

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**HENRIQUE JORDEM VENIAL**

**INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. EM MAMÍFEROS  
SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ  
JANEIRO/2021**

**HENRIQUE JORDEM VENIAL**

**INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. EM MAMÍFEROS  
SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, na linha de pesquisa de Sanidade Animal.

**Orientador: Professor Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ  
JANEIRO/2021**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

V459

Venial, Henrique Jordem.

Investigação de infecção por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres no Estado do Espírito Santo, Brasil / Henrique Jordem Venial. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

89 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientador: Eulogio Carlos Queiroz de Carvalho.

1. *Leishmania* spp.. 2. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 3. *Cuniculus paca*. 4. *Callithrix geoffroyi*. 5. Mamíferos Silvestres. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 636

**HENRIQUE JORDEM VENIAL**

**INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. EM MAMÍFEROS  
SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, na linha de pesquisa de Sanidade Animal.

Aprovada em 29 de janeiro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Hassan Jerdy Leandro - UENF

---

Professor Dr. Renato Luiz Silveira - UFF

---

Professor Dr. Raphael Mansur Medina - UNIG

---

Professor Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho - UENF (Orientador)

“Dedico este trabalho à minha filha Laura,  
que foi e é meu grande incentivo e força  
para ir em busca dos meus sonhos.”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha força e proteção, que esteve sempre presente guiando me durante esta jornada.

Aos meus pais João Batista e Eliane, meus exemplos de força, coragem, determinação, inteligência e superação em todos os sentidos. Obrigado por confiarem e acreditarem em mim e por me apoiarem em minhas decisões.

À minha filha Laura, minha luz, meu combustível, meu tesouro. Você é meu incentivo em querer buscar sempre mais, filha. Mesmo distantes, não deixei de pensar em você um dia sequer.

Ao meu amigo e companheiro Murilo de O. Souza, pelo apoio, força, exemplo e incentivo. Você sempre esteve presente com pensamentos positivos. Mostrou-me que podemos ser melhores a cada dia e ir além do que imaginamos. Muito obrigado!

Ao meu orientador Eulógio Carlos Q. de Carvalho, pela oportunidade, confiança e por sempre me apoiar em minhas decisões. Obrigado pelos conselhos e todo ensinamento profissional e também de vida. A você minha eterna gratidão, professor!

A mis amigos del Pet Parasite Lab (UCM - España), Ana, JuanP, Rocío, Juliana, Valentina y Guadalupe. Gracias por recibirme tan bien y con tanta calidez y afecto, y por la oportunidad y ayuda en estas dos etapas que estuve en Madrid. Os llevaré siempre en mi corazón con un lazo de amistad y respeto. Mi más profundo agradecimiento.

À equipe técnica, aos profissionais e alunos do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF, que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigado!

A mis amigos de Madrid, Celso, Edu, Carmen, Sofia, Lorena, Dani, Haley y Neo, que han hecho más felices mis días en Madrid y han estado siempre presentes en los días de angustia y alegría. Muchas gracias por vuestra amistad! Os echo de menos!

Ao meu amigo M.V. Gabriel Uzai, pelo apoio, incentivo e amizade. Obrigado pelas ótimas idéias que me deu e por coletar as amostras dos animais silvestres nos dias que não pude estar no laboratório. Conte sempre comigo!

Ao meu amigo Paulo César dos Santos, pelo apoio, amizade, companheirismo e oportunidades durante esta jornada em Campos dos Goytacazes.

Às professoras da UFES Louisiane de C. Nunes e Maria Aparecida da Silva, pela oportunidade e apoio na coleta das amostras dos animais silvestres para que eu pudesse desenvolver este projeto, muito obrigado!

À professora Márcia Flores e à pós-graduanda Francine Alves, do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal da UFES. Obrigado por me ajudarem e apoiarem nas análises desta pesquisa no momento que mais precisei. Sou muito grato à vocês!

À UENF e à equipe da secretaria da pós-graduação em Ciência Animal, Jovana e Conceição. Obrigado pelo apoio e acolhimento.

À UFES, onde tenho orgulho de trabalhar. Agradeço aos 2 anos de afastamento parcial, que me foi concedido, para que eu pudesse cursar parte deste Doutorado.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Resiliência e Fé”*



## RESUMO

**VENIAL, Henrique Jordem. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro de 2021. Investigação de infecção por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres no Estado do Espírito Santo, Brasil. Orientador: Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho.**

A leishmaniose é uma doença infecciosa e de caráter zoonótico, registrada em vários países do mundo, sendo considerada endêmica no estado do Espírito Santo, Brasil. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp., que se multiplicam dentro de macrófagos de seus hospedeiros (ser humano e outras espécies de mamíferos), e sua transmissão ocorre por fêmeas de insetos flebotomíneos infectados. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de infecção natural por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres, encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural) nas regiões de Alegre, Serra e Reserva Biológica de Sooretama, no estado do Espírito Santo, e o papel epidemiológico destes animais na transmissão de *Leishmania* spp. Entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 foram coletados 119 animais. Destes, foram analisados 100 animais viáveis de 15 espécies diferentes. Os resultados foram demonstrados por meio de análise descritiva das observações, para o cálculo das frequências absolutas e relativas dos dados. As espécies *Didelphis aurita* (gambá-de-orelha-preta), *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca) e *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) foram as mais encontradas. Por meio da PCR, utilizando primers específicos para o gênero *Leishmania* e para a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, foi detectado 4 animais positivos provenientes da Reserva Biológica de Sooretama: 1 *Cuniculus paca* (paca) e 3 *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca). Na análise histopatológica não foi observada a forma amastigota do parasito. A infecção natural, detectada por meio da PCR, por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em *Cuniculus paca* (paca) e em *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca) constitui o primeiro relato de infecção destas espécies de roedor e primata na literatura. Apesar da confirmação de ocorrência de infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em roedor e primata no estado do Espírito Santo, o papel destas espécies de mamíferos na transmissão desta zoonose ainda necessita de mais estudos longitudinais para identificar os efeitos

de um determinado parasito na população e/ou indivíduo, sua flutuação sazonal, estabilidade da infecção e transmissibilidade.

**Palavras-chave:** *Leishmania* spp.; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Cuniculus paca*; *Callithrix geoffroyi*; Mamíferos Silvestres.

## ABSTRACT

**VENIAL, Henrique Jordem. State University of the North Fluminense Darcy Ribeiro. January 2021. Investigation of *Leishmania* spp. in wild mammals in the State of Espírito Santo, Brazil. Advisor: Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho.**

Leishmaniasis is an infectious and zoonotic disease, registered in several countries of the world, being endemic in the state of Espírito Santo, Brazil. It is caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp. that multiply within their hosts' macrophages (humans and other mammal species), and its transmission occurs by females of infected sand flies. The objective of this study was to investigate the occurrence of natural infection by *Leishmania* spp. in wild mammals, found dead (by trampling or natural death) in the regions of Alegre, Serra, and Sooretama Biological Reserve, in the state of Espírito Santo, and their epidemiological role in the *Leishmania* spp. transmission. Between January 2018 and December 2019, 119 animals were collected. Of these, 100 viable animals of 15 different species were analyzed. The results were demonstrated using a descriptive analysis of the observations to calculate the absolute and relative frequencies of the data. The species *Didelphis aurita* (black-eared opossum), *Callithrix geoffroyi* (white-headed marmoset), and *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) were the most found. In the PCR, using specific primers for the genus *Leishmania* and the species *Leishmania (Viannia) braziliensis*, 4 positive animals were detected in the Sooretama Biological Reserve: 1 *Cuniculus paca* (paca) and 3 *Callithrix geoffroyi* (white-headed marmoset). In the histopathological analysis, the parasitic amastigote form was not observed. The natural infection, detected by PCR, by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Cuniculus paca* (paca) and *Callithrix geoffroyi* (white-headed marmoset) constitutes the first report of infection of these rodent and primate species in the literature. Despite confirmation of the occurrence of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in rodent and primates in the state of Espírito Santo, the role of these species in the transmission of this zoonosis still needs further longitudinal studies to identify the effects of a given parasite on the population and/or individual, its seasonal fluctuation, infection stability, and transmissibility.

**Keywords:** *Leishmania* spp.; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Cuniculus paca*; *Callithrix geoffroyi*; Wild Mammals.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- 1.1. Localização das áreas de realização da pesquisa. A: Região de Alegre; B: Região da Serra; C: Reserva Biológica de Sooretama..... 30
- 1.2. Frequência relativa do total de machos e fêmeas utilizados na pesquisa de *Leishmania* spp. nas diferentes regiões do estado do Espírito Santo... 37
- 1.3. Frequência relativa do total de jovens e adultos utilizados na pesquisa de *Leishmania* spp. nas diferentes regiões do estado do Espírito Santo... 39
- 1.4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado por SYBR® Green, mostrando produtos de PCR de 120 bp de amostras positivas de linfonodos amplificados, a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gênero *Leishmania*. 1: Amostra positiva de *Cuniculus paca*; 2,3,4: Amostras positivas de *Callithrix geoffroyi*; (C+B): Controle positivo Brasil; (C+E): Controle positivo Espanha; (C-): Controle negativo; M: Marcador de peso molecular. Produto de amplificação de 120 bp encontra-se indicado por seta..... 39
- 1.5. Animais silvestres positivos para *Leishmania* spp. A: *Cuniculus paca*; B, C, D: *Callithrix geoffroyi* ..... 40

### CAPÍTULO 2

- 2.1. Localização da Reserva Biológica de Sooretama..... 61
- 2.2. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado por Gel Red®, mostrando produtos de PCR de 336 bp de amostras positivas de linfonodos amplificados, a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a espécie *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. M: Marcador de peso molecular; 1: Amostra positiva de *Cuniculus paca*; 2,3,4: Amostras positivas de *Callithrix geoffroyi*; (C-): Controle negativo; (C+): Controle positivo. Produto de amplificação de 336 bp encontra-se indicado por seta..... 68

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

1.1. Primers utilizados para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. ....	33
1.2. Animais silvestres e sinantrópicos encontrados em diferentes regiões no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 .....	35
1.3. Animais silvestres e sinantrópicos utilizados para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp., encontrados em diferentes regiões no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 .....	36
1.4. Animais silvestres e sinantrópicos, discriminados por sexo, utilizados para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp., encontrados nas diferentes regiões do estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 .....	37
1.5. Animais silvestres e sinantrópicos, discriminados pela condição biológica, utilizados para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp., encontrados em diferentes regiões no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 .....	38
1.6. Resultados de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp., por meio da PCR, a partir de amostras de linfonodos .....	41
1.7. Comparação entre sexo e condição biológica dos animais positivos para <i>Leishmania</i> spp. encontrados no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 .....	41

### CAPÍTULO 2

2.1. Primers utilizados para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. ....	63
2.2. Primers utilizados para a pesquisa de <i>Leishmania (Viannia) brasiliensis</i> .	65
2.3. Animais silvestres encontrados na Reserva Biológica de Sooretama, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 e utilizados para a pesquisa de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	67

2.4. Animais silvestres, discriminados por sexo e condição biológica, utilizados para pesquisa de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , encontrados na Reserva Biológica de Sooretama.....	67
2.5. Resultados de infecção natural por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , por meio da PCR, a partir de amostras de linfonodos.....	69

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 OBJETIVO GERAL .....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>5. DESENVOLVIMENTO</b> .....	25
<b>5.1. CAPÍTULO 1 - INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> spp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL</b> .....	25
5.1.1. RESUMO .....	26
5.1.2. ABSTRACT .....	26
5.1.3. INTRODUÇÃO .....	27
5.1.4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
5.1.4.1. ÁREA AMOSTRADA, COLETA DE MATERIAIS E EXAME CLÍNICO .....	29
5.1.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA.....	31
5.1.4.3. TÉCNICA CONVENCIONAL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA <i>Leishmania</i> spp. E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	32
5.1.4.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	33
5.1.4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5.1.4.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	34
5.1.5. RESULTADOS.....	34
5.1.6. DISCUSSÃO .....	42
5.1.7. CONCLUSÕES .....	47
5.1.8. AGRADECIMENTOS .....	48
5.1.9. REFERÊNCIAS.....	48
<b>5.2. CAPÍTULO 2 - INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> EM MAMÍFEROS SILVESTRES NA RESERVA BIOLÓGICA DE SOORETAMA, ESPÍRITO SANTO, BRASIL</b> .....	56

5.2.1. RESUMO .....	56
5.2.2. ABSTRACT .....	57
5.2.3. INTRODUÇÃO .....	58
5.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	60
5.2.4.1. ÁREA AMOSTRADA, COLETA DE MATERIAIS E EXAME CLÍNICO .....	60
5.2.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA.....	62
5.2.4.3. TÉCNICA CONVENCIONAL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA <i>Leishmania</i> spp. E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	63
5.2.4.4. TÉCNICA CONVENCIONAL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA <i>Leishmania (Viannia) brasiliensis</i> E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	64
5.2.4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5.2.4.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	65
5.2.5. RESULTADOS.....	66
5.2.6. DISCUSSÃO .....	70
5.2.7. CONCLUSÕES .....	73
5.2.8. AGRADECIMENTOS .....	74
5.2.9. REFERÊNCIAS.....	74
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>80</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, registrada em países do Velho e do Novo Mundo, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que se multiplicam obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (macrófagos). Estes protozoários fazem parte da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, com inúmeras espécies patogênicas para os seres humanos e diferentes espécies de mamíferos. Dois subgêneros são importantes do ponto de vista de saúde pública, *Leishmania* (L.) e *Viannia* (V.). O primeiro ocorre nas Américas, Europa, Ásia e África, enquanto o subgênero *Viannia* ocorre na região neotropical. Atualmente, são conhecidas cerca de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas aos seres humanos e 31 são parasitas de mamíferos (GRAMICCIA, 2011; ROQUE & JANSEN, 2014; WHO, 2010; 2017).

Estes parasitas apresentam um ciclo de vida heteroxênico, com hospedeiros mamíferos vertebrados (seres humanos, cães e animais silvestres) e um inseto vetor invertebrado (família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*), este responsável pela transmissão da doença. Cerca de 30 espécies dessa subfamília atuam como vetores, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África e ao gênero *Lutzomyia* nas Américas (AKHOUNDI et al., 2016; LUKES et al., 2007; WHO, 2010).

A leishmaniose se apresenta de três formas: leishmaniose tegumentar ou cutânea, muco-cutânea e leishmaniose visceral. A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes para toda a vida. Cerca de 95% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2018, mais de 85% dos novos casos de leishmaniose tegumentar ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Síria e Tunísia. Estima-se que ocorram anualmente entre 600.000 a 1 milhão de novos casos em todo o mundo (WHO, 2020).

A leishmaniose mucocutânea leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2020).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é fatal em mais de 95% dos casos, se não tratada. É caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado, e anemia. A maioria dos casos ocorre no Brasil, África Oriental e na Índia. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral ocorram em todo o mundo anualmente, com apenas 25 a 45% dos casos relatados à Organização Mundial de Saúde (OMS). A leishmaniose visceral continua sendo uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade. Em 2018, mais de 95% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2020).

Na Europa, Ásia e África, espécies do subgênero *Leishmania* são responsáveis pela leishmaniose tegumentar, particularmente *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) aethiopica*, *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) donovani*. Nas Américas, várias espécies de ambos os subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, podem ocasionar a enfermidade (WHO, 2010). No Brasil, sete espécies são particularmente associadas: *Leishmania (L.) amazonensis* e as espécies do subgênero *Viannia*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) lindenberg*. Os principais vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose tegumentar no país são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia wellcome* e *Lutzomyia migonei*, e na transmissão da leishmaniose visceral são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (FALCÃO DE OLIVEIRA et al., 2017; WHO, 2017).

Enquanto a leishmaniose tegumentar é uma forma da doença de ocorrência mais comum, a leishmaniose visceral é a mais severa delas (WHO, 2017). Esta ocorre pela infecção por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* na Europa, Ásia e África e por *L. (L.) infantum* nas Américas (WHO, 2010). A espécie *L. (L.) chagasi* foi descrita em 1937 como responsável por uma forma sistêmica típica das Américas (CUNHA & CHAGAS, 1937). Investigações moleculares e filogenéticas posteriores concluíram que, na realidade, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* constituem a mesma espécie (MAURICIO et al., 2000; KUHLS et al., 2011).

Roedores, canídeos, marsupiais e primatas são mamíferos que podem servir como hospedeiros desse parasito, por conta disso, a leishmaniose pode ser classificada como uma zoonose. O ser humano é designado como hospedeiro acidental no ciclo de transmissão, e isso ocorre por conta da permanência do indivíduo em localidades com grandes possibilidades de ocorrência de transmissão. O agente transmissor tem sido encontrado com frequência em ambientes domiciliares e peridomiciliares, devido à urbanização, mesmo não sendo seu habitat natural, favorecendo então, a infecção em humanos (QUINNELL & COURTENAY, 2009; MILLÁN et al., 2014; NEVES et al., 2016).

A leishmaniose tegumentar é endêmica e amplamente distribuída em todo o estado do Espírito Santo. Vários casos da doença em humanos e cães associados a *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram relatados nessa área (FALQUETO et al., 2003). Já a leishmaniose visceral foi registrada pela primeira vez no estado por Martins et al. (1968), nos municípios de Colatina e Baixo Guandu (região centro-norte do estado). Feitoza et al. (2001) relataram o registro de três casos de leishmaniose visceral nos municípios de Rio Novo do Sul e Vargem Alta, na região sul do estado do Espírito Santo, e Falqueto et al. (2009), obtiveram resultados positivos para *Leishmania (L.) infantum* em cães e humanos no sudeste e centro-norte do estado do Espírito Santo.

Nas Américas, o Brasil é o país com o maior número de casos de leishmaniose, tanto da forma cutânea como visceral. As condições que favorecem a sua ocorrência em regiões urbanas do Brasil estão relacionadas ao desmatamento, às condições precárias de saneamento decorrentes do crescimento desordenado das cidades nas últimas décadas. Além disso, as moradias superpovoadas e a abundância de reservatórios no peridomicílio, favorecem a adaptação do vetor, o que propicia o contato direto entre os ciclos silvestre e urbano da leishmaniose (WHO, 2017; HARHAY et al., 2011; COSTA & COSTA, 2014).

A magnitude dos problemas de saúde causados pela leishmaniose, combinada com a complexidade de sua epidemiologia, indicam a necessidade de se entender todas as etapas de sua transmissão e desenvolver estratégias efetivas de controle (ROQUE & JANSEN, 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

Diversos fatores sustentam a importância da existência de um monitoramento de doenças em animais silvestres, dentre eles a possibilidade de elucidar as formas de transmissão das doenças infecciosas que os acometem, hoje na sua maioria desconhecidas, e de evitar o impacto ecológico que possam causar. Os estudos com animais atropelados e encontrados mortos vão ao encontro das atuais discussões sobre bioética, que priorizam métodos alternativos para o uso de animais em pesquisas, sem a necessidade de eutanásia.

Doenças causadas por tripanossomatídeos, como a leishmaniose, estão relacionadas ao desmatamento e colonização, acelerados pelo crescimento econômico desde o início do século XX. O crescente desmatamento da mata atlântica possibilita o crescimento dos casos de leishmaniose visceral e cutânea. Complementa-se ao fato, o pouco conhecimento sobre a diversidade de parasitas deste gênero, somado aos casos da doença em animais domésticos e humanos no estado do Espírito Santo, além do papel de pequenos mamíferos silvestres como hospedeiros deste parasita.

A investigação de *Leishmania* em reservatórios silvestres com o uso de parâmetros parasitológicos e moleculares, contribuirão para um estudo amplo da diversidade deste agente, no estado do Espírito Santo, melhorando o conhecimento epidemiológico da área estudada, atualizando a lista de espécies, além de um conhecimento do parasita citado, sendo que, os resultados obtidos poderão favorecer nas decisões de futuras medidas de controle desse agente nas espécies estudadas, pois até o momento, é escassa a pesquisa desta doença no estado e, inédita, em animais silvestres.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a infecção natural por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres, encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural) em três regiões do estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a infecção por *Leishmania* spp. nestes animais, por meio de métodos histopatológico e molecular;
- Identificar espécies de hospedeiros reservatórios envolvidos na manutenção da leishmaniose na rodovia BR 482 no município de Alegre, na rodovia BR 101 no município da Serra e na Reserva Biológica de Sooretama, no estado do Espírito Santo;
- Verificar a infecção por *Leishmania (Viannia) brasiliensis* nos animais provenientes da Reserva Biológica de Sooretama e identificar espécies de hospedeiros reservatórios envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar;
- Realizar um estudo observacional do tipo descritivo, como forma de identificar áreas de risco no ciclo de transmissão humana e animal da leishmaniose.

#### 4. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.

COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do Continente Americano**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 327-353, 2014.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. **O Hospital**, v. 11, p. 3-9, 1937.

FALCÃO DE OLIVEIRA, E.; OSHIRO, E.T.; FERNANDES, W.S.; MURAT, P.G.; DE MEDEIROS, M.J.; SOUZA, A.I.; DE OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v. 11, n. 2, p. 1-23, 2017.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR., G. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 559-565, 2009.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHO PAES, L.; GRIMALDI JR., G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1003-1010, 2003.

FEITOZA, L. R.; CASTRO, L. L. F. de; RESENDE, M.; ZANGRANDE, M. B.; STOCKING, M. S.; BOREL, R. M. A.; FULIN, E. A.; CERQUEIRA, A. F.; SALGADO, J. S.; FEITOZA, H. N.; FULLIN, E. A.; STOCK, L. A.; DESSAUNE FILHO, N.; MANK, A. M.; FERINGA, W.; MARTINEZ, J. A. **Mapa das Unidades Naturais do Estado do Espírito Santo – Informações básicas**. In: FEITOZA, L. R.; STOCKING, M. S.; RESENDE, M. (eds.). *Natural Resources Information Systems for Rural Development – Approaches for Espírito Santo State, Brazil*. Vitória: INCAPER, p. 212-217, 2001.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v 181, n. 1, p. 23-30, 2011.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

KUHLS, K.; ZAHANGIR, M.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M., ISABEL, L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHÖNIAN, G. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 1155, 2011.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MARTINS, J.; SOUZA, J. C.; SILVA, E. Primeiros casos autóctones de calazar no Espírito Santo. **O Hospital**, v. 73, p. 69-97, 1968.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2005-2014, 2014.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, L. W. A. **Parasitologia Humana**. 13 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016, 494p.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. WHO technical report series. n. 949. Geneva: **WHO Press**, 201 p., 2010.

WHO. World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 92, n. 38, p. 557-565, 2017.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis (2020). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 16 de dezembro de 2020.



## 5. DESENVOLVIMENTO

### 5.1. CAPÍTULO 1 - INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Investigation of *Leishmania* spp. infection in wild mammals in the State of Espírito Santo, Brazil

#### 5.1.1. RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa e de caráter zoonótico, registrada em vários países do mundo, sendo considerada endêmica no estado do Espírito Santo, Brasil. Se apresenta na forma cutânea e visceral e é causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp., que se multiplicam dentro de macrófagos de seus hospedeiros (ser humano e outras espécies de mamíferos), e sua transmissão ocorre por fêmeas de insetos flebotomíneos infectados. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de infecção natural por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres, encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural) nas regiões de Alegre, Serra e Reserva Biológica de Sooretama, no estado do Espírito Santo, e o papel epidemiológico destes animais na transmissão deste agente etiológico. Entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 foram coletados 119 animais. Destes, foram analisados 100 animais viáveis de 15 espécies diferentes. Os resultados foram demonstrados por meio de análise descritiva das observações, para o cálculo das frequências absolutas e relativas dos dados. As espécies *Didelphis aurita* (gambá-de-orelha-preta) 26,1% (31/119), *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca) 26,1% (31/119) e *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) 14,3% (17/119) foram as mais encontradas. Através da PCR, a *Leishmania* spp. foi detectada em 4 animais (4%): 1 *Cuniculus paca* (paca) (25%) e 3 *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca) (10%). Na análise histopatológica não foi observada a forma amastigota do parasito. A infecção natural, por *Leishmania* spp., em *Cuniculus paca* (paca) constitui o primeiro relato na literatura de infecção desta espécie de roedor, no estado do Espírito Santo, e a infecção em *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca) constitui o primeiro relato de infecção desta espécie de primata na literatura. Apesar da confirmação de ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. em roedores e primatas, no estado do Espírito Santo, o papel destas espécies na

transmissão desta zoonose ainda necessita de mais estudos longitudinais para identificar os efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo, sua flutuação sazonal, estabilidade da infecção e transmissibilidade.

**Palavras-chave:** *Leishmania* spp.; *Cuniculus paca*; *Callithrix geoffroyi*; Mamíferos silvestres.

### 5.1.2. ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious and zoonotic disease, registered in several countries of the world, being endemic in the state of Espírito Santo, Brazil. It presents in cutaneous and visceral form and is caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp. that multiply within their hosts' macrophages (humans and other mammal species), and its transmission occurs by females of infected sand flies. The objective of this study was to investigate the occurrence of natural infection by *Leishmania* spp. in wild mammals, found dead (by trampling or natural death) in the regions of Alegre, Serra, and Sooretama Biological Reserve, in the state of Espírito Santo, and their epidemiological role in the *Leishmania* spp. transmission. Between January 2018 and December 2019, 119 animals were collected. Of these, 100 viable animals of 15 different species were analyzed. The results were demonstrated using a descriptive analysis of the observations to calculate the absolute and relative frequencies of the data. The species *Didelphis aurita* (black-eared opossum) 26.1% (31/119), *Callithrix geoffroyi* (white-headed marmoset) 26.1% (11/31), and *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) 14.3% (17/119) were the most found. Through PCR, the *Leishmania* spp. was detected in 4 animals (4%): 1 *Cuniculus paca* (paca) (25%) and 3 *Callithrix geoffroyi* (white-headed marmoset) (10%). In the histopathological analysis, the parasitic amastigote form was not observed. Natural infection by *Leishmania* spp. in *Cuniculus paca* (paca) constitutes the first report in the literature of infection of this rodent species, in the state of Espírito Santo, and the infection in *Callithrix geoffroyi* (white-headed marmoset) constitutes the first report of infection of this primate species in the literature. Despite confirmation of the occurrence of *Leishmania* spp. infection in rodents and primates, in the state of Espírito Santo,

the role of these species in the transmission of this zoonosis still needs further longitudinal studies to identify the effects of a given parasite on the population and/or individual, its seasonal fluctuation, infection stability, and transmissibility.

**Keywords:** *Leishmania* spp.; *Cuniculus paca*; *Callithrix geoffroyi*; Wild mammals.

### 5.1.3. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Leishmaniose é uma zoonose registrada em países do Velho e do Novo Mundo, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (L.), que se multiplicam obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (macrófagos). Estes protozoários fazem parte da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, com inúmeras espécies patogênicas para o ser humano e diferentes espécies de mamíferos. Dois subgêneros são importantes do ponto de vista de saúde pública, *Leishmania* (L.) e *Viannia* (V.). O primeiro ocorre nas Américas, Europa, Ásia e África, enquanto o subgênero *Viannia* ocorre na região Neotropical (WHO, 2010; 2017).

Estes parasitas apresentam um ciclo de vida heteroxênico, com hospedeiros mamíferos vertebrados (ser humano, cães e animais silvestres) e um inseto vetor invertebrado (fêmeas de flebotomíneos infectados) da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, este responsável pela transmissão da doença (AKHOUNDI et al., 2016; LUKES et al., 2007; WHO, 2010).

A leishmaniose se apresenta de três formas: leishmaniose tegumentar, muco-cutânea e leishmaniose visceral. O sinal mais evidente da forma cutânea são as úlceras na pele. Na forma muco-cutânea, as úlceras afetam não somente a pele, como também a mucosa da boca e narinas. O quadro clínico inicial da forma visceral são úlceras na pele, febre, diminuição do número de glóbulos vermelhos e aumento de volume do baço e fígado. (FERREIRA et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2013; COSTA & COSTA, 2014).

Nas Américas, várias espécies pertencentes a ambos os subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, podem ocasionar a leishmaniose tegumentar (WHO, 2010). No Brasil, sete espécies são particularmente associadas: *Leishmania (L.) amazonensis* e as espécies do subgênero *Viannia*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) lindenberg*. Os principais vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose tegumentar no país são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcome* e *Lutzomyia migonei* (WHO, 2017).

Já a leishmaniose visceral é a forma mais severa dessas enfermidades. Esta ocorre pela infecção por *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* na Europa, Ásia e África e por *Leishmania (L.) infantum* nas Américas (WHO, 2017).

Roedores, canídeos, marsupiais e primatas são exemplos de mamíferos que podem servir como hospedeiros desse parasito, por isso, a leishmaniose pode ser classificada como uma zoonose. O ser humano é designado como hospedeiro acidental no ciclo de transmissão e isso ocorre por conta da sua presença em localidades com grandes possibilidades de transmissibilidade. O agente transmissor tem sido encontrado, com frequência, em ambientes domiciliares e peridomiciliares devido à urbanização, mesmo não sendo seu habitat natural, favorecendo então a infecção em humanos (QUINNELL & COURTENAY, 2009; MILLÁN et al., 2014; NEVES et al., 2016).

A leishmaniose tegumentar é endêmica e amplamente distribuída em todo o estado do Espírito Santo. Diferentes técnicas sorológicas, parasitológicas e moleculares têm sido utilizadas para o diagnóstico desta parasitose, entretanto, apresentam sensibilidade e especificidade variáveis (FALQUETO et al., 2003; SASSAKI et al., 2011; FURTADO et al., 2015).

Vários casos de leishmaniose tegumentar em humanos e cães associados a *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram relatados nessa área (FALQUETO et al., 2003). Já a leishmaniose visceral foi registrada pela primeira vez no estado por Martins et al. (1968), nos municípios de Colatina e Baixo Guandu (região centro-norte do estado). Feitoza et al. (2001) relataram três

casos de leishmaniose visceral nos municípios de Rio Novo do Sul e Vargem Alta, na região sul do estado do Espírito Santo, e Falqueto et al. (2009) obtiveram resultados positivos para *Leishmania (L.) infantum* em cães e humanos no sudeste e centro-norte do estado do Espírito Santo.

Doenças causadas por tripanossomatídeos, como a leishmaniose, estão relacionadas ao desmatamento e colonização, acelerados pelo crescimento econômico desde o início do século XX. O crescente desmatamento da mata atlântica possibilitou o aumento dos casos de leishmaniose visceral e cutânea. Complementa-se ao fato, o pouco conhecimento sobre a diversidade de parasitas deste gênero, somado a casos da doença em animais domésticos e em humanos no estado do Espírito Santo, além do papel de pequenos mamíferos silvestres como hospedeiros.

A detecção de *Leishmania* em reservatórios silvestres com o uso de parâmetros parasitológicos e moleculares, contribuirão para o amplo estudo da diversidade de *Leishmania* no estado do Espírito Santo, melhorando o conhecimento epidemiológico da área estudada, atualizando a lista de espécies, além de um conhecimento do parasita citado, sendo que os resultados obtidos poderão favorecer nas decisões de futuras medidas de controle desse agente nas espécies estudadas, pois até o momento, é escassa a pesquisa desta doença no estado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de infecção natural por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres, encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural) em três regiões do estado do Espírito Santo.

#### 5.1.4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 5.1.4.1. ÁREA AMOSTRADA, COLETA DE MATERIAIS E EXAME CLÍNICO

A pesquisa foi realizada em 3 regiões do estado do Espírito Santo (Figura 1.1): rodovia BR 482 e arredores com áreas fragmentadas de mata atlântica no município de Alegre (A) (20° 45' 48" S e 41° 32' 2" W), rodovia BR 101 e

arredores com áreas fragmentadas de mata atlântica no município da Serra (B) (20° 7' 46" S e 40° 18' 29" W) e na Reserva Biológica de Sooretama (C) (19° 3' 22" S e 40° 8' 50" W).

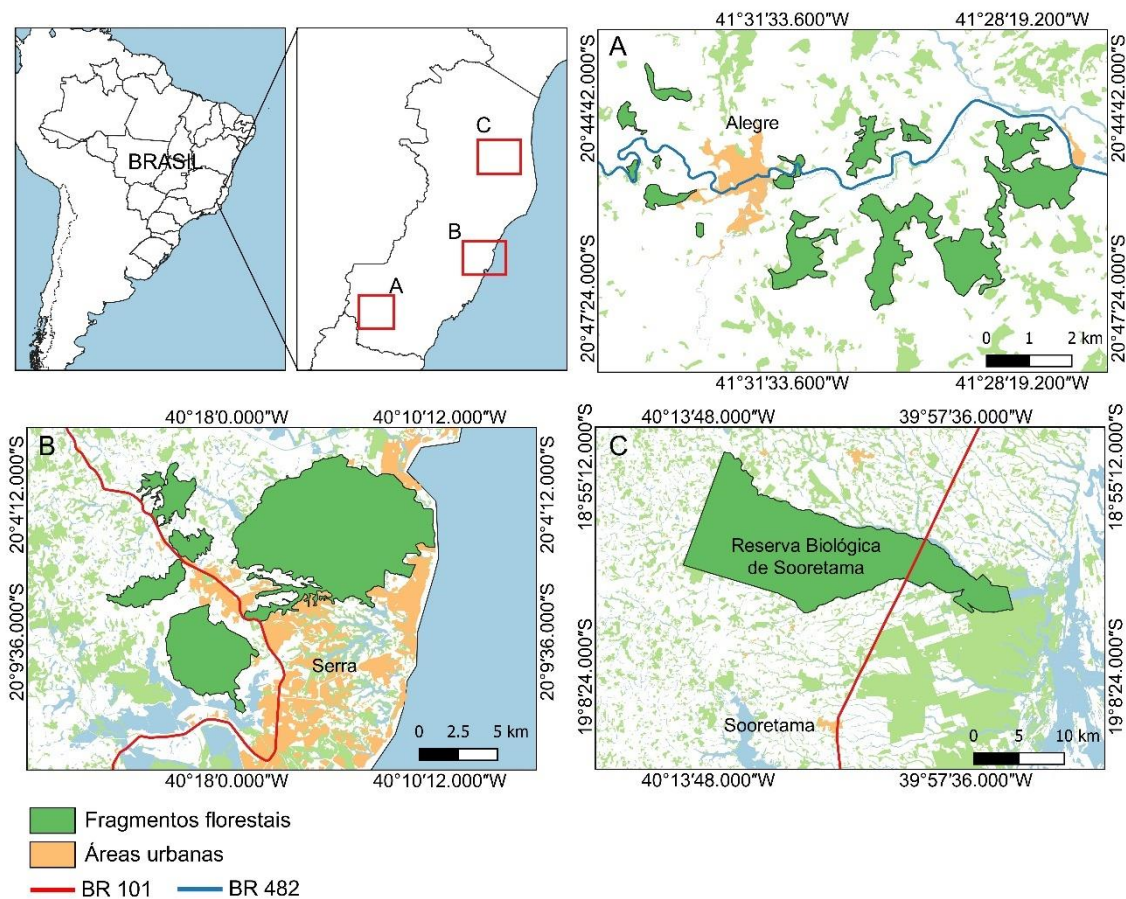


Figura 1.1. Localização das áreas de realização da pesquisa. A: Região de Alegre; B: Região da Serra; C: Reserva Biológica de Sooretama.

Fonte: Instituto Jones dos Santos Neves e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (modificado pelo autor).

Foram coletados 119 mamíferos silvestres encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural) em três regiões do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019. Os animais foram recolhidos por funcionários da Reserva Biológica de Sooretama, do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) da Serra-ES, e por alunos e funcionários do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES) de Alegre-ES. Estes foram identificados e armazenados a -20°C. Posteriormente, os animais foram encaminhados ao Laboratório de Patologia

Veterinária, do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, onde foi realizado o exame clínico destes animais em busca de sinais da doença, como: palidez de mucosa, congestão ou icterícia, emagrecimento, aumento de linfonodos e lesões cutâneas; e em seguida foram necropsiados. Fragmentos de linfonodos, baço e fígado de 100 animais foram coletados e foram fixados em formalina neutra tamponada a 10% para análise histopatológica e somente fragmentos de linfonodos foram armazenados em micro tubos a -20°C para posterior análise molecular.

#### 5.1.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada de 100 amostras de linfonodos armazenadas a -20°C, conforme Sambrook et al. (1989), por meio do método de Fenol/Clorofórmio no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do CCAE-UFES. O DNA foi extraído a partir de 10 mg de tecido em um micro tubo, onde foi feita a lise das células adicionando 490 µl do tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 6,0; EDTA 10 mM, pH 8,0; NaCl 50 mM; SDS 0,2%), junto com 10 µl de proteinase K (20mg/ml), seguida de sua incubação à 56°C por 3 horas para completa lise do tecido. Após este tempo, foi adicionado 500 µl de PCI (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, pH 8.0); o micro tubo foi homogenizado e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, e em seguida foi aspirado o sobrenadante e este transferido para outro micro tubo, onde foi acrescentado 750 µl de etanol absoluto previamente resfriado. O micro tubo foi homogeneizado e colocado no freezer a -20°C por, no mínimo, 1 hora. Em seguida, foi feita sua centrifugação a 12.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi desprezado (nesta etapa houve a formação do pellet). Por fim, foi então adicionado ao micro tubo 750 µl de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 15 minutos, em seguida todo o álcool foi desprezado (esta etapa com o etanol 70% foi repetida por mais uma vez). A seguir o pellet de DNA foi secado em uma centrífuga a vácuo (Eppendorf – Concentrator Plus) por 10 minutos a 30°C para retirada total do álcool e então ressuscitado com 50 µl de água destilada e aquecido em termobloco (56°C por 5 minutos) para dissolução do pellet. Para avaliação quanto ao grau de pureza e quantidade de DNA obtido na extração,

foi realizada a quantificação de DNA das amostras em espectrofotômetro UV (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) utilizando 1 µl da suspensão. Logo após, o DNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização em testes moleculares.

#### 5.1.4.3. TÉCNICA CONVENCIONAL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA *Leishmania* spp. E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a pesquisa de *Leishmania* spp., 100 amostras de DNA de linfonodos foram submetidas a PCR utilizando-se oligonucleotídeos de alta sensibilidade (primers) denominados D1, D2 e D3 que amplificam um fragmento de 120 pares de bases (bp) da região conservada do minicírculo do kDNA mitocondrial de *Leishmania* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) 32mazonenses*) adaptado de Rocha et al. (2010) (Tabela 1.1).

As reações foram realizadas pela técnica de PCR convencional juntamente com o grupo de pesquisa EPICONTROL (Carnívoros) no Laboratório Pet Parasit Lab do Departamento de Sanidade Animal da Universidade Complutense de Madri (UCM) – Espanha, utilizando um volume de 25 µl, contendo 2,0 µl da amostra de DNA genômico extraído (500 ng/µl) e 23 µl de Master Mix da marca Biotools®, Espanha – (17,8 µl de água destilada, 2,5 µl de Buffer 10x/ MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 0,7 µl de Taq DNA polimerase (1 U/µl), 0,5 µl de dNTP (10 mM) e 0,5 µl de cada primer D1, D2 e D3 (15 pmol)). A reação foi conduzida à um termociclador GenAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems®, ThermoFischer, Espanha) com as condições de amplificação detalhadas na Tabela 1.1. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Para o controle positivo, amostras de sangue de um cão de Madri (Espanha) com os parasitos detectados pela microscopia foram utilizadas, e amostras de meio de cultura de *Leishmania* spp. cultivadas em laboratório (Brasil) também foram utilizadas.



Tabela 1.1: Primers utilizados para pesquisa de *Leishmania* spp.

Região Amplificada	Primers	Condições de amplificação			Referência
		T°C	Tempo em minutos (') e segundos (")	Nº ciclos	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' (D1)	95	5' (Desnaturação inicial)	1	Rocha et al., (2010)
<i>L. (L.) infantum</i>	5'-CCGCCCTATTTTACACCAACCCC-3' (D2)	95	1' (Desnaturação intermediária)	29	
<i>L. (L.) 33mazonenses</i>	5'-GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3' (D3)	55	30'' (Anelamento)	29	
		72	10'' (Extensão intermediária)	29	
kDNA minicircle (120 bp)		72	5' (Extensão final)	1	
		4	∞ (Fim da reação)		

Após amplificação dos produtos da PCR da região conservada do minicírculo do kDNA mitocondrial, a análise foi realizada em gel de agarose a 1,5% por eletroforese. O gel foi preparado com 1,5 g de agarose e 100 mL de tampão TBA 1X (Tris-acetato 0,04 mM, EDTA 0,001 mM pH 8,0), adicionado de 9 µL de SYBR Green 10000X (Invitrogen, Espanha), com pentes de 20 poços. Foram pipetados na última canaleta de cada gel 5,0 µL do marcador de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen Espanha), e nas demais canaletas, 3,3 µL de tampão de carga com 25 µL de produto da PCR. O tampão de corrida utilizado foi o TBA 1X (Tris-acetato 0,04 mM, EDTA 0,001 mM pH 8,0), e a análise dos produtos foi feita em um cromatógrafo PowerPac™, Bio-Rad à 86V por 30 minutos. Em seguida, o produto amplificado foi visualizado e foto documentado em um trans iluminador UV Bio-Rad.

#### 5.1.4.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As amostras de linfonodos, baço e fígado fixadas em formalina neutra tamponada a 10% foram encaminhadas ao Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As amostras dos animais positivos pela PCR foram incluídas em parafina, cortadas a 5 µm de espessura, coradas pela hematoxilina-eosina (HE), e então, examinadas em microscópio óptico para pesquisa da forma amastigota do gênero *Leishmania* (PROPHET et al., 1992).

#### 5.1.4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita análise descritiva das observações para o cálculo das frequências absolutas e relativas deste estudo.

#### 5.1.4.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização deste trabalho foi obtida autorização para uso de animais, com finalidade científica pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES), sob o número de protocolo 65/2017 (Anexo A), e a licença junto ao Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade (SISBIO), emitida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) de nº 31762-6 e 69935-1, para colheita e transporte de animais (Anexo B e C).

#### 5.1.5. RESULTADOS

Os 119 animais silvestres e sinantrópicos capturados neste estudo distribuíram-se em 15 espécies diferentes de mamíferos, dos quais 10 animais foram provenientes da região de Alegre-ES, 49 animais da região da Serra-ES e 60 animais provenientes da Reserva Biológica (REBIO) de Sooretama-ES. As espécies *Didelphis aurita* 26,1% (31/119), *Callithrix geoffroyi* 26,1% (31/119) e *Cerdocyon thous* 14,3% (17/119) foram as principais encontradas (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Animais silvestres e sinantrópicos encontrados em diferentes regiões no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019.

Espécie	Regiões			Total	%
	Alegre-ES	Serra-ES	Sooretama-ES		
<i>Coendou prehensilis</i>	2	2	0	4	3,4
<i>Didelphis aurita</i>	3	22	6	31	<b>26,1</b>
<i>Cuniculus paca</i>	0	0	6	6	6
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	0	0	2	2	1,7
<i>Dasypus novemcinctus</i>	0	2	5	7	5,9
<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	17	13	31	<b>26,1</b>
<i>Sapajus robustus</i>	0	0	2	2	1,7
<i>Cercopithecus thous</i>	3	1	13	17	<b>14,3</b>
<i>Procyon cancrivorus</i>	0	0	3	3	2,5
<i>Nasua nasua</i>	0	0	1	1	0,8
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0	1	2	1,7
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0	2	7	9	7,6
<i>Mustela putorius furo</i>	0	0	1	1	0,8
<i>Mazama gouazoubira</i>	0	2	0	2	1,7
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	0	1	0	1	0,8
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>49</b>	<b>60</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

Dentre os animais capturados, 19 foram descartados e não utilizados para a pesquisa, por estarem autolisados e/ou com amostras insuficientes para as análises, sendo: 1 *Coendou prehensilis*, 3 *Didelphis aurita*, 2 *Cuniculus paca*, 4 *Dasypus novemcinctus*, 1 *Callithrix geoffroyi*, 1 *Sapajus robustus*, 1 *Cercopithecus thous*, 1 *Procyon cancrivorus*, 1 *Leopardus pardalis* e 4 *Tamandua tetradactyla*, restando 100 animais viáveis para a pesquisa, sendo 8 (8%) animais provenientes de Alegre, 45 (45%) de Serra e 47 (47%) animais de Sooretama (Tabela 1.3).

Tabela 1.3: Animais silvestres e sinantrópicos utilizados para pesquisa de *Leishmania* spp., encontrados em diferentes regiões no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019.

Espécie	Regiões			Total	%
	Alegre-ES	Serra-ES	Sooretama-ES		
<i>Coendou prehensilis</i>	1	2	0	3	3
<i>Didelphis aurita</i>	2	20	6	28	<b>28</b>
<i>Cuniculus paca</i>	0	0	4	4	4
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	0	0	2	2	2
<i>Dasypus novemcinctus</i>	0	1	2	3	3
<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	17	12	30	<b>30</b>
<i>Sapajus robustus</i>	0	0	1	1	1
<i>Cerdocyon thous</i>	3	1	12	16	<b>16</b>
<i>Procyon cancrivorus</i>	0	0	2	2	2
<i>Nasua nasua</i>	0	0	1	1	1
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0	0	1	1
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0	1	4	5	5
<i>Mustela putorius furo</i>	0	0	1	1	1
<i>Mazama gouazoubira</i>	0	2	0	2	2
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	0	1	0	1	1
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>45</b>	<b>47</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>%</b>	<b>8</b>	<b>45</b>	<b>47</b>		

Do total de animais utilizados, 60 (60%) eram machos e 40 (40%) eram fêmeas. Na região de Alegre, 3 (37,5%) eram machos e 5 (62,5%) eram fêmeas; na Serra, 27 (60%) eram machos e 18 (40%) eram fêmeas, e na região de Sooretama 30 (63,9%) eram machos e 17 (36,1%) eram fêmeas (Tabela 1.4). Do total de machos utilizados neste estudo, 5% (n=3) era de Alegre, 45% (n=27) era da Serra e 50% (n=30) era de Sooretama. E do total de fêmeas utilizadas neste estudo, 12% (n=5) era de Alegre, 45% (n=18) era da Serra e 43% (n= 17) era de Sooretama (Figura 1.2).

Tabela 1.4: Animais silvestres e sinatrópicos, discriminados por sexo, utilizados para pesquisa de *Leishmania* spp., encontrados nas diferentes regiões do estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019.

Espécie	Regiões												% Total	
	Alegre-ES				Serra-ES				Sooretama-ES					
	♂	%	♀	%	♂	%	♀	%	♂	%	♀	%	♂	♀
<i>Coendou prehensilis</i>	0	-	1	100	2	100	0	-	0	-	0	-	2	1
<i>Didelphis aurita</i>	0	-	2	100	7	35	13	65	5	83,3	1	16,7	12	16
<i>Cuniculus paca</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	3	75	1	25	3	1
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2	100	0	2
<i>Dasyus novemcinctus</i>	0	-	0	-	0	-	1	100	0	-	2	100	0	3
<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	100	0	-	14	82,3	3	17,7	9	75	3	25	24	6
<i>Sapajus robustus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	100	0	1
<i>Cerdocyon thous</i>	2	66,7	1	33,3	1	100	0	-	9	75	3	25	12	4
<i>Procyon cancrivorus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	2	100	0	-	2	0
<i>Nasua nasua</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	100	0	1
<i>Leopardus pardalis</i>	0	-	1	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0	-	0	-	1	100	0	-	2	50	2	50	3	2
<i>Mustela putorius furo</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	100	0	1
<i>Mazama gouazoubira</i>	0	-	0	-	1	50	1	50	0	-	0	-	1	1
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	0	-	0	-	1	100	0	-	0	-	0	-	1	0
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>37,5</b>	<b>5</b>	<b>62,5</b>	<b>27</b>	<b>60</b>	<b>18</b>	<b>40</b>	<b>30</b>	<b>63,9</b>	<b>17</b>	<b>36,1</b>	<b>60</b>	<b>40</b>

Nota: ♂- Macho; ♀- Fêmea.

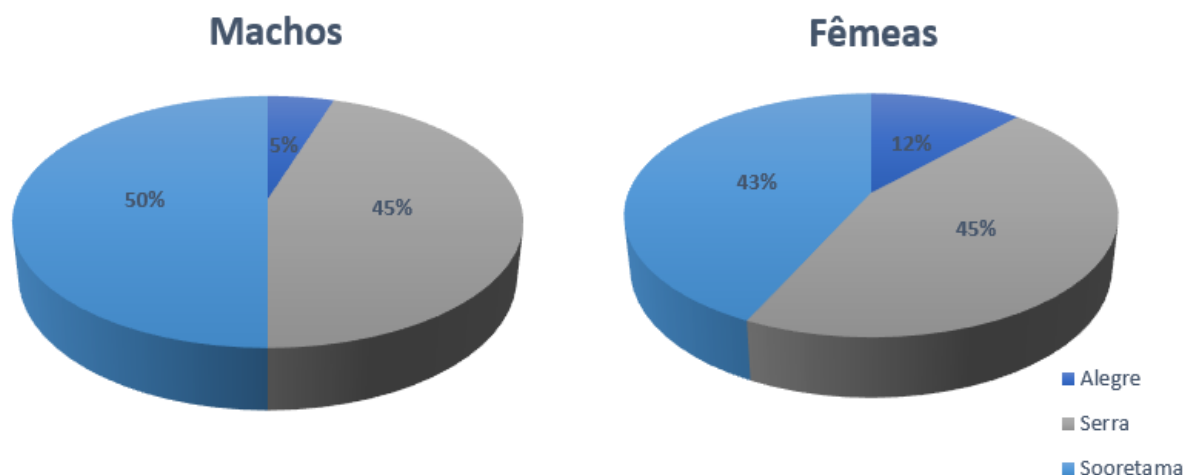


Figura 1.2. Frequência relativa do total de machos e fêmeas utilizados na pesquisa de *Leishmania* spp. nas diferentes regiões do estado do Espírito Santo.

Dos animais utilizados para a pesquisa de *Leishmania* spp. discriminados pela condição biológica, 25 (25%) eram jovens e 75 (75%) eram adultos. Na região de Alegre, 2 (25%) eram jovens e 6 (75%) eram adultos; na Serra, 19

(42,2%) eram jovens e 26 (57,8%) eram adultos, e na região de Sooretama 4 (8,5%) eram jovens e 43 (91,5%) eram adultos (Tabela 1.5). Do total de jovens utilizados neste estudo, 8% (n=2) era de Alegre, 76% (n=19) era da Serra e 16% (n=4) era de Sooretama. E do total de adultos utilizadas neste estudo, 8% (n=6) era de Alegre, 34,7% (n=26) era da Serra e 57,3% (n=43) era de Sooretama (Figura 1.3).

Tabela 1.5: Animais silvestres e sinatrópicos, discriminados pela condição biológica, utilizados para pesquisa de *Leishmania* spp., encontrados em diferentes regiões no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019

Espécies	Regiões												% Total	
	Alegre-ES				Serra-ES				Sooretama-ES					
	J	%	A	%	J	%	A	%	J	%	A	%	J	A
<i>Coendou prehensilis</i>	0	-	1	100	0	-	2	100	0	-	0	-	0	3
<i>Didelphis aurita</i>	0	-	2	100	11	55	9	45	0	-	6	100	11	17
<i>Cuniculus paca</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	2	50	2	50	2	2
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2	100	0	2
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	0	-	0	-	0	-	1	100	1	50	1	50	1	2
<i>Callithrix geoffroyi</i>	0	-	1	100	7	41,1	10	58,9	0	-	12	100	7	23
<i>Sapajus robustus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	100	0	1
<i>Cerdocyon thous</i>	2	66,7	1	33,3	0	-	1	100	0	-	12	100	2	14
<i>Procyon cancrivorus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2	100	0	2
<i>Nasua nasua</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	100	0	1
<i>Leopardus pardalis</i>	0	-	1	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0	-	0	-	0	-	1	100	0	-	4	100	0	5
<i>Mustela putorius furo</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	1	100	0	-	1	0
<i>Mazama gouazoubira</i>	0	-	0	-	1	50	1	50	0	-	0	-	1	1
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	0	-	0	-	0	-	1	100	0	-	0	-	0	1
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>25</b>	<b>6</b>	<b>75</b>	<b>19</b>	<b>42,2</b>	<b>26</b>	<b>57,8</b>	<b>4</b>	<b>8,5</b>	<b>43</b>	<b>91,5</b>	<b>25</b>	<b>75</b>

Nota: J- Jovem; A- Adulto

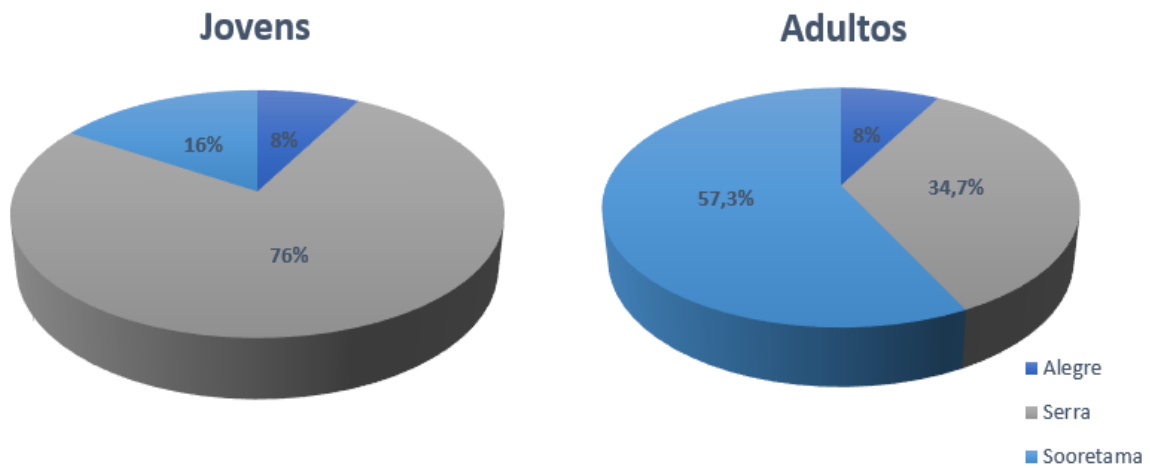


Figura 1.3. Frequência relativa do total de jovens e adultos utilizados na pesquisa de *Leishmania spp.* nas diferentes regiões do estado do Espírito Santo.

O DNA extraído das 100 amostras de linfonodos das diferentes espécies de mamíferos, após quantificação em espectrofotômetro UV a 260 nm, ofereceu uma concentração ao redor de 500 ng/μl e uma pureza entre 1,8 e 2,2 pela relação 260/280 nm.

Das 100 amostras de linfonodos de mamíferos silvestres testadas pela PCR para o gênero *Leishmania spp.* (kDNA mitocondrial), 4 (4%) apresentaram resultados positivos (Figura 1.4).

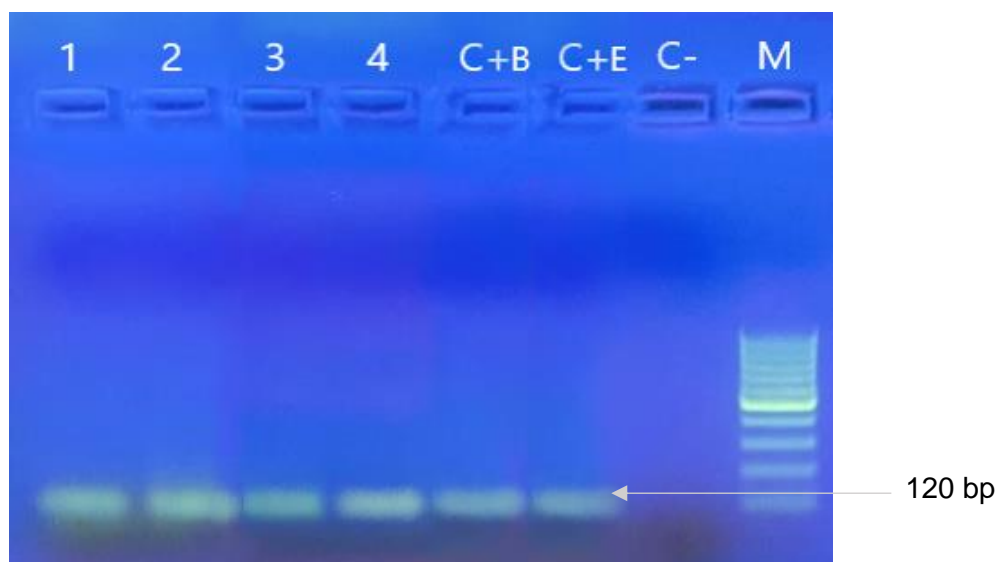


Figura 1.4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado por SYBR® Green, mostrando produtos de PCR de 120 bp de amostras positivas de linfonodos amplificados, a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gênero *Leishmania*. 1: Amostra positiva de *Cuniculus paca*; 2,3,4: Amostras positivas de *Callithrix geoffroyi*; (C+B): Controle positivo Brasil; (C+E): Controle positivo Espanha; (C-): Controle negativo; M: Marcador de peso molecular. Produto de amplificação de 120 bp encontra-se indicado por seta.

Nenhum dos animais de Alegre e Serra apresentou resultado positivo para as amostras de linfonodos. Todas as amostras positivas foram provenientes da Reserva Biológica de Sooretama. Das 4 amostras positivas, 1 foi da espécie *Cuniculus paca* e 3 da espécie *Callithrix geoffroyi* (Figura 1.5).



Figura 1.5. Animais silvestres positivos para *Leishmania* spp. A: *Cuniculus paca*; B, C, D: *Callithrix geoffroyi*.

Do total de amostras de DNA de *Cuniculus paca* testadas (n=4), 1 (25%) foi positiva para *Leishmania* spp., sendo todas da Reserva Biológica de Sooretama. Das 30 amostras de DNA de *Callithrix geoffroyi* testadas, 3 (10%) foram positivas para *Leishmania* spp. Todas as espécies de *Callithrix geoffroyi* positivas foram da Reserva Biológica de Sooretama ( $3/12 = 25\%$ ) (Tabela 1.6).



Tabela 1.6: Resultados de infecção natural por *Leishmania* spp., por meio da PCR, a partir de amostras de linfonodos.

Espécies	Municípios										
	Alegre-ES			Serra-ES			Sooretama-ES			N Total	%
	N	PCR+	%	N	PCR+	%	N	PCR+	%		
<i>Coendou prehensilis</i>	1	0	0,0	2	0	0,0	0	0	0,0	3	0,0
<i>Didelphis aurita</i>	2	0	0,0	20	0	0,0	6	0	0,0	28	0,0
<i>Cuniculus paca</i>	0	0	0,0	0	0	0,0	4	1	25,0	4	25,0
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	0	0	0,0	0	0	0,0	2	0	0,0	2	0,0
<i>Dasyus novemcinctus</i>	0	0	0,0	1	0	0,0	2	0	0,0	3	0,0
<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	0	0,0	17	0	0,0	12	3	25,0	30	10,0
<i>Sapajus robustus</i>	0	0	0,0	0	0	0,0	1	0	0,0	1	0,0
<i>Cerdocyon thous</i>	3	0	0,0	1	0	0,0	12	0	0,0	16	0,0
<i>Procyon cancrivorus</i>	0	0	0,0	0	0	0,0	2	0	0,0	2	0,0
<i>Nasua nasua</i>	0	0	0,0	0	0	0,0	1	0	0,0	1	0,0
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	1	0,0
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0	0	0,0	1	0	0,0	4	0	0,0	5	0,0
<i>Mustela putorius furo</i>	0	0	0,0	0	0	0,0	1	0	0,0	1	0,0
<i>Mazama gouazoubira</i>	0	0	0,0	2	0	0,0	0	0	0,0	2	0,0
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	0	0	0,0	1	0	0,0	0	0	0,0	1	0,0
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>45</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>47</b>	<b>4</b>	<b>8,5</b>	<b>100</b>	<b>4,0</b>

Nota: N= n° de animais analisados (amostras de linfonodos). PCR+= PCR positivo.

Todos os animais testados positivos (100%) pela PCR eram machos e adultos (Tabela 1.7).

Tabela 1.7: Comparação entre sexo e condição biológica dos animais positivos para *Leishmania* spp. encontrados no estado do Espírito Santo, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019.

Espécies	♂	%	♀	%	J	%	A	%
<i>Cuniculus paca</i>	1	100	0	-	0	-	1	100
<i>Callithrix geoffroyi</i>	3	100	0	-	0	-	3	100
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>100</b>

Nota: ♂- Macho; ♀- Fêmea; J- Jovem; A- Adulto

A avaliação clínica mostrou que 77% (77/100) dos animais analisados foram clinicamente afetados, com alterações como: hemorragia, traumatismo craniano, fraturas, feridas perfurantes e edema, não caracterizando sinais aparentes da doença. Possivelmente, essas alterações se devem ao fato de esses animais terem sido encontrados mortos na natureza (por atropelamento

ou morte natural). Uma espécie positiva de *Cuniculus paca* exibiu lesão perfurante e 2 dos 3 saguis (*Callithrix geoffroyi*) positivos para PCR apresentaram traumatismo craniano.

Na análise histopatológica de linfonodo, baço e fígado dos animais positivos, a forma amastigota do parasita não foi observada nos macrófagos. Alterações como infiltrado inflamatório de células mononucleares também não foram observadas.

#### 5.1.6. DISCUSSÃO

Dos métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional tem mostrado alta sensibilidade e especificidade para detecção do DNA de *Leishmania*. A amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* spp. pela PCR tem sido realizada a partir de diferentes tipos de tecidos, como os linfonodos, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue, sem a necessidade de exaustivos isolamentos do parasita. Esta técnica tem sido utilizada para detectar a infecção em animais silvestres de áreas endêmicas, permitindo a identificação de possíveis reservatórios (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; CUNHA et al., 2014; GONTIJO & MELO, 2004; JIMÉNEZ et al., 2013; WHO, 2010).

No presente estudo, das 100 amostras de linfonodos de mamíferos silvestres testadas pela PCR convencional, 4 (4%) apresentaram resultados positivos para *Leishmania* spp. Dentre elas, 1 foi da espécie do roedor *Cuniculus paca* e 3 foram da espécie do primata não humano *Callithrix geoffroyi*.

Na análise histopatológica de linfonodo, baço e fígado dos 4 animais positivos pela PCR no presente estudo, não foi observada a forma amastigota de *Leishmania* spp. parasitando macrófagos, tampouco infiltrado de células inflamatórias nestes tecidos. Segundo Solano-Gallego et al. (2011), a técnica histopatológica permite a detecção direta do próprio parasita e do tipo de resposta inflamatória, como: achados suspeitos da infecção e, também a exclusão de outros diagnósticos diferenciais; porém possui baixa sensibilidade para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em tecidos ou fluidos corporais; não revela o estado imunológico do cão e requer a realização de

outros testes para diagnóstico definitivo, como imuno-histoquímica e/ou PCR, quando os parasitas não são visualizados.

Do total de amostras de DNA do roedor *Cuniculus paca* testadas pela PCR (n=4) neste estudo, 1 (25%) foi positiva para *Leishmania* spp., semelhante a estudos de Silveira et al. (1991) que relataram o primeiro registro do isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* em *Cuniculus paca* no estado do Pará. Após a necropsia destes animais, a pele aparentemente íntegra era preparada em solução salina e o produto era inoculado nas patas posteriores de hamsters. Após três meses, foi observado típico desenvolvimento de lesão nodular eritematosa nas patas posteriores de 6 hamsters. Das lesões, foram feitas preparações coradas por Giemsa e novas preparações em meio de cultura para posterior análise bioquímica pela eletroforese de isoenzimas, confirmando a presença desta espécie de *Leishmania*.

Segundo pesquisa de Forattini (1960), que examinou 928 animais silvestres na região de Teodoro Sampaio no estado de São Paulo, havia 1 paca (*Cuniculus paca*) positiva para *Leishmania* sp. por meio de hemocultura, corroborando com achados do presente estudo.

Estudos de Caldart et al. (2017) com roedores sinantrópicos capturados na cidade de Londrina, no estado do Paraná, constataram a presença de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* através da PCR em 9 de 127 animais (7,1%). Sendo este o primeiro relato de roedores sinantrópicos naturalmente infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* no mundo e por *Leishmania (L.) infantum* no sul do Brasil. Dos 9 animais positivos, 6 (66,7%) eram fêmeas e 6 (66,7%) eram adultos.

Em relação aos achados no presente estudo, o índice de 4% dos animais naturalmente infectados por *Leishmania* spp. é menor que os revelados em Mato Grosso por Freitas (2010), que detectaram 7,95% de positividade por *Leishmania (Viannia) sp.* em amostras de pele oriundas de roedores.

No presente estudo também foram observados resultados positivos pela PCR de amostras de linfonodos de *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca). Esta espécie de primata não humano é endêmica no Brasil e está presente nos estados da Bahia, Espírito Santo, Nordeste de Minas Gerais como residente e nativo, e em Santa Catarina, onde foi introduzido (RYLANDS & MENDES, 2008).

Existem várias descrições no Brasil e no mundo de infecção por *Leishmania* em primatas não humanos. Os resultados do presente estudo são semelhantes com pesquisas de Paiz et al. (2019), que detectaram *Leishmania (L.) infantum* em 7 primatas do gênero *Callithrix*, provenientes de fragmentos florestais em uma área endêmica para leishmaniose visceral canina no município de Campinas, São Paulo, sendo 2 animais da espécie *Callithrix jacchus* e 5 animais da espécie *Callithrix penicillata*, confirmados pela PCR de sangue e pele. Em um outro estudo de Paiz et al. (2015), foi relatado 1 caso positivo de *Leishmania (L.) infantum* em um primata da espécie *Callithrix jacchus* em uma região não endêmica para leishmaniose em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil.

Em uma pesquisa de Miró et al. (2018), foram relatados os dois primeiros casos de leishmaniose em orangotangos da espécie *Pongo pygmaeus pygmaeus* de um centro de reabilitação e de um zoológico em Madri. Esta foi a primeira notificação de infecção por *Leishmania (L.) infantum* em primatas não humanos na Espanha.

Em um relato em macaco sauá (*Callicebus nigrifrons*), que desenvolveu a doença com quadro clínico (sinais e sintomas) compatível com leishmaniose, a *Leishmania (L.) infantum* foi confirmada por PCR e imuno-histoquímica (MALTA et al., 2010). Em outro caso em Bauru, São Paulo, Brasil, *Leishmania amazonensis* foi detectada por métodos moleculares em amostras de sangue de um macaco-aranha (*Ateles paniscus*) criado em cativeiro e que demonstrou perda de peso e mucosas pálidas (LIMA et al., 2012). Malta et al. (2010) também detectaram *Leishmania (L.) infantum* por PCR em amostras de sangue de primatas não humanos de um zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, sendo: seis macacos sauá (*Callicebus nigrifrons*), um macaco bugio (*Alouatta guariba*), três macacos-prego do peito amarelo (*Cebus xanthosternos*), um mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus crysomelas*), um macaco-da-noite (*Aotus nigriceps*), dois macacos parauaçu (*Pithecia irrorata*) e três saguis-imperador (*Saguinus imperator*). Estes 17 primatas não humanos não demonstraram sinais clínicos da doença.

Conforme indicado em um estudo realizado por Carneiro et al. (2012), esses primatas infectados eram clinicamente saudáveis, com isso levantaram a hipótese de que os primatas do Novo Mundo desenvolveram um sistema

imunológico inato com mecanismos de resposta capaz de controlar o crescimento intracelular de *Leishmania (L.) infantum* em macrófagos.

No entanto, vários estudos confirmaram uma alta suscetibilidade à infecção por *Leishmania* spp. com sinais cutâneos em macacos coruja (*Atous trivirgatus*) e saguis (*Saguinus geoffroyi*) (HERRER et al., 1973), enquanto em macacos-prego (*Cebus paella*) e cuxiú-preto (*Chiropotes satanus*), a presença de *Leishmania (L.) infantum* foi confirmada (LAINSON et al., 1988; 1989).

Além disso, estudos experimentais demonstraram leishmaniose visceral em macacos neotropicais: macacos-da-noite (*Atous trivirgatus*), macacos-prego (*Cebus paella*), saguis (*Callithrix jacchus jacchus*), macacos-esquilo (*Saimiri sciureus*), em macacos do Velho Mundo (*Cercopithecus aethiops*), macacos-rhesus (*Macaca mullata*) e macacos langur (*Presbytis entellus*) (CHAPMAN et al., 1981; CHAPMAN; HANSON, 1981; MARSDEN et al., 1981; PORROZZI et al., 2006; DUBE et al., 1999; GICHERU et al., 1995; GRIMALDI JR., 2008).

Não há relatos anteriores de *Callithrix geoffroyi* de vida livre infectados com *Leishmania* spp. no Brasil. No entanto, em contraste com os resultados desses autores, os primatas naturalmente infectados examinados no presente estudo não mostraram sinais clínicos de leishmaniose.

Vários casos de leishmaniose foram relatados em todos os estados brasileiros, com várias espécies de flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia* spp., participando do ciclo de transmissão dos parasitas. A leishmaniose cutânea está associada a várias espécies de *Leishmania*, enquanto a manifestação visceral está associada apenas a uma única espécie, a *Leishmania (L.) infantum* (FEITOZA et al., 2001; FALQUETO et al., 2003; 2009; PINTO et al., 2010; 2012; TONINI et al., 2012; MENEGUZZI et al., 2016).

A leishmaniose tegumentar é endêmica e amplamente distribuída em todo o estado do Espírito Santo. Vários casos da doença em humanos e cães associados a *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram relatados nessa área (FALQUETO et al., 2003; 2009).

A leishmaniose visceral foi registrada pela primeira vez por Martins et al. (1968), nos municípios de Colatina e Baixo Guandu, região centro-norte do Espírito Santo. Falqueto et al. (2009) obtiveram resultados positivos para *Leishmania (L.) infantum* em 47% das pessoas e 57% dos cães testados em áreas endêmicas do município de Pancas, também no estado. A maioria dos

relatos consistiram em testes sorológicos, exceto nos cães, onde o parasita foi isolado. Em estudo de Tonini et al. (2012) foi descrito o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina em Vitória, capital do estado.

Feitoza et al. (2001) relataram o registro de três casos de leishmaniose visceral nos municípios de Rio Novo do Sul e Vargem Alta, na região sul do estado do Espírito Santo, por diagnóstico molecular e o agente etiológico isolado de dois pacientes foi identificado como *Leishmania infantum*. A investigação epidemiológica não evidenciou a introdução de imigrantes e também a migração de pessoas doentes ou de seus familiares para áreas endêmicas conhecidas. De uma perspectiva geográfica e climática, a área onde ocorreram novos casos é diferente do padrão encontrado em áreas endêmicas do vale do Rio Doce, na região Centro-Norte do estado.

Pinto et al. (2010) realizaram um estudo com a fauna flebotomínica na região sul do Espírito Santo, na mesma região onde ocorreram casos autóctones de leishmaniose visceral. Nenhuma espécie de *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor de da forma visceral da doença no Novo Mundo, foi capturada nos locais em estudo. Isto contribui para o conhecimento da fauna flebotomínica na região e ressalta a possibilidade de participação de outras espécies de flebotomíneos, além da espécie *Lutzomyia longipalpis*, na transmissão da leishmaniose visceral.

Já Pinto et al. (2012) coletaram os flebotomíneos em 164 localidades de 9 municípios do norte do Espírito Santo, com registro prévio de leishmaniose visceral em humanos, entre os anos de 1989 e 2003, totalizando 250 capturas de 62.469 flebotomíneos pertencentes a 17 espécies. As espécies predominantes capturadas foram *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia longipalpis*. Este estudo revelou que *Lutzomyia longipalpis* parece ser o principal vetor de *Leishmania infantum* na biodiversidade da Mata Atlântica do estado, devido a sua alta prevalência e distribuição semelhante na área de proliferação da doença. Além disso, *Lutzomyia longipalpis* foi demonstrado ter preferências por áreas de clima seco nesta região.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, o número de casos confirmados de pessoas infectadas com leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo entre 2008 e 2018 foi de 1.324, com incidência em todo o estado. Os municípios mais acometidos com o número de casos da doença foram Afonso Cláudio, Brejetuba, Cariacica, Guarapari, Ibatiba, Santa Leopoldina, Linhares e

São Mateus. Já o número de casos confirmados de leishmaniose visceral entre 2008 e 2018 foi de 62, com incidência principalmente na região centro-norte do estado. Os municípios mais acometidos nos últimos anos foram Baixo Guandu, Pancas e Cariacica (BRASIL, 2020).

Nossos resultados indicam a presença de *Leishmania* spp. nesta região, podendo haver muitos reservatórios em potencial e vetores (flebotomíneos) que compartilham o mesmo habitat, já que estas espécies silvestres foram infectadas. Assim, poderá haver um risco de transmissão de *Leishmania* spp. a outros animais suscetíveis vivendo em áreas próximas, bem como para os seres humanos.

A participação de roedores e primatas como reservatórios silvestres de *Leishmania* spp. já havia sido sugerido na década de 60 e 70 (FORATTINI, 1960; HERRER et al., 1973). Estes achados reforçam a hipótese de que os roedores e primatas (silvestres e sinantrópicos) têm papel importante como reservatórios de *Leishmania* spp. no ciclo silvestre e peridoméstico do parasito.

#### 5.1.7. CONCLUSÕES

- A infecção natural por *Leishmania* spp. detectada em roedor e primata demonstra a participação destas espécies como possíveis reservatórios no ciclo de transmissão da leishmaniose, no estado do Espírito Santo.
- A detecção de *Leishmania* spp. em *Callithrix geoffroyi* constitui o primeiro relato de infecção desta espécie de primata na literatura, e a detecção de *Leishmania* spp. em *Cuniculus paca* constitui o primeiro relato na literatura de infecção desta espécie de roedor, no estado do Espírito Santo.
- Apesar desta confirmação, o papel destas espécies na transmissão dessa doença zoonótica ainda necessita da realização de mais estudos longitudinais, para identificar os efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo, sua flutuação sazonal, estabilidade da infecção e potencial transmissor.

### 5.1.8. AGRADECIMENTOS

Ao apoio técnico e docente do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao grupo EPICONTROL - Pet Parasite Lab da Universidade Complutense de Madrid e aos alunos e professores do Laboratório de Patologia Veterinária e Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, os quais tiveram uma participação fundamental no desenvolvimento da pesquisa, no desenho do estudo, coleta e análise de dados, na preparação do artigo e decisão de publicação.

### 5.1.9. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - Brasil, 2020. Disponível em: [datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agrivos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/](https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agrivos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/).

Acesso em: 14 de maio de 2020.

CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F. P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new



evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 17-27, 2017.

CARNEIRO, L. A.; LAURENTI, M. D.; CAMPOS, M. B.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. P.; SILVEIRA, F. T. Susceptibility of peritoneal macrophage from different species of neotropical primates to ex vivo *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, p. 95-101, 2012.

CHAPMAN, W. L.; HANSON, W. L. Visceral leishmaniasis in the squirrel monkey (*Saimiri sciurea*). **Journal of Parasitology**, v. 67, p. 740-741, 1981.

CHAPMAN, W. L.; HANSON, W. L.; HENDRICKS, L. D. *Leishmania donovani* in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 124-125, 1981.

COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do Continente Americano**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 327-353, 2014.

COURA-VITAL, W.; REIS, A. B.; FAUSTO, M. A.; LEAL, G. G. A.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, M. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from a endemic area of Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 1-9, 2013.

CUNHA, R. C.; ANDREOTTI, R.; COMINETTI, M. C.; SILVA, E. A. Detecção de *Leishmania infantum* em *Lutzomyia longipalpis* capturados em Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 269-273, 2014.

DUBE, A.; SRIVASTAVA, J. K.; SHARMA, P.; CHATURVEDI, A.; KATIYAR, J. C.; NAIK, S. *Leishmania donovani*: cellular and humoral immune responses in Indian langur monkeys, *Presbytis entellus*. **Acta Tropica**, v. 73, p. 37-48, 1999.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHOPAES, L.; GRIMALDI JR., G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1003-1010, 2003.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR., G. Crosssectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 559-565, 2009.

FEITOZA, L. R.; CASTRO, L. L. F. de; RESENDE, M.; ZANGRANDE, M. B.; STOCKING, M. S.; BOREL, R. M. A.; FULIN, E. A.; CERQUEIRA, A. F.; SALGADO, J. S.; FEITOZA, H. N.; FULLIN, E. A.; STOCK, L. A.; DESSAUNE FILHO, N.; MANK, A. M.; FERINGA, W.; MARTINEZ, J. A. **Mapa das Unidades Naturais do Estado do Espírito Santo – Informações básicas**. In: FEITOZA, L. R.; STOCKING, M. S.; RESENDE, M. (eds.). *Natural Resources Information Systems for Rural Development – Approaches for Espírito Santo State, Brazil*. Vitória: INCAPER, p. 212-217, 2001.

FERREIRA, G. E.; DOS SANTOS, B. N.; DORVAL, M. E.; RAMOS, T. P.; PORROZZI, R.; PEIXOTO, A. A.; CUPOLILLO, E. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2012.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 2, p. 195-203, 1960.

FREITAS, T. P. T. A Ecoepidemiologia das Leishmanioses: levantamento de flebotomíneos em Cuiabá e investigação quanto a participação de roedores e marsupiais em Rondonópolis, Mato Grosso. 2010. Dissertação (Mestrado em

Ciências Veterinárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

FURTADO, M. C.; MENEZES, R. C.; KIUPEL, M.; MADEIRA, M. F.; OLIVEIRA, R. V. C.; LANGOHR, I. M.; FIGUEIREDO, F. B. Comparative study of in situ hybridization immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 620, 2015.

GICHERU, M. M.; OLOBO, J. O.; KARIUKI, T. M.; ADHIAMBO, C. Visceral leishmaniasis in vervet monkeys: immunological responses during asymptomatic infections. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 41, p. 202-208, 1995.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI JR., G. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* candidate vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 629-644, 2008.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A.; BEUMER, R. J. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, p. 585-591, 1973.

JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ, E.; IRISO, A.; MARCO, E.; ALEGRET, A.; FUSTER, F.; MOLINA, R. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2453-2459, 2013.

LAINSON, R., SHAW, J. J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A.; SOUZA, A. A.; SILVEIRA, F. T. Isolation of *Leishmania* from monkeys in the Amazon Region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 231, 1988.

LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; DE SOUZA, A. A.; PÔVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A.; SILVEIRA, F. T. *Leishmania (Viannia) shawi* n. sp., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 64, p. 200-207, 1989.

LIMA, V. M.; SANTIAGO, M. E.; SANCHES, L. D. A C.; LIMA, B. D. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, p. 943-945, 2012.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MALTA, M. C. C.; TINOCO, H. P.; XAVIER, M. N.; VIEIRA, A. L. S.; COSTA, E. A.; SANTOS, R. L. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 193-197, 2010.

MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; VEXENAT, A.; COSTA E SILVA, M.; BARRETO, A. C. Experimental *Leishmania chagasi* infections in the marmoset *Callithrix jacchus jacchus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 314-315, 1981.

MARTINS, J.; SOUZA, J. C.; SILVA, E. Primeiros casos autóctones de calazar no Espírito Santo. **O Hospital**, v. 73, p. 69-97, 1968.

MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2005-2014, 2014.

MIRÓ, G.; TROYANO, A.; MONTOYA, A.; FARIÑAS, F.; FERMÍN, M. L.; FLORES, L.; ROJO, C.; CHECA, R.; GÁLVEZ, R.; MARINO, V.; FRAGÍO, C.; MARTÍNEZ-NEVADO, E. First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 185, 2018.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, L. W. A. **Parasitologia Humana**. 13. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, , p. 494, 2016.

PAIZ, L. M.; FORNAZARI, F.; MENOZZI, B. D.; OLIVEIRA, G. C.; COIRO, C. J.; TEIXEIRA, C. R.; DA SILVA, V. M.; DONALISIO, M. R.; LANGONI, H. Serological evidence of infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in free-ranging wild mammals in a nonendemic region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, p. 667-673, 2015.

PAIZ, L. M.; MOTOIE, G.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H.; MENOZZI, B. D.; TOLEZANO, J. E.; DONALISIO, M. R. Antibodies and Molecular Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* in Samples of Free-Ranging Marmosets (Primates: Callitrichidae: *Callithrix spp.*) in an Area of Canine Visceral Leishmaniasis in Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n. 4, p. 249-254, 2019.

PINTO, I. S.; SANTOS, C. B.; GRIMALDI JR., G.; FERREIRA, A. L.; FALQUETO, A. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 2, p. 365-372, 2010.

PINTO, I. S.; FERREIRA, A. L.; VALIM, V.; CARVALHO, F. S.; SILVA, G. M.; FALCÃO, A. L.; DIETZE, R.; FALQUETO, A. Sand fly vectors (*Diptera, Psychodidae*) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, p. 90-96, 2012.

PORROZZI, R.; PEREIRA, M. S.; TEVA, A.; VOLPINI, A. C.; PINTO, M. A.; MARCHEVSKY, R. S.; BABORSA JR, A. A.; GRIMALDI JR., G. *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 926-937, 2006.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN L. H. Laboratory Methods in Histotechnology. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, DC. 279 p., 1992.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

ROCHA, M. N.; MARGONARI, C.; PRESOT, I. M.; SOARES, R. P. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania spp.* typing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 401-409, 2010.

RYLANDS, A. B.; MENDES, S. L. *Callithrix geoffroyi*. In: **IUCN Red List of Threatened Species**, 2008. Version 2011.2. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em: 10 de maio de 2020.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 628, 1989.

SASSAKI, C. Y.; COLODEL, M. M.; FERREIRA, I.; NOGUEIRA, F. S.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; ROCHA, N. S. Comparison of different diagnostic tests in dogs uninfected and naturally infected with visceral leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 348-352, 2011.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca*

(Rodentia: *Dasyproctidae*), no estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 18-22, 1991.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 86, n. 4, p. 1-16, 2011.

TONINI, M. A. L.; LEMOS, E. L.; REIS, A. B.; VITAL, W. C.; DIAS, E. S.; DIETZE, R. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, 2012.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March, 2010. WHO technical report series. n. 949. Geneva: **WHO Press**, 201 p., 2010.

WHO. World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 92, n. 38, p. 557-565, 2017.

## 5.2. CAPÍTULO 2 - INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM MAMÍFEROS SILVESTRES NA RESERVA BIOLÓGICA DE SOORETAMA, ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Investigation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild mammals in the Sooretama Biological Reserve, Espírito Santo, Brazil

### 5.2.1. RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa e de caráter zoonótico, que se apresenta na forma tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar é endêmica e amplamente distribuída em todo o estado do Espírito Santo. Vários casos de leishmaniose tegumentar em humanos e cães associados a *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram relatados no estado. O objetivo deste estudo é investigar a ocorrência de infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em mamíferos silvestres, encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural) na Reserva Biológica de Sooretama, no estado do Espírito Santo. Entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 foram coletados 60 animais. Destes, foram analisados 47 animais viáveis de 12 espécies diferentes. Os resultados foram demonstrados por meio de análise descritiva das observações, para o cálculo das frequências absolutas e relativas dos dados. As espécies *Didelphis aurita* 10% (6/60), *Cuniculus paca* 10% (6/60), *Callithrix geoffroyi* 21,7% (13/60) e *Cerdocyon thous* 21,7% (6/60) foram as mais encontradas. Por meio da PCR, utilizando primers específicos para o gênero *Leishmania* (D1, D2, D3) e para a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (ISVB/ISVC), foi detectado 4 animais positivos (8,5%): 1 *Cuniculus paca* (paca) (25%) e 3 *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca) (25%). A infecção natural, detectada por meio da PCR, por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em *Cuniculus paca* (paca) e em *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca) constitui o primeiro relato de infecção destas espécies de roedor e primata na literatura. Apesar da confirmação de ocorrência de infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em roedor e primata, no estado do Espírito Santo, o papel destas espécies de mamíferos na transmissão desta zoonose ainda necessita de mais estudos longitudinais, para identificar os efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo, sua flutuação sazonal, estabilidade da infecção e transmissibilidade.



**Palavras-chave:** *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Cuniculus paca*; *Callithrix geoffroyi*; Mamíferos Silvestres; Reserva Biológica de Sooretama.

### 5.2.2. ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious and zoonotic disease and presents in cutaneous and visceral forms. Cutaneous leishmaniasis is endemic and widely distributed throughout the state of Espírito Santo, Brazil. Several cases of cutaneous leishmaniasis in humans and dogs associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* have been reported in the state. This study aimed to investigate the occurrence of natural infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in wild mammals, found dead (by trampling or natural death) in the Sooretama Biological Reserve, Espírito Santo State. From January 2018 to December 2019, 60 animals were collected. Of these, 47 viable animals of 12 different species were analyzed. The results were demonstrated using a descriptive analysis of the observations to calculate the absolute and relative frequencies of the data. The species *Didelphis aurita* (black-eared opossum) 10% (6/60), *Cuniculus paca* (paca) 10% (6/60), *Callithrix geoffroyi* (white-faced marmoset) 21.7% (13/60), and *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) 21.7% (6/60) were the most found. In the PCR, using specific primers for the genus *Leishmania* (D1, D2, D3) and the species *Leishmania (Viannia) braziliensis* (ISVB/ISVC), 4 positive animals (8.5%) were detected: 1 *Cuniculus paca* (paca) (25%) and 3 *Callithrix geoffroyi* (white-faced marmoset) (25%). The natural infection, detected by PCR, by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Cuniculus paca* (paca) and *Callithrix geoffroyi* (white-faced marmoset) constitutes the first report of infection of this rodent and primate species in the literature. Despite confirmation of the occurrence of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in rodents and primates, in the state of Espírito Santo, the role of these species in the transmission of this zoonosis still needs further longitudinal studies to identify the effects of a given parasite on the population and/or individual, its seasonal fluctuation, infection stability, and transmissibility.

**Keywords:** *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Cuniculus paca*; *Callithrix geoffroyi*; Wild Mammals; Sooretama Biological Reserve.

### 5.2.3. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa e de caráter zoonótico, registrada em países do Velho e do Novo Mundo, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que se multiplicam obrigatoriamente em células do sistema monocítico fagocitário (macrófagos), se apresentando na forma tegumentar e visceral. Estes protozoários fazem parte da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, com inúmeras espécies patogênicas para o ser humano e diferentes espécies de mamíferos. Dois subgêneros são importantes do ponto de vista de saúde pública, *Leishmania* (L.) e *Viannia* (V.). O primeiro ocorre nas Américas, Europa, Ásia e África, enquanto o subgênero *Viannia* ocorre na região neotropical. (GRAMICCIA, 2011; ROQUE & JANSEN, 2014; WHO, 2010;2017).

A leishmaniose tegumentar é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilagosas da nasofaringe, de forma localizada ou difusa. Nas Américas, várias espécies de ambos os subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, podem ocasionar a doença (WHO, 2010). No Brasil, sete espécies são particularmente associadas: *Leishmania* (L.) *amazonensis* e as espécies do subgênero *Viannia*, *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *naiffi*, *Leishmania* (V.) *shawii*, *Leishmania* (V.) *guyanensis* e *Leishmania* (V.) *lindenberg* (WHO, 2017).

Estes parasitas apresentam um ciclo de vida heteroxênico, com hospedeiros mamíferos vertebrados (seres humanos, cães e animais silvestres) e um inseto vetor invertebrado (família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*), este responsável pela transmissão da doença, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África e ao gênero *Lutzomyia* (Lu.) nas Américas (AKHOUNDI et al., 2016; LUKES et al., 2007; WHO, 2010).

A leishmaniose tegumentar é endêmica e amplamente distribuída em todo o estado do Espírito Santo. Diferentes técnicas sorológicas, parasitológicas e moleculares têm sido utilizadas para definir o diagnóstico do parasito, entretanto, apresentam sensibilidade e especificidade variáveis (FALQUETO et al., 2003; SASSAKI et al., 2011; FURTADO et al., 2015).

Vários casos de leishmaniose tegumentar em humanos e cães que se associam a *L. (Viannia) braziliensis* foram relatados no estado. Os focos

endêmicos da doença ocorrem principalmente em pequenos assentamentos dispersos perto de montanhas desmatadas, nas quais se encontram poucos remanescentes da vegetação original, e também pode ser encontrada em antigas comunidades, perto de cidades importantes da costa atlântica (FALQUETO et al., 2003).

No Espírito Santo, cinco espécies de flebotomíneos são geralmente encontradas em áreas afetadas pela leishmaniose tegumentar: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia fischeri* e *Lutzomyia monticola*. Embora acredita-se que *Lutzomyia intermedia* é o principal vetor de *L. (V.) braziliensis* no Espírito Santo, outras espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia migonei*, podem atuar como vetores secundários do parasita em localidades rurais (MENEGUZZI et al., 2016).

Roedores, canídeos, marsupiais e primatas são exemplos de mamíferos que podem servir como hospedeiros desse parasito. O ser humano é designado como hospedeiro acidental no ciclo de transmissão, e isso ocorre por conta da permanência do indivíduo em localidades com grandes possibilidades de ocorrência de infecção. O agente transmissor tem sido encontrado com frequência em ambientes domiciliares e peridomiciliares devido à urbanização, mesmo não sendo seu habitat natural, favorecendo então a infecção em humanos (QUINNELL & COURTENAY, 2009; MILLÁN et al., 2014; NEVES et al., 2016).

A Reserva Biológica de Sooretama está situada no norte do estado do Espírito Santo, a 130 quilômetros de Vitória e 45 quilômetros de Linhares, sendo o mais importante remanescente florestal do bioma Mata Atlântica, que no início do século passado cobria aproximadamente 90% do território capixaba, e que ainda hoje abriga uma fauna com elevado número de animais endêmicos. O crescente processo de desmatamento da mata atlântica possibilita o crescimento dos casos de leishmaniose tegumentar. Além disso, há pouco conhecimento sobre a diversidade de parasitas deste gênero, somado aos casos da doença em animais domésticos e humanos no estado do Espírito Santo, e ao papel de pequenos mamíferos silvestres como hospedeiros deste parasita.

A investigação de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em reservatórios silvestres contribuirá para o amplo estudo da diversidade de *Leishmania* spp. no

estado do Espírito Santo, agregando mais variantes epidemiológicas da área estudada e atualizando a lista de espécies. Além de refinar o conhecimento sobre este parasito, os dados obtidos poderão favorecer em decisões de futuras medidas de controle da ação deste agente nos hospedeiros estudados, pois até o momento, é escassa a pesquisa desta doença no estado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), a ocorrência de infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em mamíferos silvestres, encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural) na Reserva Biológica de Sooretama, no estado do Espírito Santo.

#### 5.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 5.2.4.1. ÁREA AMOSTRADA, COLETA DE MATERIAIS E EXAME CLÍNICO

A pesquisa foi realizada com animais silvestres encontrados na Reserva Biológica de Sooretama (19° 3' 22" S e 40° 8' 50" W) no estado do Espírito Santo, Brasil (Figura 2.1).

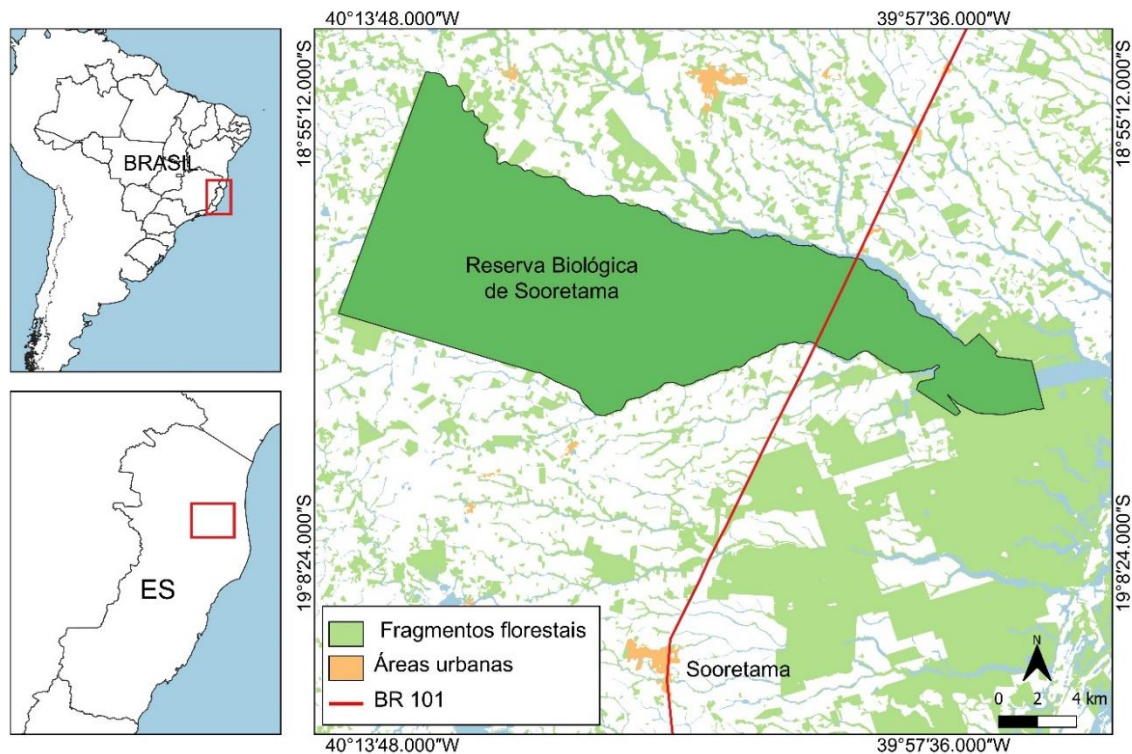


Figura 2.1. Localização da Reserva Biológica de Sooretama. Fonte: Instituto Jones dos Santos Neves e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (modificado pelo autor).

Foram coletados 60 mamíferos silvestres encontrados mortos (por atropelamento ou morte natural), entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019. Os animais foram recolhidos por funcionários da Reserva Biológica de Sooretama, identificados e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, os animais foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária, do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, onde foi realizado o exame clínico destes animais em busca de sinais da doença, como: palidez de mucosa, congestão ou icterícia, emagrecimento, aumento de linfonodos e lesões cutâneas; e em seguida foram necropsiados. Amostras de linfonodos, baço e fígado de 47 animais viáveis foram coletadas e fixadas em formalina neutra tamponada a 10% para exame histopatológico e, somente fragmentos de linfonodos, foram armazenados em micro tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise molecular.

#### 5.2.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada de 47 amostras de linfonodos armazenadas a -20°C, conforme Sambrook et al. (1989), por meio do método de Fenol/Clorofórmio no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES). O DNA de cada amostra foi extraído a partir de 10 mg de tecido em um micro tubo, onde foi feita a lise das células adicionando 490 µl do tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 6,0; EDTA 10 mM, pH 8,0; NaCl 50 mM; SDS 0,2%), junto com 10 µl de proteinase K (20mg/ml), seguida de sua incubação à 56°C por 3 horas para completa lise do tecido. Após este tempo, foi adicionado 500 µl de PCI (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, pH 8.0), o micro tubo foi homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 10 minutos, e em seguida foi aspirado o sobrenadante e este transferido para outro micro tubo, onde foi acrescentado 750 µl de etanol absoluto previamente resfriado. O micro tubo foi homogeneizado e colocado no freezer a -20°C por, no mínimo, 1 hora. Em seguida, foi feita sua centrifugação a 12.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi desprezado (nesta etapa houve a formação do pellet). Por fim, foi então adicionado ao micro tubo 750 µl de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 15 minutos, em seguida todo o álcool foi desprezado (esta etapa com o etanol 70% foi repetida por mais uma vez). A seguir o pellet de DNA foi secado em uma centrífuga a vácuo (Eppendorf – Concentrator Plus) por 10 minutos a 30°C para retirada total do álcool e então ressuscitado com 50 µl de água destilada e aquecido em termo bloco (56°C por 5 minutos) para dissolução do pellet. Para avaliação quanto ao grau de pureza e quantidade de DNA obtido na extração, foi realizada a quantificação de DNA das amostras em Espectrofotômetro UV (BioPhotometer Plus, Eppendorf) utilizando 1 µl da suspensão. Logo após, o DNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização em testes moleculares.

### 5.2.4.3. TÉCNICA CONVENCIONAL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA *Leishmania* spp. E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para pesquisa de *Leishmania* spp., 47 amostras de DNA de linfonodos foram submetidas a PCR utilizando oligonucleotídeos de alta sensibilidade (primers) denominados D1, D2 e D3, que amplificam um fragmento de 120 pares de bases (bp) da região conservada do minicírculo do kDNA mitocondrial de *Leishmania* (*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*), adaptado de Rocha et al. (2010) (Tabela 2.1).

As reações foram realizadas pela técnica de PCR convencional juntamente com o grupo de pesquisa EPICONTROL (Carnívoros) no Laboratório “Pet Parasit Lab” do Departamento de Sanidade Animal da Universidade Complutense de Madri (UCM) - Espanha, utilizando um volume de 25 µl, contendo 2,0 µl da amostra de DNA genômico extraído (500 ng/µl) e 23 µl de Master Mix da marca Biotools®, Espanha - (17,8 µl de água destilada, 2,5 µl de Buffer 10x/ MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 0,7 µl de Taq DNA polimerase (1 U/µl), 0,5 µl de dNTP (10 mM) e 0,5 µl de cada primer D1, D2 e D3 (15 pmol)). A reação foi conduzida à um termociclador GenAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems®, Thermo Fischer, Espanha) com as condições de amplificação detalhadas na Tabela 2.1. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Para o controle positivo, amostras de sangue de um cão de Madri (Espanha) com os parasitos detectados pela microscopia foram utilizadas, e amostras de meio de cultura de *Leishmania* spp. cultivadas em laboratório (Brasil) também foram utilizadas.

Tabela 2.1: Primers utilizados para pesquisa de *Leishmania* spp.

Região Amplificada	Primers	Condições de amplificação			Referência
		T°C	Tempo em minutos (') e segundos (")	Nº ciclos	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' (D1)	95	5' (Desnaturação inicial)	1	Rocha et al., (2010)
<i>L. (L.) infantum</i>	5'-CCGCCCTATTTTACACCAACCCC-3' (D2)	95	1' (Desnaturação intermediária)	29	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	5'-GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3' (D3)	55	30'' (Anelamento)	29	
		72	10'' (Extensão intermediária)	29	
		72	5' (Extensão final)	1	
kDNA minicircle (120 bp)		4	∞ (Fim da reação)		

Após amplificação dos produtos da PCR da região conservada do mini círculo do kDNA mitocondrial, a análise foi realizada em gel de agarose a 1,5% por eletroforese. O gel foi preparado com 1,5 g de agarose e 100 mL de tampão TBA 1X (Tris-acetato 0,04 mM, EDTA 0,001 mM pH 8,0), adicionado de 9 µl de SYBR Green 10000X (Invitrogen, Espanha), com pentes de 20 poços. Foram pipetados na última canaleta de cada gel 5,0 µL do marcador de peso molecular de 100 bp (DNA *ladder*, Invitrogen, Espanha), e nas demais canaletas, 3,3 µL de tampão de carga com 25 µL de produto da PCR. O tampão de corrida utilizado foi o TBA 1X (Tris-acetato 0,04 mM, EDTA 0,001 mM pH 8,0), e a análise dos produtos foi feita em um cromatógrafo PowerPac™, Bio-Rad a 86V por 30 minutos. Em seguida, o produto amplificado foi visualizado e foto documentado em um trans iluminador UV Bio-Rad.

#### 5.2.4.4. TÉCNICA CONVENCIONAL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA *Leishmania (Viannia) braziliensis* E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a pesquisa de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, foram utilizadas as amostras positivas de DNA, extraídas de linfonodos, submetidas a PCR com os primers D1, D2 e D3 (ROCHA et al., 2010). Para isso, foram utilizados os primers ISVB e ISVC que amplificam um fragmento de 336 pares de bases (bp) da região conservada do alvo *G6PD* do rDNA, específico da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (CASTILHO et al. 2003) (Tabela 2.2).

As reações foram realizadas pela técnica de PCR convencional no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do CCAE-UFES, utilizando um volume de 20 µl, contendo 10,7 µL de água destilada, 4 µL tampão 5X Green Go Taq® Flexi Buffer (Promega), 2 µL MgCl<sub>2</sub> (2 mM, Promega), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de cada primer ISVB e ISVC (15 pmol, Thermo Fischer), 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL) e 2,5 µL do DNA da amostra. As condições das reações foram realizadas em um termociclador automático Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Thermo Fischer), conforme Tabela 2.2. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Para o controle positivo,



foram utilizadas amostras de meio de cultura de *Leishmania (Viannia) brasiliensis* cultivadas em laboratório.

Tabela 2.2: Primers utilizados para a pesquisa de *Leishmania (Viannia) brasiliensis*.

Região Amplificada	Primers	Condições de amplificação			Referência
		T°C	Tempo em minutos (') e segundos (")	Nº ciclos	
<i>L. (V.) brasiliensis</i>	5'-TACTCGCCATGTCGGAGG-3' (ISVB)	94	4' (Desnaturação inicial)	1	Castilho et al., (2003)
	5'-ATCACAATGATGGTCAACGCAC-3' (ISVC)	94	1' (Desnaturação intermediária)	30	
(gene <i>G6PD-rDNA</i> – 336 bp)		60	1' (Anelamento)	30	
		72	1' (Extensão intermediária)	30	
		72	5' (Extensão final)	1	
		4	∞ (Fim da reação)		

Após amplificação dos produtos da PCR ao alvo G6PD, a análise foi realizada em gel de agarose a 1,5% por eletroforese. O gel foi preparado com 1,5 g de agarose e 100 mL de tampão TBE 1X (Tris-borato 0,04 mM, EDTA 0,001 mM pH 8,0), adicionado de 9 µL de Gel Red® 10000X (Invitrogen, Brasil), com pentes de 20 poços. Foram pipetados na primeira canaleta 5,0 µL do marcador de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen Brasil), e nas demais canaletas 15 µL de produto da PCR. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 1X (Tris-borato 0,04 mM, EDTA 0,001 mM pH 8,0), e a análise dos produtos foi feita em um cromatógrafo PowerPac™ (Bio-Rad) à 86V por 30 minutos. Em seguida, o produto amplificado foi visualizado e foto documentado em um trans iluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad).

#### 5.2.4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita a análise descritiva das observações, para o cálculo das frequências absolutas e relativas obtidas neste estudo.

#### 5.2.4.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para realização deste trabalho foi obtida autorização para uso de animais, com finalidade científica pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES), sob o número de protocolo 65/2017 (Anexo A), e a licença junto ao Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade (SISBIO), emitida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) de nº 31762-6 e 69935-1, para captura e transporte de animais (Anexo B e C).

#### 5.2.5. RESULTADOS

Os 60 animais silvestres capturados neste estudo distribuíram-se em 12 espécies diferentes de. As espécies *Didelphis aurita* 10% (6/60), *Cuniculus paca* 10% (6/60), *Callithrix geoffroyi* 21,7% (13/60) e *Cerdocyon thous* 21,7% (6/60) foram as principais encontradas (Tabela 2.3).

Dentre os animais capturados, 13 foram descartados e não utilizados para a pesquisa por estarem autolisados e/ou com amostras insuficientes para as análises, sendo: *Cuniculus paca* (2), *Dasyopus novemcintus* (3), *Callithrix geoffroyi* (1), *Sapajus robustus* (1), *Cerdocyn thous* (1), *Procyon cancrivorus* (1), *Leopardus pardalis* (1) e *Tamandua tetradactyla* (3), restando 47 animais viáveis para a pesquisa (Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Animais silvestres encontrados na Reserva Biológica de Sooretama, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019 e utilizados para a pesquisa de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Espécies	Nº de animais coletados	Total %	Nº de animais utilizados	Total %
<i>Didelphis aurita</i>	6	10	6	12,8
<i>Cuniculus paca</i>	6	10	4	8,5
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	2	3,3	2	4,3
<i>Dasybus novemcinctus</i>	5	8,3	2	4,3
<i>Callithrix geoffroyi</i>	13	21,7	12	25,5
<i>Sapajus robustus</i>	2	3,3	1	2,1
<i>Cerdocyon thous</i>	13	21,7	12	25,5
<i>Procyon cancrivorus</i>	3	5	2	4,3
<i>Nasua nasua</i>	1	1,7	1	2,1
<i>Leopardus pardalis</i>	1	1,7	-	-
<i>Tamandua tetradactyla</i>	7	11,7	4	8,5
<i>Mustela putorius furo</i>	1	1,7	1	2,1
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>47</b>	<b>100</b>

Do total de animais utilizados, 30 (63,9%) eram machos e 17 (36,1%) eram fêmeas, e 4 (8,5%) eram jovens e 43 (91,5%) eram adultos (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Animais silvestres, discriminados por sexo e condição biológica, utilizados para pesquisa de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, encontrados na Reserva Biológica de Sooretama.

Espécie	♂	%	♀	%	J	%	A	%
<i>Didelphis aurita</i>	5	83,3	1	16,7	0	-	6	100
<i>Cuniculus paca</i>	3	75	1	25	2	50	2	50
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	0	-	2	100	0	-	2	100
<i>Dasybus novemcinctus</i>	0	-	2	100	1	50	1	50
<i>Callithrix geoffroyi</i>	9	75	3	25	0	-	12	100
<i>Sapajus robustus</i>	0	-	1	100	0	-	1	100
<i>Cerdocyon thous</i>	9	75	3	25	0	-	12	100
<i>Procyon cancrivorus</i>	2	100	0	-	0	-	2	100
<i>Nasua nasua</i>	0	-	1	100	0	-	1	100
<i>Tamandua tetradactyla</i>	2	50	2	50	0	-	4	100
<i>Mustela putorius furo</i>	0	-	1	100	1	100	0	-
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>63,9</b>	<b>17</b>	<b>36,1</b>	<b>4</b>	<b>8,5</b>	<b>43</b>	<b>91,5</b>

Nota: ♂- Macho; ♀- Fêmea; J- Jovem; A- Adulto

O DNA extraído das 47 amostras de linfonodos das diferentes espécies de mamíferos, após ser quantificado em espectrofotômetro UV a 260 nm, obteve uma concentração ao redor de 500 ng/μl e uma pureza entre 1,8 e 2,2 pela relação 260/280 nm.

Das 47 amostras de linfonodos de mamíferos silvestres testadas pela PCR para o gênero *Leishmania* spp. (kDNA mitocondrial) com os primers D1, D2 e D3, 4 (8,5%) apresentaram resultados positivos. Destas 4 amostras positivas testadas pela PCR com os primers D1, D2 e D3 (sendo 1 *Cuniculus paca* e 3 *Callithrix geoffroyi*), todas (100%) também apresentaram resultados positivos pela PCR utilizando os primers ISVB e ISVC, específicos para espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que amplificam um fragmento de 336 pares de bases (bp) da região conservada do alvo *G6PD* do rDNA (Castilho et al. 2003) (Figura 2.2).

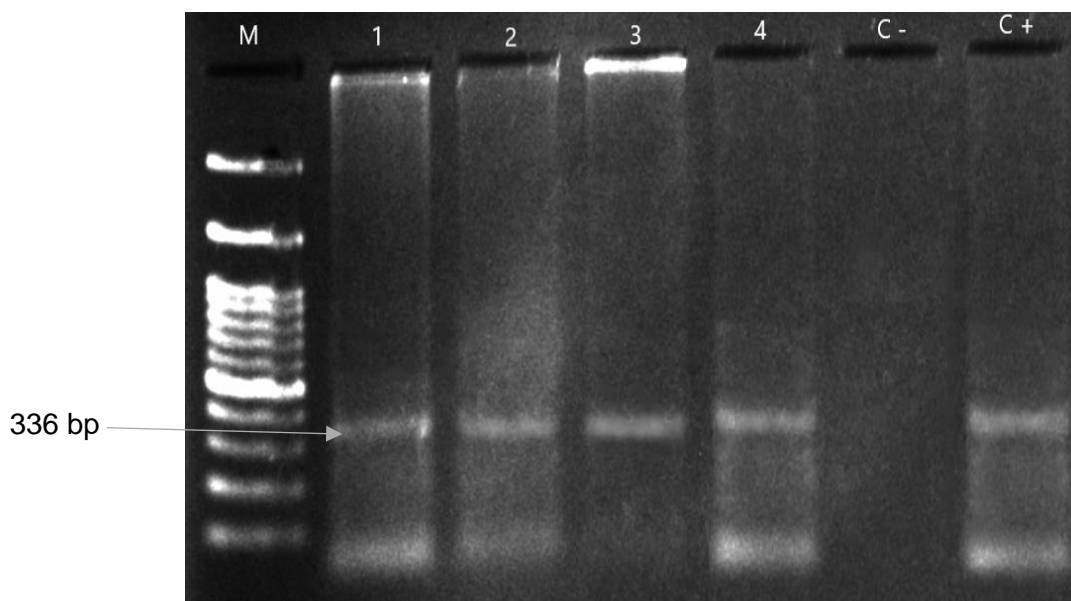


Figura 2.2. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado por Gel Red®, mostrando produtos de PCR de 336 bp de amostras positivas de linfonodos amplificados, a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*. M: Marcador de peso molecular; 1: Amostra positiva de *Cuniculus paca*; 2,3,4: Amostras positivas de *Callithrix geoffroyi*; (C-): Controle negativo; (C+): Controle positivo. Produto de amplificação de 336 bp encontra-se indicado por seta.

Dentre as 4 amostras positivas (8,5%), 1 foi da espécie *Cuniculus paca* e 3 foram da espécie *Callithrix geoffroyi*. Em relação ao total de amostras de DNA da espécie *Cuniculus paca* testadas (n=4), 1 (25%) foi positiva para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e das 12 amostras de DNA da espécie *Callithrix geoffroyi* testadas, 3 (25%) foram positivas para *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Tabela 2.5).

Tabela 2.5: Resultados de infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, por meio da PCR, a partir de amostras de linfonodos.

<i>Espécie</i>	<b>N</b>	<b>PCR+</b>	<b>%</b>
<i>Didelphis aurita</i>	6	0	-
<i>Cuniculus paca</i>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>25</b>
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	2	0	-
<i>Dasypus novemcinctus</i>	2	0	-
<i>Callithrix geoffroyi</i>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>25</b>
<i>Sapajus robustus</i>	1	0	-
<i>Cerdocyon thous</i>	12	0	-
<i>Procyon cancrivorus</i>	2	0	-
<i>Nasua nasua</i>	1	0	-
<i>Tamandua tetradactyla</i>	4	0	-
<i>Mustela putorius furo</i>	1	0	-
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>4</b>	<b>8,5</b>

Nota: N= n° de animais analisados (amostras de linfonodos); PCR+= positivos na PCR.

A avaliação clínica mostrou que 85% (40/47) dos animais analisados foram clinicamente afetados, com alterações como: hemorragia, traumatismo craniano, fraturas, feridas perfurantes e edema, não caracterizando sinais aparentes da doença. Possivelmente, essas alterações se devem ao fato desses animais terem sido encontrados mortos na natureza (por atropelamento ou morte natural). Uma espécie positiva de *Cuniculus paca* exibiu lesão perfurante e 2 dos 3 saguis (*Callithrix geoffroyi*) positivos para PCR apresentaram traumatismo craniano. Todos os animais positivos para PCR eram machos e adultos.

### 5.2.6. DISCUSSÃO

A reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional tem mostrado alta sensibilidade e especificidade para detecção do DNA de *Leishmania*. A amplificação de fragmentos de DNA pela PCR tem sido realizada a partir de diferentes tipos de tecidos, como os linfonodos, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue, sem a necessidade de exaustivos isolamentos do parasita, e tem sido muito utilizada para detectar infecções em animais silvestres de áreas endêmicas, permitindo a identificação de possíveis reservatórios (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; CUNHA et al., 2014; GONTIJO & MELO, 2004; JIMÉNEZ et al., 2013; WHO, 2010).

Do total de amostras de DNA do roedor *Cuniculus paca* testadas pela PCR (n=4) neste estudo, 1 (25%) foi positiva para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, sendo este resultado semelhante a pesquisa de Forattini (1960), que examinou 928 animais silvestres na região de Teodoro Sampaio no estado de São Paulo e detectou 1 paca (*Cuniculus paca*) positiva para *Leishmania* sp., após 30 dias de isolamento, por meio de hemocultura, construindo uma hipótese da estrutura epidemiológica da leishmaniose tegumentar na natureza. Forattini & Santos (1955), trabalhando nesta mesma região, ao investigar 23 espécies silvestres, encontraram um exemplar de paca (*Cuniculus paca*) portador de lesão cutânea, onde rotularam apenas como suspeita de leishmaniose tegumentar.

O presente estudo corrobora com achados de Falqueto (1997), em estudos com a especificidade alimentar de flebotomíneos na região de Afonso Cláudio, no estado do Espírito Santo, onde afirmou que a paca (*Cuniculus paca*) seria um provável reservatório silvestre da *Leishmania (V.) braziliensis* devido sua capacidade de atrair flebotomíneos antropofílicos.

Em relação aos nossos achados na presente pesquisa, o índice de 8,5% dos animais naturalmente infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é menor que os revelados na Zona da Mata Sul de Pernambuco por Brandão-Filho et al. (2003), que detectaram 16% de positividade em roedores. Já Quaresma et al. (2011), em um estudo realizado em um território indígena no sudeste do Brasil (utilizando pele, baço, fígado e linfonodo), registrou 22,2% (16/72) PCR-positivo para *Leishmania* sp. entre roedores.

Não há relatos anteriores de infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no roedor *Cuniculus paca* na literatura.

No presente estudo também foram observados resultados positivos pela PCR de amostras de linfonodos de *Callithrix geoffroyi* (sagui-de-cara-branca). Esta espécie de primata não humano é endêmica no Brasil e está presente nos estados da Bahia, Espírito Santo, Nordeste de Minas Gerais como residente e nativo, e em Santa Catarina, onde foi introduzido (RYLANDS & MENDES, 2008).

Existem várias descrições no Brasil e no mundo de infecção por *Leishmania* em primatas não humanos. Os resultados do presente estudo se assemelham com pesquisas de Trüeb et al. (2018), que capturaram 65 animais silvestres de 10 diferentes espécies em fragmentos de mata atlântica na região de Salvador - BA, e realizaram a PCR com os mesmos *primers* D1, D2 e D3 (ROCHA et al., 2010) empregados no presente estudo, utilizando amostras de DNA extraídas de sangue. Dentre os animais silvestres testados, 41% (27/65) foi positivo para *Leishmania* spp., sendo 2 (3%) primatas do gênero *Callithrix*, corroborando com os resultados do presente estudo.

Os resultados do presente estudo são semelhantes com pesquisas de Bueno et al. (2011) com 81 animais silvestres provenientes da mata atlântica no estado de São Paulo, onde realizaram testes imunológicos anti-*Leishmania* sp. e os resultados mostraram que 11% (9/81) dos animais da espécie *Callithrix penicillata* eram positivos.

Em Bauru, São Paulo, *Leishmania amazonensis*, causadora da leishmaniose tegumentar, foi detectada por métodos moleculares em amostras de sangue de um macaco-aranha (*Ateles paniscus*) criado em cativeiro e que demonstrou perda de peso e mucosas pálidas (LIMA et al., 2012). Já Herrero et al. (1973), confirmaram uma alta suscetibilidade à infecção por *Leishmania* spp. com sinais cutâneos em macacos coruja (*Atous trivirgatus*) e saguis (*Saguinus geoffroyi*).

A susceptibilidade de *Callithrix* sp. à infecção por *Leishmania* sp. foi investigada por infecções experimentais, segundo Carneiro et al. (2012). Também foi feita por Dietze et al. (1985) a contaminação experimental em saguis da espécie *Callithrix jacchus* onde foi inoculado, via intraperitoneal, cepas de *Leishmania infantum* para posterior ensaio terapêutico. De acordo com Cuba et al. (1990), espécies de *Leishmania* que circulam nas Américas infectam outros

primatas neotropicais. Por muitos anos, saguis-de-cara-preta (*Callithrix penicillata*) foram utilizados em estudos experimentais com *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*.

Não há relatos anteriores de *Callithrix geoffroyi* de vida livre infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Brasil. No entanto, em contraste com os resultados desses autores, os primatas naturalmente infectados examinados no presente estudo não mostraram sinais clínicos de leishmaniose.

A leishmaniose tegumentar é endêmica e amplamente distribuída em todo o estado do Espírito Santo, com vários casos relatados da doença em cães e humanos, associados a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e com diferentes espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* spp. participando do ciclo de transmissão deste parasito. (FALQUETO et al., 2003; 2009).

Meneguzzi et al. (2016) coletaram amostras de flebotomíneos em diversas áreas rurais de 78 municípios do Espírito Santo todos os anos entre 1997 e 2013. No total, 249.783 espécimes pertencentes a 43 espécies de flebotomíneos foram coletados em 466 localidades durante este período, cobrindo todas as zonas geoclimáticas do estado. As cinco espécies de moscas flebotomínicas mais comumente relatadas no estado foram: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia choti*, *Lutzomyia lenti* e *Lutzomyia whitmani*. Este estudo revelou que *Lutzomyia intermedia* foi a espécie mais associada à ocorrência de leishmaniose cutânea no estado do Espírito Santo, seguida pelos vetores secundários *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia whitmani*.

Em 2008, para avaliar a composição da fauna de flebotomíneos e sazonalidade na Reserva Biológica de Sooretama, foram capturados 6.176 espécimes, dos quais 47,4% ocorreram no ambiente florestal e 52,6%, no ambiente antrópico. *Lutzomyia davisi* predominou no ambiente florestal, enquanto *Lutzomyia choti* e *Lutzomyia intermedia* predominaram no ambiente periurbano (VIRGENS et al., 2008).

De acordo com dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020), o número de casos confirmados de pessoas infectadas com leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo entre 2008 e 2018 foi de 1.324, com incidência em todo o estado. Os municípios mais acometidos com o número de casos da doença foram Afonso Cláudio, Brejetuba, Cariacica, Guarapari, Ibatiba, Santa Leopoldina, Linhares e São Mateus.



Nossos resultados indicam a presença de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na região da Reserva Biológica de Sooretama, podendo haver muitos reservatórios em potencial e vetores (flebotomíneos) que compartilham o mesmo habitat, já que estas espécies silvestres foram infectadas. Portanto, poderá haver um risco de transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* a outros animais suscetíveis vivendo no mesmo habitat e em áreas próximas, bem como para os seres humanos. Afinal, muitos desses animais estão vivendo em um ambiente periurbano, em contato próximo com seres humanos, possivelmente representando um risco à saúde pública.

#### 5.2.7. CONCLUSÕES

- A infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* detectada em roedor e primata demonstra a participação destas espécies como possíveis reservatórios no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar, no estado do Espírito Santo.
- A detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em *Callithrix geoffroyi* e em *Cuniculus paca* constitui o primeiro relato de infecção destas espécies de roedor e primata na literatura.
- A investigação de infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* destes mamíferos silvestres é importante para a compreensão da epidemiologia e manutenção do parasita em diferentes áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar, contribuindo para futuras decisões de medidas de controle de acordo com as particularidades ecoepidemiológicas de cada área de transmissão. Este trabalho suscita estudos mais abrangentes para confirmar ou descartar a participação de saguis e pacas no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar, na área em estudo e em outras áreas endêmicas.

#### 5.2.8. AGRADECIMENTOS

Ao apoio técnico e docente do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao grupo EPICONTROL - Pet Parasite Lab da Universidade Complutense de Madrid e aos alunos e professores do Laboratório de Patologia Veterinária e Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, os quais tiveram uma participação fundamental no desenvolvimento da pesquisa, no desenho do estudo, coleta e análise de dados, na preparação do artigo e decisão de publicação.

### 5.2.9. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - Brasil, 2020. Disponível em: [datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agrivos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/](https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agrivos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/).

Acesso em: 14 de outubro de 2020.

BUENO, M. G.; LAURENTI, M. D.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; SILVEIRA, F. T.; VALLE, R. R.; HÖRE, F.; CATÃO-DIAS, J. L. Survey of *Leishmania* sp. in free ranging neotropical primates of Atlantic and Amazon rain forest, Brazil. **Anais**. Lawrence: WDA, 2011. Disponível em: [www.wildlifedisease.org/wda/Portals/0/Conferences/WDA2011programPART2.pdf](http://www.wildlifedisease.org/wda/Portals/0/Conferences/WDA2011programPART2.pdf). Acesso em: 05 de maio de 2020.

CARNEIRO, L. A.; LAURENTI, M. D.; CAMPOS, M. B.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. P.; SILVEIRA, F. T. Susceptibility of peritoneal macrophage from different species of neotropical primates to ex vivo *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, p. 95-102, 2012.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 2, p 540-546, 2003.

CUBA, C. A.; FERREIRA, V.; BAMPI, M.; MAGALHAES, A.; MARSDEN, P. D.; VEXENAT, J. A., MELLO, M. T. Experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the marmoset, *Callithrix penicillata* (Primates: *Callithricidae*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 459-467, 1990.

CUNHA, R. C.; ANDREOTTI, R.; COMINETTI, M. C.; SILVA, E. A. Detecção de *Leishmania infantum* em *Lutzomyia longipalpis* capturados em Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 269-273, 2014.

DIETZE, R.; ARAÚJO, R. C.; LIMA, M. L. R.; VEXENAT, J. A.; MARSDEN, P. D.; BARRETO, A. C. Ensaio terapêutico com glucantime em saguis (*Callithrix jacchus*) infectados com uma cepa de *Leishmania donovani* aparentemente resistente ao tratamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 39-42, 1985.

FALQUETO, A. Especificidade Alimentar de Flebotomíneos em duas áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 531-532, 1997.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHOPAES, L.; GRIMALDI JR., G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1003-1010, 2003.

FORATTINI, O. P.; SANTOS, M. R. Novas observações em regiões endêmicas de leishmaniose tegumentar americana nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil. **Revista Clínica de São Paulo**, v. 31, p. 13-20, 1955.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 2, p. 195-203, 1960.

FURTADO, M. C.; MENEZES, R. C.; KIUPEL, M.; MADEIRA, M. F.; OLIVEIRA, R. V. C.; LANGOHR, I. M.; FIGUEIREDO, F. B. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 620, 2015.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v 181, n. 1, p. 23-30, 2011.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A.; BEUMER, R. J. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, p. 585-591, 1973.

JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ, E.; IRISO, A.; MARCO, E.; ALEGRET, A.; FUSTER, F.; MOLINA, R. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2453-2459, 2013.

LIMA, V. M.; SANTIAGO, M. E.; SANCHES, L. D. A C.; LIMA, B. D. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, p. 943-945, 2012.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MENEGUZZI, V. C.; SANTOS, C. B. D.; LEITE, G. R.; FUX, B.; FALQUETO, A. Environmental Niche Modelling of Phlebotomine Sand Flies and Cutaneous Leishmaniasis Identifies *Lutzomyia intermedia* as the Main Vector Species in Southeastern Brazil. **PLoS One**. v. 11, n. 10, p. 1-16, 2016.

MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2005-2014, 2014.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, L. W. A. **Parasitologia Humana**. 13. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 494, 2016.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN L.H. Laboratory Methods in Histotechnology. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, DC. p. 279, 1992.

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; PIRES, M. Q.; BOTELHO, H. A.; DA SILVA, S. R.; MOURA, A. J.; NETO, R. G. T.; MADEIRA, F. M.; CARVALHO, M. B.; PAGLIA, A. P.; MELOC, M. N.; GONTIJO, C. M. F. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in

Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579-585, 2011.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

ROCHA, M. N.; MARGONARI, C.; PRESOT, I. M.; SOARES, R. P. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 401-409, 2010.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

RYLANDS, A. B.; MENDES, S. L. *Callithrix geoffroyi*. In: **IUCN Red List of Threatened Species**, 2008. Version 2011.2. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em: 10 de outubro de 2020.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 628, 1989.

SASSAKI, C. Y.; COLODEL, M. M.; FERREIRA, I.; NOGUEIRA, F. S.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; ROCHA, N. S. Comparison of different diagnostic tests in dogs uninfected and naturally infected with visceral leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 348-352, 2011.

TRÜEB, I.; PORTELA, R. D.; FRANKE, C. R.; CARNEIRO, I. O.; RIBEIRO JR., G. J.; SOARES, R. P.; BARROUIN-MELO, S.M. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in northeast Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 1, p. 76-84, 2018.

VIRGENS, T. M.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; SILVA, K. S.; LEAL, F. C.; FALQUETO, A. Phlebotomine sand flies (Diptera, *Psychodidae*) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2969-2978, 2008.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26, March 2010. WHO technical report series. n. 949. Geneva: **WHO Press**, p. 201, 2010.

WHO. World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 92, n. 38, p. 557-565, 2017.

## 6. ANEXOS

### Anexo A




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação dos Principais Fatores Ambientais e Antrópicos Envolvidos na Mortalidade e Morbidade de Animais Silvestres no Espírito Santo e Estabelecimento de Novos Dados Morfológicos ", Protocolo nº.65/2017, sob a responsabilidade de Maria Aparecida da Silva que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 24-11-2017.

Vigência do Projeto	Início: Janeiro/2018 Término: Janeiro/2020
Espécie/Linhagem	Vertebrados Silvestres( linhagem: não especificada )
Nº de Animais	Experimento Piloto: 0 Protocolo Experimental: 0 Total: 0
Peso/Idade	Peso: Variado Idade: Jovens e Adultos
Sexo	Ambos
Origem	Animais Silvestres

  
P: Roger Lyrio dos Santos  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/CCS/UFES

Vitória (ES), 24 de novembro de 2017.



## Anexo B



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

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 31762-6	Data da Emissão: 14/10/2019 16:18:07	Data da Revalidação*: 02/09/2017
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: AUREO BANHOS DOS SANTOS	CPF: 072.391.007-31
Título do Projeto: Coleta/transporte de amostras biológicas de vertebrados silvestres encontrados atropelados, caçados e mortos na Reserva Biológica de Sooretama e Reserva Natural Vale, Linhares - ES	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	09/2019	09/2021
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	10/2011	09/2016

## Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falta de descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0317620620191014

Página 1/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 31762-6	Data da Emissão: 14/10/2019 16:18:07	Data da Revalidação*: 02/09/2017
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: AUREO BANHOS DOS SANTOS	CPF: 072.391.007-31
Título do Projeto: Coleção de amostras biológicas de vertebrados silvestres encontrados atropelados, caçados e mortos na Reserva Biológica de Sooretama e Reserva Natural Vale, Linhares - ES	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

#### Outras ressalvas

1	- Que o pesquisador forneça um banner medindo 1,00 X 0,70 metros com informações sobre a pesquisa para exposição e uso pela UC nas atividades de EA.	REBIO de Sooretama
---	--	--------------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	RESERVA NATURAL VALE	Linhares-ES	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Reserva Biológica de Sooretama	Sooretama-ES	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
3	Reserva Biológica de Sooretama	Jaguare-ES	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
4	Reserva Biológica de Sooretama	Vila Valério-ES	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
5	Reserva Biológica de Sooretama	Linhares-ES	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Outras atividades

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Squamata	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Didelphimorphia	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Lagomorpha	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Procyonidae	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Mustelidae	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Felidae	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Canidae	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Xenarthra	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Rodentia	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Amphibia	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Primates	-
13	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Perissodactyla	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Artiodactyla	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0317620620191014

Página 2/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 31762-6	Data da Emissão: 14/10/2019 16:18:07	Data da Revalidação*: 02/09/2017
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: AUREO BANHOS DOS SANTOS	CPF: 072.391.007-31
Título do Projeto: Coleção de amostras biológicas de vertebrados silvestres encontrados atropelados, caçados e mortos na Reserva Biológica de Sooretama e Reserva Natural Vale, Linhares - ES	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
2	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
3	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
4	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
5	Amostras biológicas (Primates)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
6	Amostras biológicas (Répteis)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	Laboratório
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	Laboratório
3	UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	Outro
4	Museu de Biologia Prof. Mello Leitão	Coleção
5	UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	Coleção
6	Reserva Biológica de Sooretama	Outro

*Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).*

Código de autenticação: 0317620620191014

Página 3/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 31762-6	Data da Emissão: 14/10/2019 16:18:07	Data da Revalidação*: 02/09/2017
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: AUREO BANHOS DOS SANTOS	CPF: 072.391.007-31
Título do Projeto: Coleção de amostras biológicas de vertebrados silvestres encontrados atropelados, caçados e mortos na Reserva Biológica de Sooretama e Reserva Natural Vale, Linhares - ES	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0317620620191014

Página 4/4

## Anexo C



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

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 69935-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:48:31	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Henrique Jordem Venial	CPF: 111.246.757-28
Título do Projeto: DETECÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE Leishmania sp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Material Biológico	06/2019	06/2020

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	GABRIEL JOSÉ SILVA UZAI	Pesquisador Colaborador	107.072.226-05	Brasileira

## Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indígena oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade e fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0699350120190722

Página 1/4





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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 69335-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:48:31	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Henrique Jordem Venial	CPF: 111.246.757-28
Título do Projeto: DETECÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Leishmania</i> sp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

#### Observações e ressalvas

8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .
---	--

#### Outras ressalvas

1	- As visitas devem ser agendadas com antecedência, especialmente se houver necessidade de utilização do alojamento, pelo Tel. (27) 99901-2366. - Todos os produtos do trabalho de pesquisa devem ser encaminhados diretamente para a administração da Reserva Biológica de Sooretama. - Os locais de coleta devem ser georreferenciados e as coordenadas informadas para a Reserva.	REBIO de Sooretama
---	---	--------------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	BR 101 (Entre Viana e Presidente Kennedy)	Guarapari-ES	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Reserva Biológica de Sooretama	ES	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Nasua nasua</i>	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Procyon cancrivorus</i>	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	Coendou	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Cuniculus paca</i>	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	Leopardus	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Didelphis aurita</i>	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Cercopithecus thous</i>	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Tamandua tetradactyla</i>	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Lycalopex vetulus</i>	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Speothos venaticus</i>	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Sapajus robustus</i>	-
13	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Callithrix geoffroyi</i>	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas In situ	<i>Sapajus nigritus</i>	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0699350120190722

Página 2/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 69935-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:48:31	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Henrique Jordem Vental	CPF: 111.246.757-28
Título do Projeto: DETECÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Leishmania</i> sp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO SA	
Nome da instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
3	Amostras biológicas (Prímatas)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
4	Amostras biológicas (Xenarthra)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	Laboratório
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0699350120190722

Página 3/4



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

#### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 69935-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:48:31	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Henrique Jordem Venial	CPF: 111.246.757-28
Título do Projeto: DETECÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE Leishmania sp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO ESTADO DO ESPÍRITO SA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

#### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0699350120190722

Página 4/4



## Anexo D

## Acta Tropica

Investigation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild mammals in the state of Espírito Santo, Brazil

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Keywords:</b>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ; <i>Cuniculus paca</i> ; <i>Callithrix geoffroyi</i> ; Wild Mammals; Sooretama Biological Reserve
<b>Corresponding Author:</b>	Henrique Jordem Venial, M.D. Federal University of Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo Alegre, Espírito Santo BRAZIL
<b>First Author:</b>	Henrique Jordem Venial, M.D.
<b>Order of Authors:</b>	Henrique Jordem Venial, M.D. Ana Montoya, Phd Rocío Checa, M.D. Guadalupe Miró, Phd Eulógio C. Queiroz de Carvalho, Phd
<b>Abstract:</b>	<p>Leishmaniasis is an infectious and zoonotic disease and presents in cutaneous and visceral forms. Cutaneous leishmaniasis is endemic and widely distributed throughout the state of Espírito Santo, Brazil. Several cases of cutaneous leishmaniasis in humans and dogs associated with <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> have been reported in the state. This study aimed to investigate the occurrence of natural infection by <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> in wild mammals found dead (by trampling or natural death) in the Sooretama Biological Reserve, Espírito Santo State. From January 2018 to December 2019, 60 animals were collected. Of these, 47 of 12 species were analyzed. The results were demonstrated using a descriptive analysis of the observations to calculate the absolute and relative frequencies of the data. The species <i>Didelphis aurita</i> (black-eared opossum) 10% (6/60), <i>Cuniculus paca</i> (paca) 10% (6/60), <i>Callithrix geoffroyi</i> (white-faced marmoset) 21.7% (13/60), and <i>Cerdocyon thous</i> (crab-eating fox) 21.7% (6/60) were the most found. In the PCR, using specific primers for the genus <i>Leishmania</i> (D1, D2, D3) and the species <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (ISVB/ISVC), 4 positive animals (8.5%) were detected: 1 <i>Cuniculus paca</i> (paca) (25%) and 3 <i>Callithrix geoffroyi</i> (white-faced marmoset) (25%). In the histopathological analysis, the parasitic amastigote form was not observed. The natural infection, detected by PCR, by <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> in <i>Cuniculus paca</i> (paca) and <i>Callithrix geoffroyi</i> (white-faced marmoset) constitutes the first report of infection of this rodent and primate species in the literature. Despite confirmation of the occurrence of <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> infection in rodents and primates in the state of Espírito Santo, the role of these species in the transmission of this zoonosis still needs further longitudinal studies to identify the effects of a given parasite on the population and/or individual, its seasonal fluctuation, infection stability, and transmissibility.</p>