em Saúde (2010). Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=962

MIRANDA, C.; MASSA, J.L.; MARQUES, C.C.A. 1996. Análise da ocorrência da leishmaniose tegumentar americana através de imagem obtida por sensoriamento remoto orbital em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 30(5):433-437.

MIRANDA, C.; MARQUES, C.C.A.; MASSA, J.L. 1998. Sensoriamento remoto orbital como recurso para análise da ocorrência da leishmaniose tegumentar americana em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 32(5):55-463.

MISSAWA, N.A.; LIMA, G.B.M. 2006. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(4):337-340.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. 2008. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(4):365-368.

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. 2011. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi*

no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(1):76-78.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* 38(2):147-152.

MORENO, J.; ALVAR, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9):399-405.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. 2005. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496):1561-1577.

NASCIMENTO, J.C; PAIVA, B.R.; MALAFRONTE, R.S.; FERNANDES, W.D.; GALATI, E.A.B. 2007. Natural infection of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49(2):119-122.

NATAL, D.; MARUCCI, D; REIS, I.M.; GALATI, E.A.B. 1991. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). *Revista Brasileira de Entomologia*, 35(4):697-700.

NEITZKE, H.C.; SCODRO, R.B.L.; CASRO, K.R.R.; SVERSUTTI, A.C.D.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. 2008. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no estado do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(1):17-22.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; NUNES, D.B.; ZINEZZI, R.O.; SAVANI, E.S.M.M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C. 2001. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(3):301-302.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; CARDOZO, C.; ROCCA, M.E.G.; ANDRADE, A.R.O.; SANTOS, M.F.C.; AQUINO, R.B.; ROSA, D. 2008. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3):446-451.

OLIVEIRA, A.G.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. 2000. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 34(6):654-655.

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. 2001. A new sand fly, *Lutzomyia campograndensis* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(3):325-329.

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. 2003. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cadernos de Saúde Pública*, 19(4):933-944.

OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G.R.; ESPÍNDOLA, I.A.C.; DORVAL, M.E.M.C.; BRAZIL, R.P. 2006. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 101(8):869-874.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N.; RÊBELO, J.M.M.; MORAES, J.L.P.; PEREIRA, S.R.F. 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia Maranhese. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(6):540-543.

PAIVA, B.R.; PASSOS, L.N.; FALQUETO, A.; MALAFRONTE R.S.; ANDRADE Jr.,H.F. 2004. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 469(6):335-338.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C.; NASCIMENTO, J.C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE JR., H.F.; MALAFRONTE, R.S. 2006**.** Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies base don mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, 99(2-3):252-259.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.; PIMENTA, P.F.; GALATI, E.A.B.; MALAFRONTE, R.S. 2007. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). *Cadernos de Saúde Pública*, 23(1):87-94.

PAIVA, B.R.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; MALAFRONTE, R.S. 2010. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Tropica*, 2(13):1-5.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. 1977. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro, Guanabara koogan S. A. Editora, p.986.

PIGNATTI, M.G. 2004. Saúde e ambiente: as doenças emergentes do Brasil. *Ambiente & Sociedade*, 7(1):133-147.

PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C.; BLANCO, E.E.N. 2003. Interação Vetor – Hospedeiro. *In*: Flebotomíneos do Brasil, Rangel, E.F. e Lainson, R. (orgs.). RJ: Fiocruz, p.275-289.

PIRMEZ, C.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; NUNES, M.P.; GRIMALDI-JR, G. 1988. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(1):52-58

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C.R.; SOUZA, M.B.; BRAZIL R.P.; BERTHO, A.L.; BARBOSA A.F.; BRITTO, C.C. 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* whit *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(12):905-913.

PROENÇA, N.G.; MULLER, H. 1979. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana na Serra da Cantareira, São Paulo, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 13(1):56-59.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. *In:* Flebotomíneos do Brasil, Rangel E.F. e Lainson, R. (eds). RJ: Fiocruz. p.291-309.

RESENDE, M.C.; CAMARGO, M.C.V.; VIEIRA, J.R.M.; NOBI, R.C.A.; PORTO, N.M.N.; OLIVEIRA, C.D.L.; PESSANHA, J.E.; CUNHA, M.C.M.; BRANDÃO, S.T. 2006. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* 39(1):51-55.

ROBERTO, A.C.B.S.; LIMA, A.P.; PEIXOTO, P.R.; MISUTA, N.M.; FUKUSHIGUE, Y.; FERREIRA, M.E.M.C.; SOBRINHO, A.N.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO,U. 1997. Avaliação da terapia com antimoniato de N-metil glucamina e de notificação de leishmaniose tegumentar. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 72(2):129-136.

ROBERTS, D.R.; HSI, B.P. 1979. An índex of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environmental Entomology*, 8(6):1007-1013.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMAN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis**.** *Medical and Veterinary Entomology*, 12(3):315-317.

SANTOS, G.P.L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A.; SANTOS, E.G.O.B.; SILVA, V.L.; PACHECO, R.S.; MOUTA-CONFORT, E.; ESPÍNDOLA, C.B.; SOUZA, M.B.; PONTE, C.S.; CONCEIÇÃO, N.F.; ANDRADE, M.V. 2005. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(2):161-166.

SANTOS, K.M. 2010. Levantamento da fauna e índice de infecção natural por flagelados em Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) na aldeia indígena Jaguapiru na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Dourados. [dissertação de mestrado]. Dourados: Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) 85p.

SANTOS, K.M.; CAMPOS, J.G.; DORVAL, M.E.M.C.; FERNANDES, M.F.; STEFANELI, M.; OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.B.; RAIZER, J.; FERNANDES, W.D. 2011. Phlebotomines biodiversity (Diptera: Psychodidae) in Jaguapiru indigenous village, Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. 7 ISOPS – International Symposium on Phlebotomine Sandflies, 25-30 April 2011 Kusadasi – Turkey.

SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J.; SILVA, S.O.; ANDRADE, A.S.R.; MELO, M.N. 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species whitin sand flies from

a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8):1033-1039.

SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'ÁURIA, S.R.N.; SHAW, J.J.; FLÖETER-WINTER, L.M. 2004. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia county, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 120(3):229-233.

SAVANI, E.S.M.M.; ALMEIDA, M.F.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N.; SILVA, M.M.S.; OLIVEIRA, M.L.; SACRAMENTO, D. 2010. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology*, 168(1-2):5-10.

SCHALLIG, H.D.F.H; OSKAM, L. 2002. Molecular biological aplications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine & International Health*, 7(8):641-651.

SCHÖNIAN, G.; NASCREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWYNOCH, C.; SCHALLIG, HDFH; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(1):349-358.

SHAW, J.J. 2002. New World Leishmaniasis: The ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. *In*: *Farrel (ed.) World Class Parasites*: *Leishmania*. London: Kluwer Academic Publishe. p.11-31.

SHERLOCK, I.A. 2003. Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. e Lainson, R. (org.) Rio de Janeiro: Fiocruz. p.15-22.

SILVA, A.M.; CAMARGO, N.J.; SANTOS, D.R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A.C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E.C.; KONOLSAISEN, J.F.; JÚNIOR, A. B.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E.A.B. 2008. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. *Neotropical Entomology*, 37(2):209-225.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; BRAZIL, R.P. 2004. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Reserch*, 3(2): 251-257.

SILVA, O.S.; GRUNEWALD, J. 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(5):579-582.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; BRITO, A.C.; OLIVEIRA, M.R.F.; PAES, M.G.; SOUZA, A.A.A.; SILVA, B.M. 1997. Leishmaniose tegumentar americana. *In*: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*: *Enfoque Amazônico*. Belém: CEJUP.

SINAN (Estado). 2012. Secretaria de Estado de Saúde, Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) Campo Grande, MS.

SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.; MARIN, G.R.; NUNES, V.L. 2005. Feline leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 128(1-2):41-45.

SOUZA, A.I.; NUNES, V.L.B.; BORRALHO, V.W.; ISHIKAWA, E.A.Y. 2009. Domestic feline cutaneous leishmanisis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: a case report. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical*,15(2):359-365.

SOUZA, C.F.; BORGES, M.A.S.; ANDRADE, A.J. 2009. Contribution to the knowledge of the phlebotominae sand flies fauna (Diptera: Psychodidae) of Timóteo municipality, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology*, 38(2):267-271.

SOUZA, C.M.; PESSANHA, J.E.; BARATA, R.A.; MONTEIRO, E.M.; COSTA, D.C.; DIAS, E.S. 2004. Study on phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(8):795-803.

TEODORO, U.; FILHO, V.L.S.; LIMA, E.M.; SPINOSA, R.P.; BARBOSA, O.C.; FERREIRA, M.E.M.C.; SILVEIRA, T.G.V. 1993. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na Região Norte do estado do Paraná – Brazil: Variação sazonal e atividade noturna. *Revista de Saúde Pública*, 27(3):190-194.

TEODORO, U.; KÜHL, J.B.; RODRIGUES, M.; SANTOS, E.S.; SANTOS, D.R.; MARÓSTICA, L.M.F. 1998. Flebotomíneos em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, Sul do Brasil. Estudo preliminar. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(6):517-522.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; SILVA, A.M.; NEITZKE, H.C.; MONTEIRO, W.M.; LONARDONI, M.V.C; SILVEIRA, T.G.V. 2006. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. *Revista de Saúde Pública*, 40(2):327-330.

VEXENAT, J.A; BARRETO, A.C.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. 1986. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia: III. Fauna flebotomínica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81(3):292-301.

XIMENES, M.F.F.M.; SILVA, V.P.M.; DE QUEIROZ, P.V.S.; REGO, M.M.; CORTEZ, A.M.; BATISTA, L.M.M.; MEDEIROS, A.S.; JERONIMO, S.M.B. 2007. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil – Reflexos do ambiente antrópico. *Neotropical Entomology,* 36(1):128-137.

WHO. 2011. World Health Organization Disponível em: <http://www.who.int/emc/disease/leish/index.html>. Acessado em: 11/2011.

YOSHIDA, E.L.A; CORREA, F.M.A.; MARQUES, A.S.; SOLF, H.L.O.; DILLON, N.L.; MOMEN, H.; GRIMALD Jr., G. 1990. Human canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(1):133-134.

ZANZARINI, P.D.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. 2005. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 21(6):1957-1961.