UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo.

Helena Hilomi Taniguchi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati

São Paulo
2010

Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo.

Helena Hilomi Taniguchi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati

São Paulo
2010

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

Dedico:

À minha mãe MIYAKO, por tudo o que ela representa na minha vida, meu porto seguro, meu colo amado, por me esperar em cada viagem de serviço de campo, sempre com o coração cheio de amor e dedicação.

Aos meus irmãos, CARLOS, NOBUO, NELSON E NAIR, pelo amor, carinho, dedicação, pelos cuidados que tem comigo, e por saber que eles cuidam da mãe nas minhas ausências.

Ao meu pai ISAO (in memoriam).

Ao amigo JOSÉ EDUARDO TOLEZANO que me permitiu realizar este trabalho e participou em todas as etapas.

Ao amigo CARLOS ROBERTO ELIAS (TATU), que ao longo destes quase 30 anos de jornada me ensinou tudo sobre serviço de campo e me deu lindas lições de vida.

Ao amigo RUI LAROSA que, também, esteve comigo neste tempo todo e cumpriu o que prometeu ("só estou esperando você defender seu doutorado para me aposentar") e que sem vocês, não haveria material de animais no campo para trabalhar.

Sem a dupla Rui e Tatu, "mateiros inatos" seria impossível a realização de qualquer serviço de campo nos moldes que conseguimos trabalhar. Este trabalho é de e para vocês. Muito obrigada!!

*Ao amigo ANTONIO DA SILVA ARAÚJO (*in memoriam*), que participou do início de nossas atividades de serviço de campo e também nos ensinou muito.*

À Páscoa*, um raio de luz que ficou tão pouco tempo em nossas vidas, mas que fez toda a diferença.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS que tudo permitiu;

À Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, pela orientação nesse trabalho, pela confiança e pelas palavras de incentivo.

Ao Pesquisador Científico Dr. José Eduardo Tolezano, Diretor do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade e pela participação em todos os momentos do projeto, do planejamento à execução, pela leitura crítica do trabalho.

Ao Pesquisador Científico Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto, Diretor do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Carlos Roberto Elias, o *Tatu*, pela amizade sincera, pelo carinho, pela seriedade e dedicação na condução dos trabalhos de campo, pelas sugestões dadas ao longo dos trabalhos, nas capturas de animais silvestres e flebotomíneos e nas atividades com os cães.

Ao amigo Rui Larosa, pela amizade sincera, pelo bom humor nas horas difíceis por nós enfrentadas, pela dedicação e seriedade nas atividades de capturas de animais silvestres, de flebotomíneos e na contenção dos cães.

Ao Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw, pela amizade, pelas orientações, sugestões e críticas.

À Maria de Fátima Lereno de Araújo, Márcia da Conceição Bisugo, Kátia Gomes Castellão, Elaine Aparecida da Cunha, Maria Cristina Carvalho Gomes, Eleane Larosa Garcia, Rosângela Garcia pela amizade e pelo apoio fornecido nos procedimentos laboratoriais.

Aos amigos, Elizabeth Visone Nunes Westphalen e Sansão da Rocha Westphalen pela amizade em todos os momentos.

A todos os amigos e colegas do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas que estiveram comigo nesta caminhada.

À amiga Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, Pesquisadora Científica responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular pelos procedimentos de diagnóstico molecular das amostras.

À Profa. Dra. Denise Pimentel Bergamaschi, da Faculdade de Saúde Pública/USP pela orientação nas avaliações estatísticas.

Ao amigo Pesquisador Científico Dr. Antonio Marcos de Apparecida Levy, do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas, pela leitura crítica e sugestões.

Ao Dr, Antonio Conceição Paranhos Filho e Dra Camila Yuri Umeda, do Laboratório de Geoprocessamento para aplicações ambientais (DHT – UFMS), pela produção do material de georreferenciamento.

A todos os aprimorandos da FUNDAP que colaboraram neste trabalho, em particular Andréia dos Santos Garcia e Maira Freire Posteraro.

Ao Dr. Renato Pereira de Souza, Pesquisador Científico do Núcleo de Doenças Transmissíveis por Vetores do Instituto Adolfo Lutz, pela identificação de alguns roedores capturados nas áreas de estudo.

Aos colegas do Biotério de Experimentação do Instituto Adolfo Lutz pela manutenção dos animais inoculados com as amostras de material biológico dos animais capturados em Ilhabela e Itupeva.

Aos Pesquisadores José Augusto de Raeffray Barbosa e José Eduardo de Raeffray Barbosa, pela colaboração em atividades em campo.

Ao Sr. Hermann e D. Lourdes, do Sítio Três Irmãos em Itupeva que permitiram e abriram as portas de sua propriedade para que realizássemos os procedimentos de coleta de material dos animais coletados.

Ao Sr. Mario Volcoff, antigo proprietário da Fazenda Cocaia, que permitiu que trabalhássemos em sua propriedade com os animais capturados.

Às famílias dos bairros Guacuri, Monte Serrat, Quilombo e Paineiras de Itupeva, dos bairros Cocaia e Bixiga em Ilhabela e todos os moradores das áreas onde efetuamos nossas coletas, pela presteza em nos atender e permitir que trabalhássemos em suas propriedades.

Aos funcionários dos serviços de saúde de Itupeva e Ilhabela pela colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Ao Sr. Gildo e Rosangela, proprietários do Hotel Pelicano (Ilhabela) pela hospedagem e carinho com que sempre nos atenderam nestes 10 anos.

Ao INSTITUTO ADOLFO LUTZ por ter permitido a realização deste trabalho e pelo apoio fornecido.

Através do convênio SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – PROGRAMA DE CONTROLE DE DOENÇAS ENDÊMICAS (PCDEN-Nº 305/94), foi possível a concretização de parte deste trabalho.

Financiamento CNPq/Doenças Negligenciadas Edital MCT- CNPq / MS-SCTIE-DECIT – Nº 25/2006/ 409051/2006-3, finanaciamento de parte do trabalho.

RESUMO

Taniguchi HH. Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo. [Tese Doutorado]. São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2010.

Com o objetivo de investigar a ecoepidemiologia de *Leishmania* spp com relação a animais silvestres e domésticos e aos flebotomíneos, desenvolveram-se estudos no período entre 2000 e 2009 em duas áreas no Estado de São Paulo (Ilhabela S 23º 48' W 45º 20' e Itupeva na Serra do Japi, S 23º 10' W 47º 02'). Cada animal foi examinado por um ou mais dos seguintes métodos: observações clínicas, exame direto de esfregaços ou imprints de aspirados e/ou biópsias, teste rápido com antígeno rk39, intradermorreação com antígeno de *L.(V.) braziliensis*, inoculação *in vivo* e *in vitro* e extração de DNA para testes moleculares. Em relação aos animais silvestres foram utilizadas técnicas de captura-marcação-recaptura o que nos permitiu determinar a dinâmica de circulação de *Leishmania* spp. Em todas as recapturas os animais foram reexaminados. Coletas de flebotomíneos também foram realizadas nos mesmos locais e em galinheiros, utilizando-se de armadilhas luminosas, tipo Falcão modificada, aspiradores de castro, armadilha de Shannon, armadilha Disney e papéis untados com vaselina líquida. De um total de 2.714 animais silvestres capturados, 2.048 foram recapturas. Em Ilhabela verificou-se que exemplares de *Proechimys iheringi* e *Philander opossum* foram recapturados de 2 a 35 vezes e um exemplar de *Philander opossum* foi recapturado até 79 meses após sua captura. *L. (V.) braziliensis* foi observado em áreas de LTA infectando cães em Ilhabela e Itupeva, Rodentia (*Proechimys iheringi* de Ilhabela*, Nectomys squamipes e Lutreolina crassicaudata* de Itupeva) e Marsupialia (*Didelphis aurita* de Itupeva). *L. (L.) amazonensis* foi observado em áreas de LTA em *P. iheringi.*de Ilhabela. *L.(L.) infantum chagasi*, de outra parte, foi observado em áreas de LTA em Itupeva (*Akodon spp, D.*

marsupialis). Em algumas áreas foi possível determinar ciclos concomitantes de 2 ou 3 espécies de *Leishmania*. A recaptura sistemática e o longo tempo de permanência nos mesmos locais de alguns espécimes indicam, de maneira inequívoca, a existência de territórios bem definidos, principalmente para *Philander opossum* e *Proechimys iheringi* de onde pode ocorrer a dispersão da leishmaniose. *Ny. intermedia* e *Mg. migonei* foram as espécies predominantes em Ilhabela, tanto em áreas florestadas quanto em galinheiros, totalizando 93,81% das espécies coletadas. Por outro lado, em Itupeva, *Ny. neivai* (33.06%), *Ny. whitmani* (24,06%) e *Lu. longipalpis* (20,62%) foram as espécies mais abundantes no galinheiro e em áreas com mata. A presença de *Lu. longipalpis* requer atenção por ser o principal vetor da *Leishmania infantum chagasi,* no Brasil, em uma região onde foi constatada a presença de ciclo enzoótico. A infecção natural por *Leishmania* em animais silvestres e domésticos associada à presença de flebotomíneos vetores indica o risco potencial para infecção humana. Infecção de animais silvestres em áreas sem infecção humana ou canina pode indicar a presença ou perpetuação de ciclos do parasita.

Palavras chaves: leishmanioses, Estado de São Paulo, reservatórios silvestres e domésticos, vetores, dinâmica de circulação, coorte de animais silvestres.

ABSTRACT

Taniguchi HH. Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo, Brasil./ Dynamics of circulation of *Leishmania* spp in the enzootic forested environment in two regions of the State of São Paulo, Brazil. [Thesis]. São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2010.

During the last 9 years (2000-2009) we have studied the ecoepidemiology of *Leishmania* spp. in natural forested areas in São Paulo State, Brazil by the capture and release of small wild mammal, with dogs and phlebotomines. Each wild mammal were examinated by one or more of the following methods: clinical observations, direct examination of smears or imprints of aspirates and biopsies, rk39 antibody in whole blood, skin test with antigen of *L. braziliensis*, inoculation *in vivo* and *in vitro* and DNA extraction for molecular tests. After the tissue samples were taken the animals were marked on their ears and released at their capture site. At each recapture all the tests were repeated. Phlebotomines were also collected in the same places and in chicken hen by Shannon trap, Disney trap, Falcão modified light trap, Castro aspirator, paper greased with liquid vaselin. Of a total of 2,714 small mammals 2,048 were recaptures. Parasitaemias were not constant and in some animals infections parasites were not found when they were re-examined. *Pr. Iheringi* and *Ph.opossum* were captured from 2 to 35 different times in Ilhabela and one specimen of *Philander opossum* was recaptured 79 months after the first capture. In Itupeva one specimem of *Didelphis albiventris* was recaptured 15 times and another specimem *of D. albiventris* was recaptured 35 months after the capture. *L. (V.) braziliensis* was identified in 2 *P. iheringi* from Ilhabela; 1 *N. squamipes,* 1 *Lutreolina crassicaudata* and 1 *D. marsupialis* from Itupeva; *L. (Leishmania) amazonensis* in 4 *P. iheringi* from Ilhabela and, *L.(L.)i. chagasi* in 1 *Akodon sp*. and 2 *D. marsupialis* from Itupeva; *Leishmania* sp was identified in 2 *D. albiventris*, 4 *Akodon* sp from Itupeva and in 4 *Proechimys iheringi* from

Ilhabela. The recapture results indicate that the circulation and dissemination of *Leishmania* is intimately linked to animal territories. *Proechimys iheringi, Philander opossum, Didelphis aurita, Didelphis albiventris e Akodon* sp were the most abundant species in those areas, all of them related to enzootic cycle of *Leishmania* spp. In some areas it were possible to determine concomitant cycles of two or even three species. Infection of different wild animals in areas without human or canine infection says on behalf of presence and perpetuation of circulation cycles of parasite. *Ny. intermedia* e *Mg. migonei* were the predominant phlebotomines in Ilhabela, as much in forest environment as in the chicken hen with 93.81% of the total collected.In Itupeva, Ny neivai (33.06%), *Ny. whitmani* (24,06%) and *Lu longipalpis* (20,62%) were the most abundant species. The presence of *Lu. Longipalpis* requires concern due its role as *Leishmania infantum chagasi*. In this region was described a enzootic cycle of this parasite.

Key words: Leishmaniasis, State of São Paulo, wild and domestic reservoirs, vectors, dynamic of circulation, “coorte” of wild small mammals.

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO 20
2 - JUSTIFICATIVA 33
3 – OBJETIVOS 35
3.1 – OBJETIVO GERAL 35
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35
4 – MATERIAL E MÉTODOS 36
4.1 – LOCALIDADES DE ESTUDOS 36
4.2 – ANIMAIS SILVESTRES 47
4.3 – PESQUISA DE *Leishmania* 55
4.4 – ANIMAIS DOMÉSTICOS 59
4.5 - GEORREFERENCIAMENTO 60
4.6 – DADOS CLIMATOLÓGICOS 61
4.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA 62
4.8 - ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA, BIOSSEGURANÇA 62
5 –RESULTADOS 63
5.1 – LEVANTAMENTO DA FAUNA DE PEQUENOS MAMÍFEROS 63
5.2 – FLEBOTOMÍNEOS 85
5.3 - PESQUISA DE INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania* spp 91
6 – DISCUSSÃO
6.1 - ANIMAIS SILVESTRES 101
6.2 – FLEBOTOMÍNEOS 105
6.3 – ANIMAIS SILVESTRES E DOMÉSTICOS INFECTADOS 108
7 - CONCLUSÕES 112
8 - REFERÊNCIAS 115
9 - ANEXO
9.1 - Parecer da Comissão de Ética 131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa para localização dos municípios de Itupeva (em azul) e Ilhabela (em verde)	38
Figura 2	Mapa do município de Ilhabela com destaque das duas regiões estudadas: Bairro Bixiga ao sul (em amarelo) e Bairro Cocaia ao norte (em azul).	39
Figura 3	Vista do Bairro Bixiga. Ao fundo, o morro onde foram realizadas as capturas.	40
Figura 4	Vista do Bairro Cocaia, mata onde foram realizadas as capturas.	41
Figura 5	Mapa do município de Itupeva com destaque das três regiões: 1 – Bairro Paineiras (azul) e 2- Bairro Guacuri (vermelho) e 3 – Monte Serrat (amarelo).	44
Figura 6	Vista de Itupeva com as florações rochosas.	45
Figura 7	Vista parcial de Itupeva com as florações rochosas.	46
Figura 8	Local onde as armadilhas permanecem montadas. Ilha Bela, bairro Cocaia.	48
Figura 9	Armadilha com *Didelphis albiventris.*	49
Figura 10	Lesão em base de cauda de *Proechimys iheringi.*	50
Figura 11	Manchas hipocrômicas em cauda de *Proechimys iheringi.*	51
Figura 12	Codificação OEAE (orelha esquerda apical externo).	52
Figura 13	*Philander opossum* com carretel de nylon	54
Figura 14	Coleta de flebotomíneos com armadilha de Shannon.	58

Figura 15 Variação mensal da estimativa do tamanho populacional das espécies mais frequentes em Ilhabela, 2000 a 2009. 68

Figura 16 Variação mensal de temperatura e precipitação e do número de indivíduos capturados em Ilhabela, por espécie. Período 2006 a 2009. 69

Figura 17 Variação de precipitação e temperatura média mensal no município de Ilhabela no período de jun/06 a out/09. 70

Figura 18 Variação da freqüência de *Proechimys iheringi* recapturados em Ilhabela, período de 2000 a 2009. 73

Figura 19 Variação da freqüência de *Philander opossum* recapturados em Ilhabela, período de 2000 a 2009. 73

Figura 20 Variação da freqüência de *Didelphis aurita* recapturados em Ilhabela, período de 2000 a 2009 74

Figura 21 Variação mensal da estimativa do tamanho populacional das espécies mais freqüentes em Itupeva. 2000 – 2009. 81

Figura 22 Variação da precipitação e da temperatura média mensal no período de 2000 a 2009 em Itupeva. 82

Figura 23 Estimativa populacional de *Didelphis albiventris* em relação a temperatura média mensal e precipitação em Itupeva. Período de 2000 a 2009. 83

Figura 24 Frequência de flebotomíneos coletados em diferentes ambientes no município de Ilhabela. 88

Figura 25 Mapa do município de Ilhabela com amplificação das duas regiões estudadas (1– Bairro Bixiga e 2 – Bairro Cocaia). As cruzes vermelhas representam achados de animais infectados por *Leishmania* spp 91

Figura 26 Mapa do município de Itupeva com ampliação das três regiões: 1 – Bairro Paineiras, 2 - Bairro Guacuri e 3 – Bairro Monte Serrat com a representação (cruzes em verde) das infecções por *Leishmania* spp. encontradas em animais silvestres. 92

Figura 27 Número de animais com sinais de infecção segundo mês de captura em Ilhabela 97

Figura 28 Número de animais com sinais de infecção segundo mês de captura em Itupeva. 97

Figura 29 Teste rápido com antígeno rk39. 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais agentes etiológicos, manifestações clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses no Novo Mundo	22
Tabela 2	Número de animais capturados e recapturados e abundância relativa de cada espécie no município de Ilhabela, entre 2000 a 2009.	63
Tabela 3	Número de animais silvestres capturados, segundo sexo, em Ilhabela, entre 2000 e2009.	64
Tabela 4	Sucesso de captura dos animais segundo local de captura	65
Tabela 5	Número máximo de recapturas dos espécimes mais abundantes dos animais de Ilhabela. 2000 a 2009.	65
Tabela 6	Tempo de permanência, em meses, entre a captura até última recaptura dos espécimes mais abundantes em Ilhabela.	66
Tabela 7	Correlações entre total de animais capturados de cada espécie em Ilhabela. Período 2000 a 2009.	71
Tabela 8	Correlações entre o total dos animais recapturados de cada espécie em Ilhabela. Período de 2000 a 2009.	72
Tabela 9	Número de animais capturados e recapturados e abundância relativa de cada espécie no município de Itupeva. Período de 2000 a 2009.	76
Tabela 10	Número de animais capturados, segundo sexo, em Itupeva no período entre 2000 e 2009.	77
Tabela 11	Sucesso de captura dos animais segundo local de captura.	78
Tabela 12	Número máximo de recapturas das espécies mais abundantes em Itupeva. 2000 a 2009.	79
Tabela 13	Tempo de permanência, em meses, entre a captura até a ultima recaptura, das espécies mais abundantes em Itupeva. 2000 a 2009.	79
Tabela 14	Correlações entre temperatura média mensal e	84

precipitação no município de Itupeva.

Tabela 15 Flebotomíneos coletados nos municípios de Ilhabela e Itupeva, Estado de São Paulo, Brasil. Período de 2000 a 2009. 86

Tabela 16 Flebotomíneos coletados em Ilhabela, no período de 2000 a 2009, segundo espécie e local de coleta. 87

Tabela 17 Esforço de captura de flebotomíneos, segundo local de coleta em ilhabela. Período de 2000 a 2009 87

Tabela 18 Esforço de captura de flebotomíneos, segundo local de captura em Itupeva. Período de 2000 a 2009. 89

Tabela 19 Flebotomíneos coletados em Itupeva, no período de 2000 a 2009, segundo espécie e local de coleta. 90

Tabela 20 Casos humanos confirmados e notificados de LTA no Estado de São Paulo e nos municípios de Ilhabela e Itupeva, no período de 2000 a 2009. 93

Tabela 21 Quadro sinóptico dos casos humanos notificados em São Paulo, em Ilhabela e dos animais com infecção, segundo períodos do estudo. 94

Tabela 22 Quadro sinóptico dos casos humanos notificados em São Paulo, em Itupeva e dos animais com infecção, segundo períodos do estudo. 94

Tabela 23 Quadro sinóptico dos achados de animais infectados com *Leishmania* em Ilhabela no período de 2000 a 2009. 95

Tabela 24 Quadro sinóptico dos achados de animais infectados com *Leishmania* em Itupeva no período de 2000 a 2009. 96

Tabela 25 Relação de animais silvestres com teste rápido rk39 positivos, segundo espécie e local de captura. 100

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/ml – microgramas/mililitro

ºC – graus Celsius

a.C. – antes de Cristo

BHI – Brain Heart Infusion

Br. cunhai – *Brumptomyia cunhai*

Br. nitzulescui – *Brumptomyia nitzulescui*

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac

CWA – clima temperado úmido com inverno seco e verão quente

D. albiventris – *Didelphis albiventris*

D. aurita - *Didelphis aurita*

d.C.– depois de Cristo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E.F. – Estrada de Ferro

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

Ev. edwardsi - *Evandromyia edwardsi*

Ex. firmatoi – *Expapilata firmatoi*

GPS - Global Positioning System

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais renováveis

IBGE – Instituto Brasleiro de Geografia e Estatística

Km – quilômetros

L. (V.) – *Leishmania (Viannia)*

L. i. chagasi - *Leishmania infantum chagasi*

L.(L.) – *Leishmania (Leishmania)*

LTA - leishmaniose tegumentar americana

Lu. longipalpis – *Lutzomyia longipalpis*

Mg. migonei - *Migonemyia migonei*

MS – Ministério da Saúde

Ny. Intermedia *– Nyssomyia intermedia*

Ny. neivai *– Nyssomyia neivai*

Ny. whitmani - *Nyssomyia whitmani*

Pa. shannoni – *Psatiromyia shannoni*

Pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – potencial Hidrogeniônico

Ph. opossum *- Philander opossum*

Pi. fischeri *– Pintomyia fischeri*

Pi. monticola – *Pintomyia monticola*

Pr. Iheringi- *Proechimys Iheringi*

Projeção UTM – Projeção Universal Transversal de Mercator

Ps. ayrozai – *Psychodopygus ayrozai*

Psy. complexus - *Psychodopygus complexus*

RIFI – Reação de Imunofluorescência indireta

rK39 – antígeno recombinante k39

SAD – South America datum

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFM - sistema fagocítico mononuclear

WGS84 – World geodetic System

WHO – World Health Organization

1 – INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um sério problema de Saúde Pública com reflexos, inclusive, na economia. São consideradas pela Organização Mundial da Saúde, como uma das seis doenças de maior importância em Saúde Pública. Entre as protozooses ocupam o segundo lugar, sendo superadas, apenas, pela malária (LAINSON et al., 1986; WHO, 1990, 2006).

Estima-se que no mundo, cerca de 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco para a infecção por alguma espécie de *Leishmania*, principalmente em países em desenvolvimento e, que 12 milhões de pessoas estejam infectadas, com uma incidência anual de dois milhões de novos casos, dos quais 1,5 milhões são da forma tegumentar (MARZOCHI 1992; WHO, 2006). As dificuldades relacionadas ao diagnóstico e a sub-notificação dos casos sugerem que os dados oficiais estejam aquém da realidade, considerando-se que a notificação compulsória ocorre em apenas 32 países (CVE, 1995; MS, 2000; WHO, 1981, 2006).

Apesar da falta de dados estatísticos que permitam uma avaliação mais precisa sobre o impacto da doença na economia, é de se supor que cause grandes prejuízos em função da perda de mão de obra nas atividades agrícolas, extrativistas, de abertura de estradas e outras, além do impacto no turismo nas áreas endêmicas. As deformidades decorrentes das diferentes manifestações clínicas das formas tegumentares acabam por estigmatizar os pacientes impondo-lhes dificuldades de acesso na produção econômica. (ZUCKERMAN e LAINSON, 1977; WHO, 2006).

As leishmanioses são infecções parasitárias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania.* São parasitas obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, principalmente, roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, ungulados e primatas, inclusive o

homem. Estes vertebrados adquirem a infecção através do contato com o flebotomíneo vetor (Psychodidae, Phlebotominae) (ZUCKERMAN e LAINSON, 1977; LAINSON, 1985; LAINSON e SHAW, 2005).

O gênero *Leishmania* Ross, 1903 apresenta os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* Lainson e Shaw, 1987, com mais de 20 diferentes espécies incriminadas na infecção leishmaniótica (WHO, 2006).

Resumo dos principais agentes etiológicos com suas manifestações clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses no Novo Mundo encontra-se na Tabela 1. No Brasil, ocorrem todas as formas de leishmaniose presentes no Novo Mundo: leishmaniose tegumentar americana (forma cutânea, cutânea mucosa e cutânea difusa) e leishmaniose visceral americana ou calazar neotropical. Além das espécies de *Leishmania* que constam da tabela 1, *L. (V.) lindenbergi* foi isolada de soldados por ocasião de um surto de leishmaniose no Estado do Pará, Brasil (SILVEIRA et al., 2002).

Outras espécies de ocorrência na América como *L. (V.) equatoriensis, L (L.). , hertigi, L. (L.) enrietti, L.(L.) deanei, L. (L.) aristidesi e L. forattinii* foram descritas até agora apenas em animais silvestres (CUPOLLILO et al., 1998).

Como outros membros da ordem Kinetoplastida, o gênero *Leishmania* apresenta uma diversidade de formas dependendo do hospedeiro, que recebem nomes diversos conforme a posição do cinetoplasto, de onde emerge o flagelo.

Tabela 1: Principais agentes etiológicos, manifestações clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses no Novo Mundo[1].

Espécies de *Leishmania*	**Lesões causadas no homem**	**Distribuição geográfica**
L. (Viannia) braziliensis	Cutâneas e mucosas	América Central e do Sul até o norte da Argentina
L (V.) peruviana	Predominantemente cutâneas	Altos vales andinos e encosta ocidental dos Andes
L.(V.) guyanensis	Predominantemente cutâneas	Noroeste e Norte da América do Sul até o rio Amazonas
L. (V.) panamensis	Predominantemente cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
L. (V.) lainsoni	Casos raros com lesões cutâneas	Brasil (norte do Estado do Pará) , Bolívia[4] e Peru[4]
L. (V.) shawi	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
L. (V.) naiffi	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
L. (V.) colombiensis	Cutâneas e mucosas	Colômbia, Panamá e Venezuela
L. (Leishmania) mexicana	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	México, América Central, Colômbia[4], Venezuela[4] e Equador[4]
L. (L.) amazonensis	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	América Central, Colômbia[4], Peru[4], Bolívia[4], Venezuela[4,] Equador[4] e norte, nordeste, centro oeste[2], sudeste[3] e sul do Brasil.
L. (L.) pifanoi	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	Venezuela
L. (L.) venezuelensis	Cutâneas	Venezuela
L. (L.) garnhami	Predominantemente cutâneas	Andes Venezuelanos
L. (L.) infantum = L.(L.) chagasi	Lesões viscerais (calazar)	Sul do México ao Norte da Argentina, com predominância no Nordeste Brasileiro.

[1.] Segundo MARZOCHI et al., 1999; [2.] DORVAL et al, 2002; [3.] TANIGUCHI et al., 2005, [4.] DAVIES et al.2000.

Nos flebotomíneos, as formas amastigotas ingeridas no repasto sanguíneo diferenciam-se em promastigotas, de aspecto alongado, com um longo flagelo livre e cinetoplasto na região anterior, vivem e se multiplicam na luz do trato digestório e são inoculadas com a saliva do inseto, que geralmente pica o homem na face, orelhas e membros (PIMENTA et al., 2003).

Os promastigotas são fagocitados pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (macrófagos, monócitos e histiócitos) (MARZOCHI, 1992). Neste assumem formas amastigotas, caracterizadas pela ausência de flagelo livre, que se dividem por fissão binária, e à medida que vão se multiplicando, os macrófagos se rompem, liberando os parasitas que são fagocitados por outras células do SFM.

O homem, ao penetrar no ambiente florestal de circulação enzoótica de *Leishmania*, tornou-se um hospedeiro acidental destes parasitas, razão pela qual são consideradas doenças zoonóticas (ZUCKERMAN e LAINSON, 1977; NEVES et al., 1995) principalmente para as formas tegumentares.

As infecções leishmanióticas dependem de um conjunto de fatores, principalmente da inter-relação entre flebotomíneo – reservatório – *Leishmania.*

O espaço geográfico que delimita a circulação de *Leishmania* denomina-se foco natural, onde todas as condições necessárias para a garantia da perpetuação do ciclo de vida do parasita na natureza devem estar presentes.

A maioria das espécies de *Leishmania* tem sido considerada, primariamente, parasitas de animais silvestres e, menos freqüentemente, de animais domésticos. As leishmanioses são doenças zoonóticas, salvo poucas exceções (LAINSON, 1983; MELLO, 1991; ASHFORD, 2000; LAINSON e SHAW 2005).

De maneira geral, espera-se de uma espécie identificada como reservatório natural de *Leishmania*, que represente uma fonte permanente de infecção e, que uma proporção considerável de seus membros presente em áreas endêmicas seja encontrada infectada, ao menos em parte de sua existência (ASHFORD e BETTINI, 1987).

Em regiões endêmicas, no Velho Mundo, a distribuição de *Leishmania* encontra-se influenciada e limitada mais pela distribuição dos flebotomíneos vetores do que pela distribuição dos hospedeiros vertebrados. Diferentemente, no Novo Mundo, a diversidade de vetores e de reservatórios é muito maior para uma dada espécie de *Leishmania*, principalmente no caso da leishmaniose tegumentar zoonótica (ASHFORD e BETTINI, 1987).

O envolvimento de animais silvestres como reservatórios de *Leishmania* na leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi inicialmente comprovado pelo encontro de roedores silvestres naturalmente infectados no Panamá (HERTIG et al., 1957). A partir de então, importantes e numerosos achados de novas espécies de *Leishmania*, de vetores e de hospedeiros vertebrados silvestres e domésticos foram decisivos para a definição de um complexo quadro epidemiológico da LTA. Nessa estrutura é possível reconhecer diferentes ciclos de transmissão, nos quais, podem estar presentes e participantes espécies de flebotomíneos incriminadas como vetores primários, além de outras atuando como vetores secundários. O mesmo pode ser dito em relação aos reservatórios naturais, normalmente mamíferos silvestres, que atuam como possíveis fontes primárias e outros com papel secundário na manutenção e perpetuação do parasita na natureza.

Em áreas endêmicas para as leishmanioses nas Américas, dentre as dezenas de espécies de mamíferos silvestres encontradas naturalmente infectadas por alguma espécie de *Leishmania*, predominam roedores, marsupiais, edentados, poucos primatas e carnívoros (LAINSON e SHAW, 1987, 2005).

Em São Paulo, FORATTINI et al. (1976) registraram o encontro de *Akodon sp* e *Oryzomys capito* naturalmente infectados por *Leishmania braziliensis* na mesma localidade em que *Ny. intermedia* era a espécie predominante no ambiente humano.

Em focos remanescentes de transmissão silvestre no município de Afonso Cláudio, Espírito Santo, o tatu (*Euphractus sexcintus*) e a paca (*Agouti paca*) seriam os prováveis reservatórios silvestres de *Leishmania (V.) braziliensis,* onde *Ny. whitmani* desempenharia o elo de ligação entre o ambiente silvestre e o domiciliar (FALQUETO, 1995).

No município de Amaraji, uma área endêmica de colonização antiga localizada na Zona da Mata do estado de Pernambuco, foram identificados como reservatórios primários silvestres de *L. (V.) braziliensis* roedores da espécie *Bolomys lasiurus*, e outro provável reservatório silvestre primário seria o *Nectomys squamipes.* Os flebotomíneos incriminados na transmissão zoonótica foram *Ny. whitmani* enquanto *Psy. complexus* estaria envolvido no ciclo enzootico silvestre. (BRANDÃO FILHO, 2001).

Em estudo sobre a ocorrência de *Leishmania* spp no município de Capão Bonito na região do Alto Vale do Ribeira, PINTO (2004) detectou infecção em amostras de sedimento leucocitário submetidos à Nested-PCR em 60% (3/5) dos saruês capturados.

Os trabalhos da comissão encarregada de estudos da leishmaniose visceral americana realizados no Brasil em 1937 mencionaram pela primeira vez o caráter silvestre da infecção (Chagas et al., 1937, 1938).

As infecções leishmanióticas podem evoluir, desde a cura espontânea até a morte dos pacientes, como nos casos de leishmaniose visceral ou lesões mutilantes nas tegumentares.

Na LTA, as lesões podem limitar-se ao local da picada do flebotomíneo (forma cutânea) ou, por via metastática manifestar-se sob a

forma de lesões desfigurantes, com destruição da mucosa nasal e cavidades bucais (forma mucocutânea) ou disseminação generalizada (forma cutânea difusa) (TOLEZANO, 2000).

As leishmanioses tegumentares são, popularmente, conhecidas como “Úlcera de Bauru”, “Uta”, “Ferida Brava”, “Úlcera dos Chicleros”, “Espundia”, “Nariz de Tapir”, etc. conforme a região geográfica.

Nessas doenças, de caráter zoonótico, admite-se que o homem não constitua importante fonte de infecção, seja pelo pauciparasitismo nas lesões (leishmaniose cutânea), seja porque, raramente, os parasitas circulam no sangue periférico (calazar infantil). A infecção humana depende da presença de outros reservatórios (ZUCKERMAN e LAINSON, 1977; ASHFORD, 2000).

A LTA afeta o homem desde a Antigüidade, 668-626 a.C. (GÁLLEGO, 2004) até os primórdios da Era Cristã; as primeiras descrições clínicas remontam ao primeiro século d.C., na Ásia Central, chamadas de “Botão-do-Oriente”. Cerâmicas peruanas e equatorianas da época pré-colombiana (400 – 900 d.C.) retratam faces mutiladas com lesões semelhantes às causadas pela leishmaniose cutâneo difusa (PESSOA e BARRETTO, 1948).

As leishmanioses tegumentares apresentam ampla distribuição mundial, em suas diferentes formas clínicas. Ocorrem em 88 países e, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, 90% dos casos concentram-se em sete países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Argélia, Brasil e Peru (GONTIJO e CARVALHO, 2003; WHO, 2006).

Nas Américas são encontrados casos humanos autóctones desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (SIMPSON et al., 1968; ZUCKERMAN e LAINSON 1977; LAINSON e SHAW, 1979, 2005; MARZOCHI, 1992; YOUNG e DUNCAN, 1994; GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Terra e Crisciuma, citados por PESSÔA e BARRETTO (1948), confirmaram a presença do parasita em todos os estados brasileiros, desde 1913.

Na década de 80 (1980 a 1989), o Ministério da Saúde registrou 131.166 casos de LTA, representando uma média de 13.117 casos/ano, no Brasil; as Regiões Norte e Nordeste contribuíram com 80% dos casos humanos, a Centro-Oeste com 11,5%, a Sudeste com 6,8% e a Sul com 2,4% (MARZOCHI, 1992).

No período de 1990 a 2008 foram notificados 528.180 casos (média de 27.839 casos/ano) de LTA, no Brasil. Destes, 521.942 apresentavam informação da localidade de ocorrência conhecida, com a seguinte distribuição por região: Norte - 190.876 (36,57%); Nordeste – 184.426 (35,33%); Sudeste – 55.208 (10,58%); Sul – 12.114 (2,32%) e Centro-Oeste – 79.318 (15,20%). A média e respectivo desvio padrão dos coeficientes de detecção por 100.000 hab. para cada uma destas regiões foram: Norte (82,91; 18,21), Nordeste (20,96; 6,84), Sudeste (4,14; 1,31), Sul (2,59; 1,19) e Centro-Oeste (36,92; 8,56) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Além de uma possível intensificação da transmissão da LTA no segundo período (1990-2008), cerca do dobro do primeiro (1980-1989), o aumento do número de casos também pode ser explicado pela melhoria dos métodos diagnósticos, da atuação dos serviços de saúde em detectar novos casos e do fluxo de informação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

No Brasil, a LTA vem apresentando expansão geográfica, pois no início da década de 80, foram registrados casos em 20 estados, sendo que,, nos últimos anos, houve a notificação de casos autóctones em todas as unidades federadas. Em 1994 houve registro de casos autóctones em 1.861 (36,9%) municípios brasileiros e em 2002, em 2.302 municípios (41,1%).

No Estado de São Paulo, a LTA é conhecida desde 1884, porém, foi em 1908 que ocorreu a primeira grande epidemia, com feições de doença

profissional, afetando sobretudo indivíduos do sexo masculino e em idade produtiva, envolvidos nos projetos de desmatamento que precederam à construção de estradas de ferro e à expansão da produção agrícola. Este evento atingiu as regiões de Bauru, Araçatuba, Marília e Presidente Prudente, todas na margem esquerda do rio Tietê. A doença ficou conhecida como “Úlcera de Bauru” (PESSÔA e BARRETTO, 1948; TOLEZANO, 1994, 2000).

PESSÔA e BARRETTO (1948), propuseram a existência de duas regiões, quanto a endemicidade, no Estado de São Paulo: **região de alta endemicidade** abrangendo as áreas rurais ao longo da Estrada de Ferro Alta Paulista (a partir de Marília), da E.F. Noroeste (a partir de Araçatuba) e da E.F. Alta Sorocabana (a partir de Presidente Prudente) e **região de casos esporádicos ou de ausência da doença** no restante do Estado.

Este foi o panorama da LTA até a metade século XX. SAMPAIO (1951) acreditava que o fim das florestas seria suficiente para acabar com a LTA em São Paulo, posto que, a cobertura vegetal no Estado que, em fins do século XIX, era superior a 50%, na década de 50, estava reduzida a 18,2%, período que coincidiu com a diminuição do número de casos.

Novos casos só foram relatados a partir do fim dos anos 50, e por outros autores em anos subseqüentes (ALMEIDA NETO e PROENÇA, 1960; ARRUDA ZAMITH, 1960; BECHELLI et al., 1961; FORATTINI,1957; FORATTINI et al., 1972, 1973).

No final do século XX, a cobertura vegetal do Estado de São Paulo era estimada em torno de 4-5%, restando, apenas, poucas áreas preservadas e matas ciliares ao longo das bacias hidrográficas dos rios Mogi-Guaçu, Tietê, Ribeira de Iguape e Paraíba.

A distribuição dos casos de LTA coincide com a da distribuição das matas residuais, não estando mais restrita à margem esquerda do rio Tietê (TOLEZANO 1994, 2000).

Esta nova configuração da cobertura vegetal pode ter facilitado a mudança de hábitos e comportamentos das populações de flebotomíneos e de animais silvestres que, de certa maneira, adaptaram-se ao ambiente modificado pela ação antrópica.

A partir de 1979, para o Estado de São Paulo, verifica-se que algumas regiões têm se destacado em importância como focos locais de transmissão autóctone da LTA: região de Campinas, de Ribeirão Preto, de Mogi-Guaçu, do Litoral Norte e do Vale do Ribeira. Nessas regiões registram-se microfocos ou casos esporádicos atingindo indivíduos de todas as faixas etárias e sexos, perdendo a antiga conotação de doença profissional.

No período de 1979 a 1992, foram diagnosticados 2.062 casos autóctones no Estado de São Paulo, dos quais 60,23% apenas na região de Sorocaba e do Vale do Ribeira (TOLEZANO, 1994). Foi no ano de 1992 que os primeiros casos foram notificados no município de Itupeva e, a partir de 1995 em Ilhabela.

Para o período de 1993 a 2006, foram notificados 6.466 casos autóctones no Estado distribuídos em 401 municípios, com novas áreas de transmissão, ressaltando-se as regiões de Campinas, do Litoral Norte (Ilhabela, Ubatuba, Caraguatatuba e São Sebastião) além da capital do Estado. As regiões de Sorocaba e do Vale do Ribeira, ainda são aquelas que apresentam maior número de casos, totalizando 2.085 casos no período (32,25%) (CVE, 2007). Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado (CVE) de São Paulo (2010) no período de 2006 a 05/07/2010 (dados provisórios) foram notificados 1.844 casos, atingindo, 643 municípios paulistas.

No biênio 96-97, o Ministério da Saúde computou 59.814 casos de LTA no território brasileiro, exceto no Estado do Rio Grande do Sul onde não houve registro caso. No Estado de São Paulo, verificou-se 436 casos (INFORME EPIDEMIOLÓGICO DO SUS,1998).

CAMARGO-NEVES (1999) já havia observado que a transmissão atingira 258 municípios, tendo sido identificadas 22 espécies de flebotomíneos em áreas de transmissão, das quais as mais freqüentes eram *Nyssomyia intermedia s.l., Migonemyia migonei, Nyssomyia whitmani, Pintomyia pessoai* e *Pintomyia fischeri*. A autora destacou a expansão da área geográfica de transmissão como resultado do fenômeno da sobrevivência de agentes e vetores em ambiente alterado e domiciliar. Indivíduos do sexo masculino e com idade superior a 50 anos constituíam o grupo de maior risco. *Ny. intermedia s.l.* e *Mg. migonei* foram as espécies que mais se destacaram em ambientes alterados ou próximos à habitação humana. Coincidentemente, foram nos municípios que apresentaram os maiores coeficientes de incidência de LTA, onde estas espécies, também, estiveram presentes.

Já, desde o final do século passado, alguns autores chamavam a atenção para um novo perfil epidemiológico diferente daquele do início do século, passando a doença a apresentar características endêmicas (GOMES et al., 1980; ROCHA E SILVA et al., 1980; GOMES, 1992; TOLEZANO, 1994, 2000; CAMARGO-NEVES, 1999; CAMPBELL-LENDRUM, 2001; CONDINO, 2007; NEGRÃO e FERRREIRA, 2009).

O aumento da incidência de LTA, em São Paulo e no Brasil, tem sido causa de amplas discussões e preocupação, pois os casos têm ocorrido não só em áreas florestadas ou de recente colonização, mas, principalmente, em áreas de antiga colonização e áreas periurbanas (domicílio e peridomicílio) e, ainda restam lacunas a serem respondidas em relação aos reservatórios vertebrados e aos vetores das *Leishmania* spp (GOMES et al., 1980; ROCHA E SILVA et al., 1980; TOLEZANO et al., 1980; GOMES, 1992; BRANDÃO-FILHO e SHAW, 1994; LACERDA, 1994; MOMEN, 1995; PIGNATTI et al.,1995; CONDINO, 2007, DA-SILVA e CUNHA, 2007; VANZELI e KANAMURA, 2007).

Leishmaniose Tegumentar americana na região de Itupeva

Os primeiros 12 casos notificados de leishmaniose tegumentar no município de Itupeva foram em 1992, no Bairro Quilombo, área rural distante 10 km do centro urbano (PIGNATTI et al., 1995). Este núcleo de antiga colonização, caracteriza-se pela presença de um aglomerado de residências localizado à margem de mata, sem saneamento básico e cujos moradores relatam morar no local há muito tempo. A partir de então, novos casos são notificados regularmente. Neste estudo foram abordadas as questões relativas à população humana e aos flebotomíneos, concluindo-se que a doença apresenta perfil semelhante ao restante do Estado de São Paulo decorrente da adaptação das espécies vetoras em áreas que sofreram alteração antrópica.

Em relação aos flebotomíneos, nesta ocasião, três espécies mereceram destaque no domicílio e peridomicílio: *Mg. migonei, Ny. intermedia sl.* e *Ny. whitmani* e *Ex. firmatoi,* e na margem de mata destaque para *Ny. intermedia* e *Mg. migonei.*

Em função da proximidade das moradias e da mata, reservatórios silvestres poderiam exercer algum papel como mantenedores do ciclo silvestre, lacuna a ser discutida.

Leishmaniose Tegumentar americana na região de Ilhabela

O Litoral Norte paulista era considerado hipoendêmico para transmissão de LTA até os anos 80, a partir da década seguinte passou a apresentar características epidêmicas nos municípios de Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilhabela com ciclicidade a intervalos de 6 a 8 anos. Os casos notificados não mostraram correlação com atividade ocupacional, pois indivíduos de todas as faixas etárias e sexos foram acometidos.

A transmissão parece ter relação com ciclos enzoóticos, ocorrendo no peri e intradomicílio tanto no ambiente periurbano quanto no interior da mata. *Ny. intermedia* é o flebotomíneo mais abundante, também no peri e intradomicílio (CONDINO, 2007).

Na epidemia de LTA que ocorreu em 2003 no município de Ubatuba, a ação antrópica no meio ambiente foi decisiva para a aquisição da infecção. A proximidade do domicílio e a borda da mata, inferior a 50m, foi identificada como um dos fatores de risco (VANZELI e KANAMURA, 2007).

O Litoral Norte é uma região com intensa atividade turística, com trânsito permanente de hospedeiros suscetíveis à infecção por *Leishmania* spp, em particular Ilhabela, com centenas de cachoeiras e ribeirões que atraem turistas ao interior das matas.

2 - JUSTIFICATIVA

O relacionamento entre flebotomíneos (vetores) e mamíferos (reservatórios e/ou hospedeiros vertebrados), fundamental para a perpetuação de *Leishmania* em ciclos enzoóticos, somente poderá se dar em territórios delimitados pela ocupação de ambos (vetores e reservatórios). Estudos anteriores indicam de maneira inequívoca a existência de territórios bem definidos.

A utilização de uma abordagem técnica distinta daquela classicamente empregada para investigação de infecção natural em animais silvestres, sem sacrifícios indiscriminados de todos os animais estudados (ética e ecologicamente conseqüentes), quando do monitoramento da circulação de microrganismos de interesse em Saúde Pública, como a estratégia de marcação e recaptura, aqui utilizada, além de permitir a obtenção de conhecimentos sobre a ecologia de potenciais reservatórios silvestres do parasita, possibilitou reconhecer, que pelo menos 9,3% dos animais silvestres encontravam-se naturalmente infectados no ambiente endêmico florestal. Com esta constatação de que a transmissão enzoótica continua ocorrendo, resta-nos saber qual (ais) a(s) espécie(s) de reservatórios silvestres ou sinantrópicos e de flebotomíneos têm importância neste ciclo e qual o papel destes na transmissão domiciliar e peridomiciliar de *Leishmania* spp (TOLEZANO et al.; 2002, 2006).

Partindo-se da premissa de que a perpetuação na natureza das leishmanioses aqui estudadas é determinada pela existência de ciclos enzoóticos silvestres onde estão presentes todas as condições necessárias para a garantia da perpetuação do ciclo de vida das leishmânias na natureza, vetores e reservatórios representados por mamíferos silvestres com territórios bem delimitados, a partir dos quais se dispersam e disseminam para outros espaços e ambientes, em decorrência, entre outros

fatores, das alterações e agressões na paisagem natural, têm-se as seguintes suposições:

A expansão e disseminação das leishmânias ocorrem a partir dos seus focos naturais tendo como veículos mamíferos silvestres com territorialidade bem definida.

Os mamíferos e vetores que mantêm os ciclos enzoóticos silvestres diferem em paisagens distintas.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Estudar a ecoepidemiologia das espécies de *Leishmania* voltada aos vetores e animais terrestres, roedores, marsupiais e outros em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo para avaliar a dinâmica da circulação desses parasitos na transmissão humana da doença.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a infecção por *Leishmania* spp. de mamíferos silvestres em ambientes florestados e no peridomicílio humano e de flebotomíneos das regiões de estudo;
- Identificar através da positividade em vetores e animais a circulação e dispersão de *Leishmania,* a partir da utilização de estratégia de captura, coleta de amostras biológicas, marcação, liberação e recaptura de mamíferos silvestres (“coorte”) nas regiões de desenvolvimento dos estudos;
- Identificar as espécies dos potenciais vetores em locais de captura e nos prováveis abrigos de animais silvestres encontrados naturalmente infectados nas regiões de estudo; e
- Caracterizar fatores ecológicos de transmissão para compor a ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar nas regiões estudadas**.**

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo ecológico com observações do objeto, em tempo definido e áreas geográficas bem delimitadas.

4.1 - LOCALIDADES DO ESTUDO (Figura 1)

Município de Ilhabela (23° 46’ S e 45° 21’ O) dista 220 km da cidade de São Paulo. Apresenta área total de 336 km^{2} e é composto de 17 ilhas, ilhotas e lajes, sendo a maior das ilhas, a chamada Ilha de São Sebastião. Com vegetação típica de Mata Atlântica e ecossistemas associados é considerada a maior ilha do litoral sudeste brasileiro. A população fixa é, de aproximadamente, 20.000 habitantes, contingente que triplica nos período de temporada de verão.

Nos séculos XVII e XVIII, à época dos escravos, Ilhabela conheceu o seu apogeu econômico, com o plantio da cana para fabricação do açúcar e no século seguinte com o plantio do café, o que ocasionou grande devastação da Mata Atlântica. No século XX, as plantações de cana retornaram, desta feita para a produção de aguardente, atividade encerrada definitivamente nos anos 70.

Atualmente, a principal fonte de renda é o turismo, incrementado pela inauguração do ferry-boat que facilitou a travessia do continente para a ilha e pela chegada da energia elétrica, pelos idos de 1958.

A partir dos anos 80, o incremento do turismo propiciou aumento na atividade da construção civil voltada para edificação de residências de veraneio e, em conseqüência, Ilhabela e as demais cidades do Litoral Norte começaram a receber um grande afluxo de migrantes oriundos de diversos Estados brasileiros.

Em 1977 o governo do Estado de São Paulo, criou o Parque Estadual de Ilhabela, declarado Reserva da Biosfera pela UNESCO, que abriga uma das últimas reservas, praticamente, virgens da Mata Atlântica, com mais de 300 quedas d'água, riachos e ribeirões e mais de 30 praias.

O relevo da região é bastante acidentado, destacando-se os picos de Baepi (1025 m), do Papagaio (1037 m) e o de São Sebastião (1379 m). Essas formações compõem uma barreira para os ventos fortes carregados de chuva que vêm do oceano, razão pela qual o clima da região é o tropical úmido com grande ocorrência de chuvas. A temperatura média anual é de 25^0C, e nos meses do verão pode atingir 35^0C.

A vegetação, típica da mata tropical, ainda apresenta árvores centenárias com mais de 30 metros de altura, figueiras, manacás- da-serra, quaresmeiras, pau-jacaré, guapuruvu, além de orquídeas e bromélias.

A Mata Atlântica e seus ecossistemas associados como a restinga e o mangue abrigam centenas de espécies de animais silvestres como o macaco prego, esquilos (*Sciurus ingrami*), pequenos roedores, entre eles, um roedor endêmico da ilha, o cururuá (*Echimys thomasi*), e o rato de espinho (*Proechimys iheringi*), considerado reservatório silvestre de *Leishmania* em algumas regiões do país, além de gambás (*Didelphis aurita*) e cuicas (*Philander opossum*). No mangue encontramos tocas do caranguejo guaiamum. Aves, como o tucano, maritaca, pica pau, tangará, trinca-ferro, araponga, macuco, gavião-pega-macaco, apuim-das-costas-amarelas, jacu e jacutinga são encontradas na área do Parque. Aves migratórias, também, encontram refúgio nestas matas. (PARQUE ESTADUAL DE ILHABELA,, 2010). Ilhabela apresenta mais de 140 km de costa em duas faces litorâneas distintas: a face oceânica, com cerca de 70 km de costões rochosos, voltados para o mar aberto, onde vive a maioria das 18 comunidades caiçaras, descendentes dos antigos colonizadores. Estas populações mantém, praticamente, intactas as tradições de seus antepassados e vivem à base da pesca e da roça rudimentares.

A LTA, em Ilhabela, começou a ser notificada há mais de 15 anos, numa aparente expansão do continente para a Ilha, vindo de Parati, no Estado do Rio de Janeiro, para Ubatuba, Caraguatatuba e São Sebastião. Somente no ano de 1995 o serviço municipal de saúde registrou mais de 100 casos de LTA, por eles notificados como autóctones. Na face continental urbanizada, a mais freqüentada pelos turistas, é onde se concentra a maioria dos casos de LTA.

Em Ilhabela foram selecionadas duas regiões de estudo: o Bairro Cocaia, mais ao norte da Ilha de São Sebastião e o Bairro Bixiga ao sul da Ilha (Figura 2), distantes, aproximadamente 12 km entre si (Figuras 1, 2, 3, 4).

Figura 1 - Mapa para localização dos municípios de Itupeva (em azul) e Ilhabela (em verde).

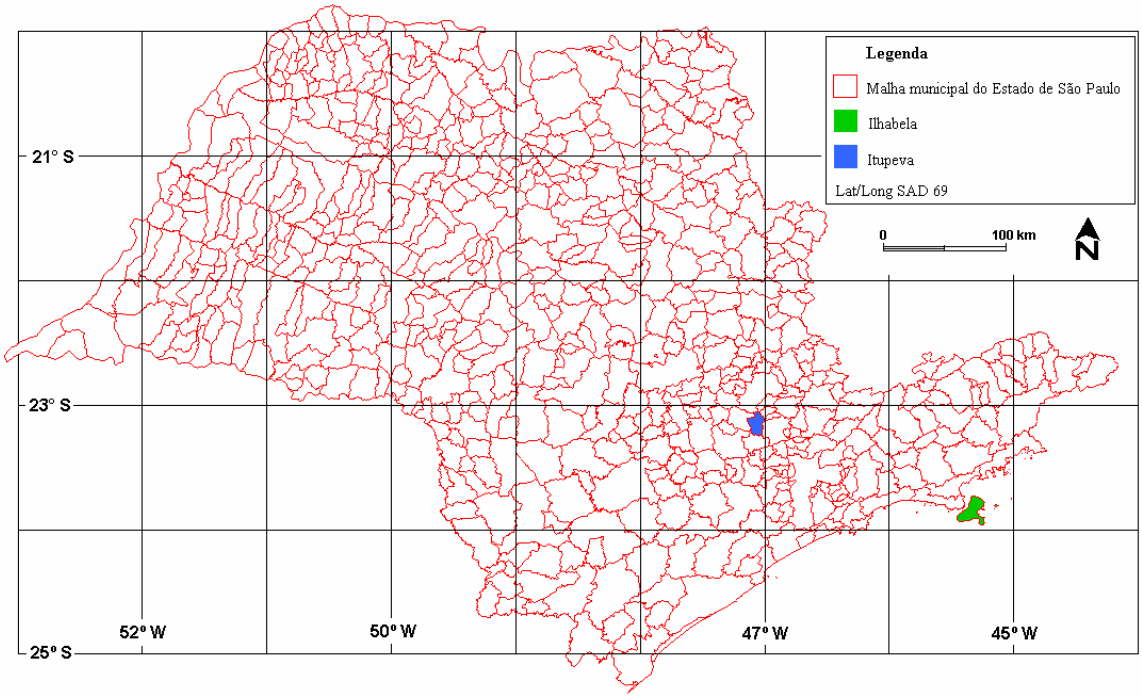
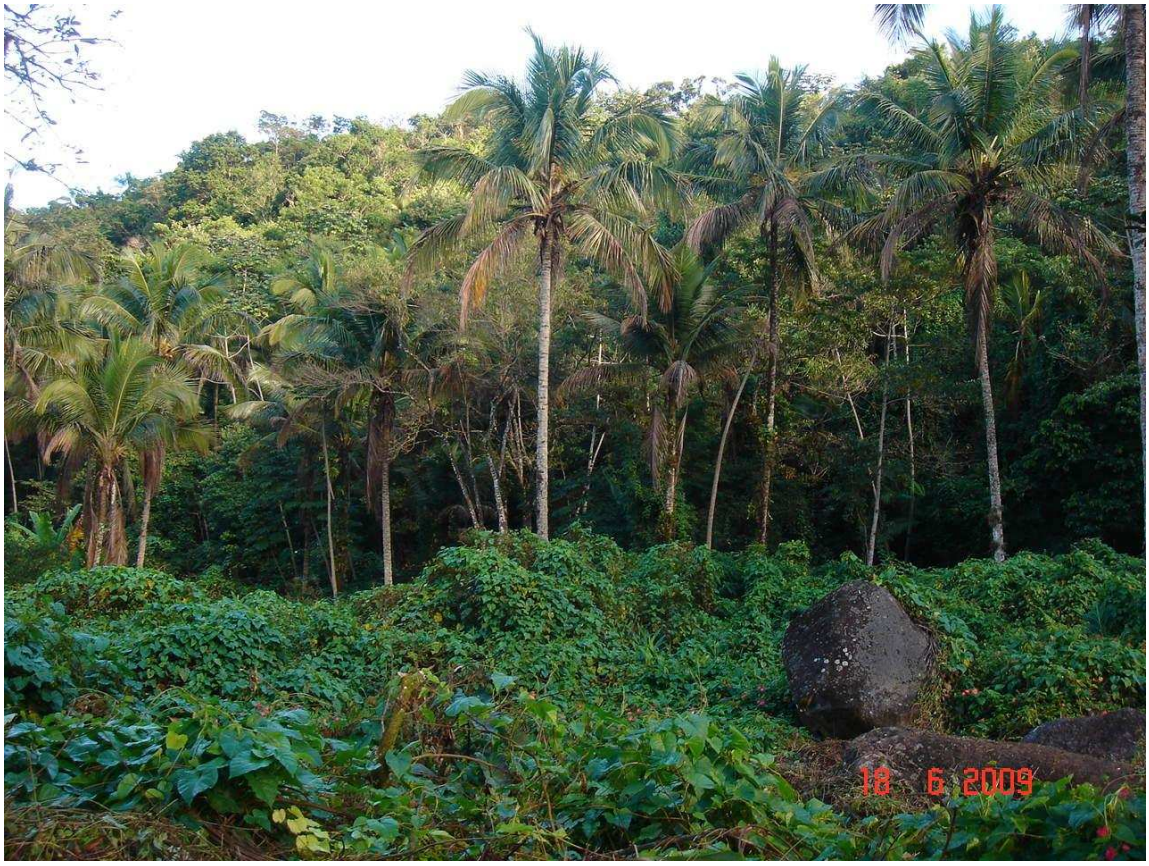


Figura 2 – Mapa do município de Ilhabela com destaque das duas regiões estudadas: Bairro Bixiga ao sul (em amarelo) e Bairro Cocaia ao norte (em azul).

Fonte: Google mapas

Figura 3 – Vista do Bairro Bixiga. Ao fundo, o morro onde foram realizadas as capturas de animais silvestres e de flebotomíneos.

Figura 4 – Vista do Bairro Cocaia, mata onde foram realizadas as capturas de animais silvestres e de flebotomíneos.



Município de Itupeva ($23^0$09’ S; $47^0$04’ O); 661m acima do nível do mar), distante cerca de 70 km da cidade de São Paulo, localiza-se na região de Jundiaí, envolvendo a Serra do Japi e as colinas da Bacia de Jundiaí. Possui área de 166 km^2 de zona rural e 30 km^2 de zona urbana e população estimada para o ano de 2009 de aproximadamente de 42.458 habitantes (IBGE). Segundo a classificação de Koppen, o clima da região é do tipo Cwa, denominado mesotérmico de inverno seco. A temperatura média anual de 21^0C e a precipitação pluviométrica média anual de 1.393 mm (período de 1941 a 2001) (Prefeitura Municipal de Itupeva). Por ser região de transição entre a Serra do Mar e o Planalto Paulista, a Serra do Japi acolhe representantes de fauna e flora desses dois grandes ecossistemas. A paisagem é constituída de um conjunto de pequenos morros arredondados de fundo úmido, com fragmentos de matas ciliares ao longo do rio Jundiaí, que atravessa todo o município. A vegetação é classificada como Floresta Mesófila Semidecídua e ocupa a maior parte da Serra do Japi, até as altitudes de 1000 m. Apresenta árvores com 10 a 15 metros de altura, sendo os principais representantes: Caesalpiniaceae Fabaceae, Mimosaceae, Rutaceae, Meliaceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Lauraceae, Anacardiaceae, Lecythidaceae e Myrsinaceae. As atividades agrícolas estão voltadas para o cultivo de uvas, plantio de cereais, flores, leguminosas e frutas. Merece destaque a existência, ainda, na zona rural de algumas colônias em antigas fazendas de café e áreas de matas secundárias nas encostas dos morros. Chamam a atenção as extensas áreas com florações rochosas, características da região, de onde ocorre, atualmente, extração de granito para calçamento.

A fauna da Serra do Japi é composta de animais de hábitos generalistas e dieta variada, convivendo bem com as alterações antrópicas da região, sendo comumente encontrados em pomares e plantações de frutas e verduras. O macaco sagui-da-serra, *Callithrix aurita* (Callithrichidae), os gambás: *Didelphis aurita* e *D. albiventris* e a cuíca *Philander opossum* (Didelphidae), o tatu *Dasypus novemcinctus* (Dasipodidae), a raposa

Cerdocyon thous (Canidae), o quati *Nasua nasua* (Procyonidae), a ariranha *Galictis* sp (Mustalidae), o esquilo *Sciurus* sp (Sciuridae) e a preá *Cavia aperea* (Caviidae), são alguns dos principais representantes (SERRA DO JAPI, 2007; JAPI, 2010).

A LTA foi diagnosticada pela primeira vez no município de Itupeva no Bairro Quilombo, em 1992, sendo os primeiros casos reconhecidos como autóctones. Desde então, outros casos esporádicos vem sendo notificados nesta e em outras localidades do município. Foram identificados em sua fauna flebotomínica *Ny. whitmani, Mg. migonei, Ny. intermedia s.l.* e *Pi. fischeri*, sendo registrada, ainda, a presença de *Lutzomyia longipalpis*.

O município, endêmico para leishmaniose tegumentar, apresenta, ainda, ciclo silvestre de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, agente da leishmaniose visceral americana e a presença de *Lu. longipalpis* seu principal principal vetor (TOLEZANO et al., 2004a, 2004b).

Neste município foram selecionadas três áreas de estudo, o Bairro Monte Serrat, Bairro Paineiras e o Bairro Guacuri, distantes, aproximadamente 10 km entre si (Figura 5, 6, 7).

Figura 5 - Mapa do município de Itupeva com destaque das três regiões: 1 – Bairro Paineiras (azul) e 2- Bairro Guacuri (vermelho) e 3 – Monte Serrat (amarelo) onde foram realizados as capturas de animais silvestres e flebotomíneos.

Figura 6 - Vista da área rural do município de Itupeva com as florações rochosas.

Figura 7 – Vista parcial de da área rural do município de Itupeva com as florações rochosas.

4.2 - ANIMAIS SILVESTRES

4.2.1 – Captura de animais silvestres

No período de outubro de 2000 a setembro de 2009, foram realizadas capturas de animais silvestres para pesquisa de infecção natural por *Leishmania,* em locais onde ocorreram casos humanos e caninos de LTA. Para tanto foram utilizadas armadilhas tipo gaiolas de grade de arame galvanizado dobráveis, tendo bananas como iscas, apresentando as seguintes dimensões: 30,0 cm x 20,0 cm x 20,0 cm que permitem a captura dos animais vivos (Figuras 8 e 9). Em todas as localidades de captura as armadilhas foram dispostas em áreas florestadas distantes 200m da residência mais próxima, exceto no Bairro Monte Serrat, no município de Itupeva, onde as capturas foram realizadas no peridomicílio de um pequeno sítio.

As capturas foram realizadas mensalmente, exceção feita nos meses com condições climáticas desfavoráveis. As armadilhas permaneceram abertas diuturnamente durante três dias e duas noites consecutivos, sendo sempre armadas nos mesmos pontos em todas as expedições de campo.

Em Ilhabela, no Bairro Cocaia, em uma área de 200m x 10m (Cocaia abaixo) e outra perpendicular de 100m x 10m (Cocaia acima), 25 armadilhas foram distribuídas aleatoriamente em cada uma das duas trilhas existentes. No Bairro Bixiga, utilizou-se uma área de 200m x 15m com 25 armadilhas distribuídas aleatoriamente. Coletas esporádicas foram realizadas no Bairro Água Branca.

Em Itupeva, no Bairro Guacuri, numa área de 100 x 100m foram montadas 20 armadilhas, no Bairro Monte Serrat, dentro de um sítio foram distribuídas seis armadilhas e no Bairro Paineiras, em duas trilhas de 200m x 7m (Paineira acima) e 100m x 5m de comprimento (Paineira abaixo), distantes entre si 200m, foram distribuídas 24 armadilhas, totalizando esforço de captura de 6.460 armadilhas noite.

Figura 8 - Armadilha de arame galvanizado com isca de banana para captura de animal silvestre. Ilha Bela, bairro Cocaia.

Figura 9 –– Armadilha com *Didelphis albiventris*

Foram respeitadas a necessidade de licença específica, e as restrições de captura apontadas pelo IBAMA (Licença para Captura, Coleta e Transporte) e diagnóstico da infecção natural por *Leishmania* spp. (Licença N°. 301692).

Os animais capturados foram identificados quanto ao local da captura, espécie, sexo e presença de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose. Em todos os locais onde houve captura ou recaptura as coordenadas geográficas foram identificadas com GPS (Global Positioning System). Na presença de lesões cutâneas ou manchas hipocrômicas na pele, foi coletada uma biópsia para tentativa de isolamento de *Leishmania* (Figura 10 e 11).

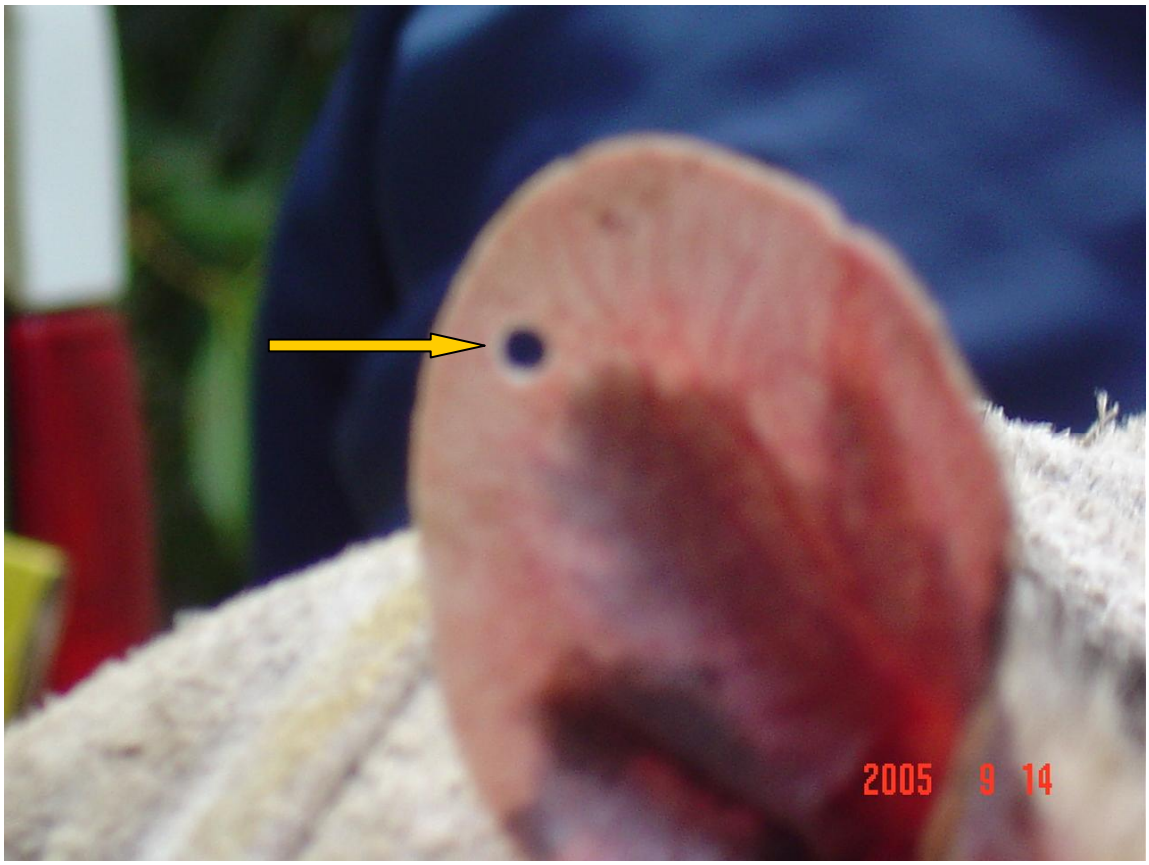
Figura 10 - Lesão em base de cauda de *Proechimys iheringi.*

Figura 11 – Manchas hipocrômicas em cauda de *Proechimys iheringi.*

4.2.2. Marcação e captura

Todos os animais capturados foram marcados com furos nas orelhas, técnica tipo mossa australiana para posterior reconhecimento quando de recaptura(s), constituindo-se uma verdadeira coorte de animais silvestres. Cada orelha pode receber de 1 a 4 furos distribuídos em quatro quadrantes (apical esquerda, apical direita, basal esquerda e basal direita) o que permitiu centenas de combinações. A Figura 12 mostra um exemplo de codificação.

Figura 12 – Codificação OEAE (orelha esquerda apical externo).



Após os procedimentos, os animais foram liberados nos mesmos locais de captura sem necessidade de eutanásia.

Quando recapturados os animais foram identificados, a partir da decodificação da marcação anteriormente feita e, uma nova biópsia foi coletada;

4.2.3 Localização de abrigos naturais de animais silvestres.

Foi realizada segundo técnica descrita por MILES 1976, utilizando um tubo de fio dental com 100m ou 200m colocado no dorso do animal imediatamente antes de sua liberação no local exato em que foi capturado, para possibilitar estudos sobre vetores e a biologia desses animais silvestres (Figura 13).

Figura 13 – *Philander opossum* com carretel de nylon para pesquisa de abrigo.

4.3 - PESQUISA DE *Leishmania* spp

Os seguintes procedimentos para confirmação da presença de infecção natural por *Leishmania* foram utilizados:

1. **Biópsia** - Na presença de lesões ou manchas hipocrômicas nos animais silvestres capturados, foi realizada uma biópsia e o material colocado em um flaconete com solução salina 0,85% com gentamicina (400µg/ml) mantido sob refrigeração até o momento do processamento. No laboratório, no fluxo laminar, a biópsia foi macerada e inoculada 0,3ml da suspensão, via subcutânea, nas patas dianteiras de 02 hamsteres que foram observados, quinzenalmente, quanto à presença de lesões no local da inoculação, por um período de 6 a 12 meses.

2. **Teste rápido para diagnóstico de infecção natural por *L. i. chagasi*** - Para avaliar a infecção por *L. i. chagasi* nos animais silvestres utilizou-se o kit **rK39 dipstick test (Inbios International-USA).** O teste rápido para anticorpos anti-rK39 é um ensaio imunocromatográfico qualitativo, realizado em membrana (dipstick) para a detecção de anticorpos específicos na leishmaniose visceral em amostras de soro de humanos e de animais. A fita é previamente coberta com o antígeno recombinante K39 (rK39) e conjugado constituído por proteína A e ouro coloidal na posição de realização do teste, chamada linha de teste e, com anticorpo anti-proteína A na posição chamada linha controle. A amostra reage com o conjugado marcado e essa mistura migra pelo sistema cromatográfico até reagir com o antígeno recombinante, gerando uma linha vermelha se houver anticorpos específicos. A leitura da reação é realizada em 10 minutos. Em Itupeva, região com presença de *Lutzomyia longipalpis,* porém, sem registro prévio de leishmaniose visceral humana ou canina, desde junho de 2002 os animais capturados foram examinados para a infecção natural por *L.(L.) infantum chagasi*, pelo teste rápido rK39 em amostra de sangue total colhido e executado em campo. Quando positivo, foram examinadas

vísceras (fígado e baço) na tentativa de isolamento e/ou extração de DNA de *Leishmania*.

3. **Exames anatomopatológicos e de imunohistoquímica**. Os animais que apresentaram alguma evidência de infecção natural por *Leishmania (L.) infantum chagasi,* isto é, reagentes ao teste rápido rK39, foram eutanasiados e parte de biópsia de baço, foi encaminhada ao Laboratório de Anatomopatologia do Instituto Adolfo Lutz, para investigação de presença de formas amastigotas.

4. **Extração e purificação de DNA e posterior amplificação em PCR**, a partir de biópsia de pele colhida quando da captura/recaptura do animal silvestre. **Extração de DNA -** As amostras de lesão ou de fragmento de baço foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA descrito por SAMBROOK et al. (1989) e com as modificações previamente descritas por GOMES et al.(2007). As amostras foram maceradas e dissolvidas em tampão de lise (Tris-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcosil, 0,01%; proteinase K, 100µg/mL) e incubadas em banho-maria a 56℃ de uma a quatro horas, até a lise completa do tecido. Moléculas de DNA foram extraídas pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. A seguir, as moléculas de DNA foram dissolvidas em água pura, após lavagem com etanol a 70% a 10.000g por 10 minutos. A concentração de DNA e a qualidade das extrações foram verificadas por Nanodrop.

PCR – As reações de amplificação foram realizadas com auxílio de um kit (Promega), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA e os iniciadores apropriados para cada experimento foram adicionados ao kit e colocados no termociclador. As amostras de DNA foram testadas com um marcador molecular 150-152, que amplifica um fragmento de 120 pb da região conservada dos minicirculos do kDNA de *Leishmania spp* (PASSOS et al., 1999). A PCR foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95℃ por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95℃ por 45

segundos, anelamento de 55℃ por 45 segundos e exte nsão a 72℃ por 45 segundos. As reações foram finalizadas com um ciclo de extensão final a 72℃ por 5 minutos.

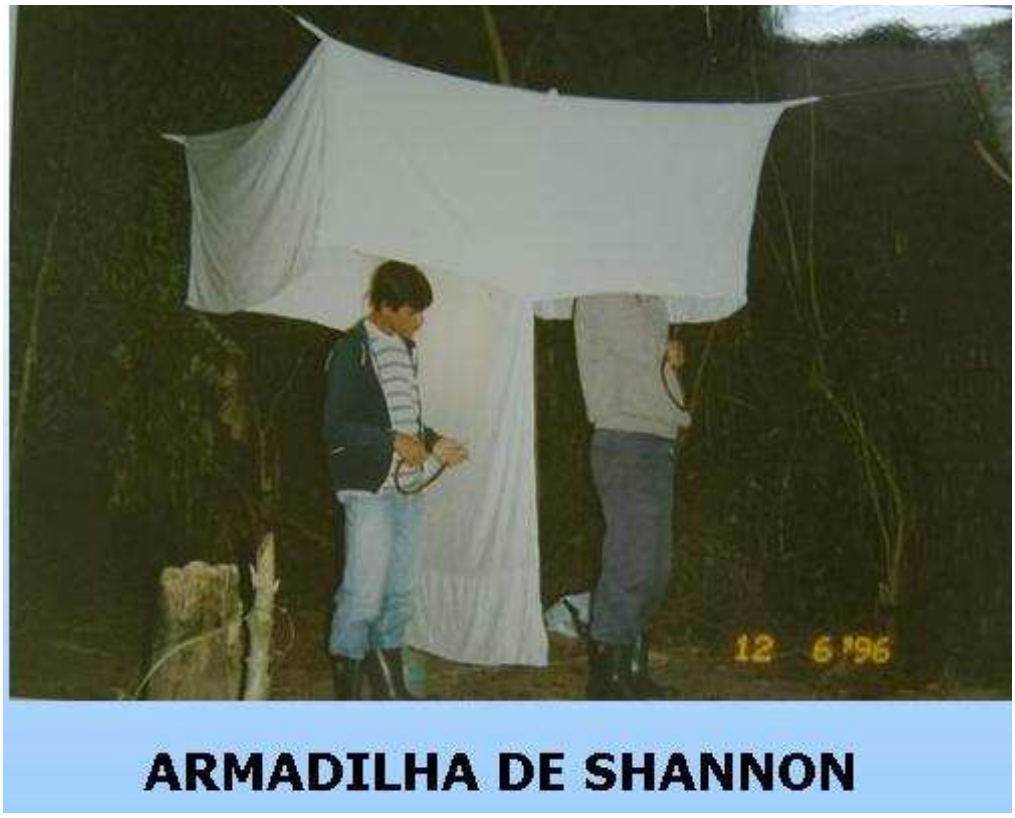
A identificação de *L. (L.) infantum chagasi* foi realizada utilizando o marcador molecular RV1-RV2, que amplifica um fragmento de 145 pb de uma região variável do minicirculo do kDNA (região LT1), especfica para o complexo *L. (L.) donovani* (RAVEL et al., 1995; GOMES et al., 2007). As amplificações foram compostas de um ciclo inicial de desnaturação a 94℃ por 5 minutos, seguidas de 30 ciclos de desnaturação a 94℃ por 30 segundos, anelamento de 60℃ por 30 segundos e exte nsão a 72℃ por 30 segundos. As reações foram finalizadas com um ciclo de extensão a 72℃ por 5 minutos. Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação. A cada conjunto de reações foram adicionados dois controles negativos, um contendo apenas água pura e outro com DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *Leishmania spp.*; e um controle positivo, uma amostra sabidamente positiva.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 2% e corados com brometo de etídio. A seguir, os fragmentos foram visualizados sob iluminação ultravioleta. As imagens foram analisadas por um equipamento Mini Bis Gel Imager and Documentation (BioSystematica). Os tamanhos dos fragmentos foram baseados comparando-se com um marcador de tamanho molecular de 100 bp.

5. **Pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp em vetores**. Armadilhas luminosas, tipo Falcão, modificadas foram instaladas em cada local onde houve o encontro do possível abrigo natural de um animal seguido e em galinheiros dos peridomicílios onde foram constatados casos de LTA humano e/ou canino. Estas armadilhas permaneceram nos locais por duas noites/mês, quando as condições meteorológicas assim permitiram. Foram utilizados aspiradores, tipo aspirador de Castro, movidos a pilha, para captura nos troncos e arredores do abrigo; outras armadilhas foram montadas de acordo com as necessidades – armadilhas de Disney

(utilizando como iscas os animais capturados) ou papéis (tipo sulfite) untados com vaselina líquida e armadilha de Shannon (Figura 14).

Figura 14 – Coleta de flebotomíneos com armadilha de Shannon.



Os flebotomíneos coletados foram mortos, uma parte foi clarificada na seguinte sequência e tempo: fenol (24 h) → hidróxido de potássio (12 h) → ácido acético + fuccsina (10')→ álcool 70^0 (10') → álcool 90^0 (10') → álcool 95^0 (10') → álcool absoluto (10') → óleo de cravo (até a montagem). Os espécimens foram montados entre lâmina e lamínula, em meio ENECÊ e identificados por características externas e internas (genitália e espermatecas), segundo GALATI (2003). O nome das espécies foi abreviado segundo MARCONDES (2007).

Parte das fêmeas foi dissecada para pesquisa de infecção natural por *Leishmania*, segundo a metodologia preconizada por JOHNSON et al. (1963): as fêmeas foram lavadas com solução salina estéril (para remoção das escamas, cerdas e poeiras), transferidas para uma lâmina com uma gota de solução salina estéril, onde as patas e asas foram retiradas e o trato digestivo foi exposto para observá-lo ao microscópio. A identificação das espécies foi realizada por meio das espermatecas.

4.4 – ANIMAIS DOMÉSTICOS

Em Itupeva foram examinados 76 cães recolhidos no Centro de Controle de Zoonose do município. Após o exame clínico, os animais foram sacrificados. A necropsia foi realizada, sendo coletadas amostras de sangue para o diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* spp. por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), ambos os testes realizados com kits produzidos por Bio-Manguinhos/Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Na presença de quadro clínico compatível com leishmaniose (lesão de pele, hepatoesplenomegalia), foi feita biopsia para retirada de material para o exame parasitológico direto (imprints de lesão e baço) e inoculação *in vitro* e *in vivo.*

Inquérito epidemiológico domiciliar em população canina do Bairro Monte Serrat. Foram examinados 73 cães, quanto à presença de sinais ou sintomas de leishmaniose e colhidas amostras de sangue dos animais em papel de Filtro Whatman nº 1 destinadas ao exame sorológico. Nesses animais também foi feita a aplicação de teste intradérmico com antígeno particulado total, segundo MARZOCHI et al. (1990), e/ou parasita íntegro de *Leishmania (Viannia) braziliensis,* cepa MHOM/BR/75/M2903, preparado a partir da obtenção de forma promastigota, em fase estacionária e crescimento em meio bifásico Ducrey/BHI, com lavagens em solução de Hanks e, ressuspensão final em solução mertiolatada. A concentração final foi ajustada para cerca de $5{,}0 \times 10^6$ formas por dose de 0,1 ml. O antígeno foi aplicado na face interna da coxa do animal e a leitura realizada após 48h. A enduração observada foi avaliada em mm.

Também foram realizados exames diagnósticos (sorologia, exame parasitológico, teste intradérmico e PCR) em 6 cães no Bairro Guacuri, cujos animais apresentavam sintomas de leishmaniose tegumentar .

4.5 – GEORREFERENCIAMENTO

Para a confecção dos mapas municipais e bases analisadas foram utilizadas a malha municipal vetorial do Estado de São Paulo e as malhas vetoriais do setor urbano de cada município, obtidas através do site do IBGE.

Para a malha municipal vetorial do Estado de São Paulo (IBGE, 2007a) e o setor urbano dos municípios de Caraguatatuba (IBGE, 2007b), Ilhabela (IBGE, 2007c) e Itupeva (IBGE, 2007d), a base cartográfica é do ano de 2007 e utiliza como referência o Sistema de Coordenadas Geográfico (Lat/Long) e *datum* horizontal SAD69. As imagens utilizadas foram Landsat 7 ETM+, disponíveis no site GLCF: *Earth Science Data Interface* já georreferenciadas em *datum* horizontal WGS84 e projeção UTM. Para a

análise visual e apresentação dos resultados, foram utilizadas composições falsa cor RGB 453 e RGB 543, onde, respectivamente, a vegetação é visualizada em vermelho e em verde. Quanto maior a biomassa, maior é a intensidade dessas cores.

As coordenadas foram coletadas com GPS de navegação em projeção Geográfica e *datum* WGS84.

Para a análise espacial dos casos positivos em cada município, é necessário trabalhar com as bases cartográficas e as coordenadas em uma mesma projeção e *datum*. Dessa forma, as coordenadas e a malha municipal vetorial de Ilhabela e Itupeva foram reprojetadas para UTM, zona 23 e *datum* SAD69. Para integração das malhas vetoriais e as imagens Landsat, a base vetorial foi reprojetada para a mesma projeção das imagens, sendo trabalhadas em projeção UTM e *datum* WGS84.

A conversão das coordenadas de Geográfica para UTM e mudança de *datum* foi realizada utilizando o programa Erdas Imagine (ERDAS, 2006).

Para demarcar as coordenadas nas malhas municipais vetoriais, elaboração dos mapas e processamento digital das imagens de satélite foi utilizado o programa PCI Geomatica Focus (PCI, 2003).

A localização dos municípios analisados pode ser observada na Figura 1.

4.6 DADOS CLIMATOLÓGICOS

Os dados sobre precipitação e temperatura foram obtidos no site do CIIAGRO (Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas) (2010).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados o cálculo de estimativa populacional através do Método de Joly Seber (KREBS, 1989), testes de correlação e seus intervalos de confiança (Testes de Correlação de Pearson e de Spearman pelo programa estatístico SPSS).

O esforço amostral de captura (EC) foi obtido multiplicando-se o número de armadilhas por noite pelo número de meses trabalhado.

O sucesso de captura (SC) em cada local de trabalho foi calculado através da fórmula: SC = número de espécimes/ EC x 100. (STALLINGS, 1989)

Abundância relativa de cada espécie foi obtida dividindo-se o número de indivíduos da espécie pelo número total de todas as espécies capturadas.

4.8 - ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA, BIOSSEGURANÇA

Bioética – Este estudo é um sub-projeto do Projeto de Pesquisa: **Estudos Estratégicos das leishmanioses e da Doença de Chagas nas Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil,** coordenado pelo Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw, com aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (Anexo 1)**.** O presente projeto não envolve seres humanos como população de estudo, sendo desenvolvidas apenas observações em mamíferos silvestres e sinantrópicos, e populações de insetos.

Biossegurança – Foram adotadas como norma a obrigatoriedade e registro da utilização de medidas de proteção individual e coletiva dos pesquisadores envolvidos, próprias e regulamentadas para atuação com os microrganismos de maior classe de risco.

5 – RESULTADOS

5.1 – LEVANTAMENTO DA FAUNA DE PEQUENOS MAMÍFEROS

5.1.1 Ilhabela

As capturas de animais revelaram uma diversidade (riqueza) de 11 espécies de pequenos mamíferos distribuídos em 3 ordens: Didelphimorphia, Rodentia e Squamata (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de animais capturados e recapturados e abundância relativa de cada espécie no município de Ilhabela, entre 2000 a 2009.

	Total	**Abundância relativa (%)**	**capturas**	**%**	**recaptura**	**%**
Ordem DIDELPHIMORPHIA						
Didelphis aurita	141	13,78	102	72,34	39	27,66
Gracilinanus agilis	5	0,68	5	100,00	0	0,00
Philander opossum	756	37,97	281	37,17	475	62,83
ORDEM RODENTIA						
Cavia aperea	9	0,68	5	55,56	4	44,44
Echimys thomasi	7	0,95	7	100,00	0	0,00
Olygoryzomys sp	2	0,27	2	100,00	0	0,00
Oryzomys sp	14	1,76	13	92,86	1	7,69
Oxymycterus incanus	44	3,51	26	59,09	18	40,91
Proechimys iheringi	896	38,92	288	32,14	608	67,86
Sciurus ingrami	10	1,35	10	100,00	0	0,00
ORDEM SQUAMATA						
Teguxim tupinambis	1	0,13	1	100,00	0	0,00
Total	**1885**	**100,00**	**740**	**39,26**	**1145**	**60,74**

Tabela 3 – Número de animais silvestres capturados, segundo sexo, em Ilhabela, entre 2000 e2009.

	macho	fêmea	Não registrado	Total
ORDEM DIDELPHIMORPHIA				
Didelphis aurita	47	94	0	141
Gracilinanus agilis	5	0	0	5
Philander opossum	356	399	1	756
ORDEM RODENTIA				
Cavia aperea	1	8	0	9
Echimys thomasi	1	4	2	7
Olygoryzomys sp	0	2	0	2
Oryzomys sp	9	2	3	14
Oxymycterus incanus	32	12	0	44
Proechimys iheringi	502	394	0	896
Sciurus ingrami	3	2	5	10
ORDEM SQUAMATA				
Teguxim tupinambis	0	0	1	1
Total	**956**	**917**	**12**	**1885**

Dos 896 exemplares de *Proechimys iheringi* uma das três espécies mais abundantes em Ilhabela, verificaram-se 502 machos e 394 fêmeas, com uma razão sexual de 1,27:1, diferente da proporção esperada de 1:1 (χ^2= 13,01, g.l.=1; p<0,001); *Philander opossum* com 356 machos e 399 fêmeas (razão sexual de 0,89:1 (χ^2= 2,45, g.l.=1; p>0,05) e, *Didelphis aurita* com 47 machos e 94 fêmeas (razão sexual de 0,5:1; χ^2= 15,67, g.l.=1; p<0,001) (Tabela 3).

Em Ilhabela, o esforço de captura foi de 8.518 armadilhas/noite em 166 noites de trabalho, totalizando 1.885 animais.

O sucesso de captura total foi de 22,13%, e, os valores para cada ambiente estudado variaram de 10,07% a 24,83% (Tabela 4).

Tabela 4 – Sucesso de captura dos animais silvestres segundo local de captura em Ilhabela no período de 2000 a 2009.

	Bairro Cocaia abaixo	Bairro Cocaia acima	Bairro Bixiga	Bairro Água Branca	Total
Total de animais capturados	939	379	552	15	1.885
Esforço de captura	3.781	1.751	2.837	149	8.518
Sucesso de captura	24,83%	21,64%	19,46%	10,07%	22,13%
Meses	82	51	60	03	

De um total de 1.885 animais, 400 (21,22%) foram capturados uma única vez e outros 1.485 (78,78%) foram recapturados de 1 até 35 vezes. Tabela 5

Tabela 5 – Número máximo de recapturas dos espécimes mais abundantes dos animais de Ilhabela. 2000 a 2009.

especie	Sexo	Número recapturas
Oxymycterus incanus	**fêmea**	**3**
Didelphis aurita	**macho**	**4**
Didelphis aurita	**fêmea**	**6**
Oxymycterus incanus	**macho**	**7**
Philander opossum	**macho**	**9**
Philander opossum	**fêmea**	**18**
Proechimys iheringi	**macho**	**23**
Proechimys iheringi	**fêmea**	**35**

O tempo transcorrido entre a captura e a última recaptura dos indivíduos nas áreas de pesquisa variou de um mês até 79 meses por um exemplar fêmea de *Philander opossum*. O tempo de vida desta espécie varia de 6 a 7 anos para os machos e até 10 anos para as fêmeas.

O tempo máximo de um indivíduo de acordo com as espécies e sexo (quando os dois foram capturados) pode ser observado na Tabela 6. O tempo de permanência na área de estudo foi considerado como o número de meses que se passou entre a primeira e a última recaptura, mesmo que o indivíduo não tenha sido capturado em todos os meses desse intervalo

Tabela 6 - Tempo transcorrido, em meses, entre a captura até última recaptura dos espécimes mais abundantes em Ilhabela.

espécie	sexo	meses
Didelphis aurita	Macho	3
Oxymycterus quaestor	Femea	6
Cavia aperea	Femea	26
Oxymycterus quaestor	Macho	43
Proechimys iheringi	Femea	49
Proechimys iheringi	Macho	61
Didelphis aurita	Femea	61
Philander opossum	Macho	78
Philander opossum	Femea	79

Proechimys iheringi, Ph. opossum e *Di. aurita* foram as três espécies capturadas com as freqüências mais elevadas, tendo sido observada diferença significativa entre as populações de *Pr. iheringi* e *Ph. opossum* ($r_{pearson}$ = 0,4148; n=24; p = 0,044; $r_{spearman}$= 0,4922; n=24; sig 0,015)) e entre *Pr. Iheringi* e *Di. aurita* ($r_{pearson}$=0,5280; n=24; p=0,008). Figura 15,16 e 17

Para *Proechimys iheringi* foram verificados picos nos meses de junho e julho de 2002 e agosto de 2005, no entanto, a partir de 2006, houve sensível queda na sua densidade populacional (Figura 15,16 e 17).

A distribuição mensal do número dos animais capturados e da precipitação e temperatura está apresentada na Figura 16. Visualmente, parece ocorrer uma tendência de aumento de capturas dos animais nos períodos mais secos e diminuição nos períodos mais chuvosos, no entanto, a análise de correlação de Spearman não mostrou qualquer correlação significante entre o número de animais mais abundantes e temperatura média mensal nem tão pouco em relação ao índice de precipitação no mês anterior ao da captura. Ressalte-se que foi analisado apenas o período compreendido entre os meses de julho/2006 a outubro/2009, a partir dos registros disponíveis na base de dados do CIIAGRO (Figura 17). Entretanto verificou-se correlação positiva e significante entre temperatura e precipitação ($r_{spearman}$=0,6466; n=17; sig 0,004).

Figura 15 - Variação mensal da estimativa do tamanho populacional das espécies mais frequentes em Ilhabela, 2000-2009.

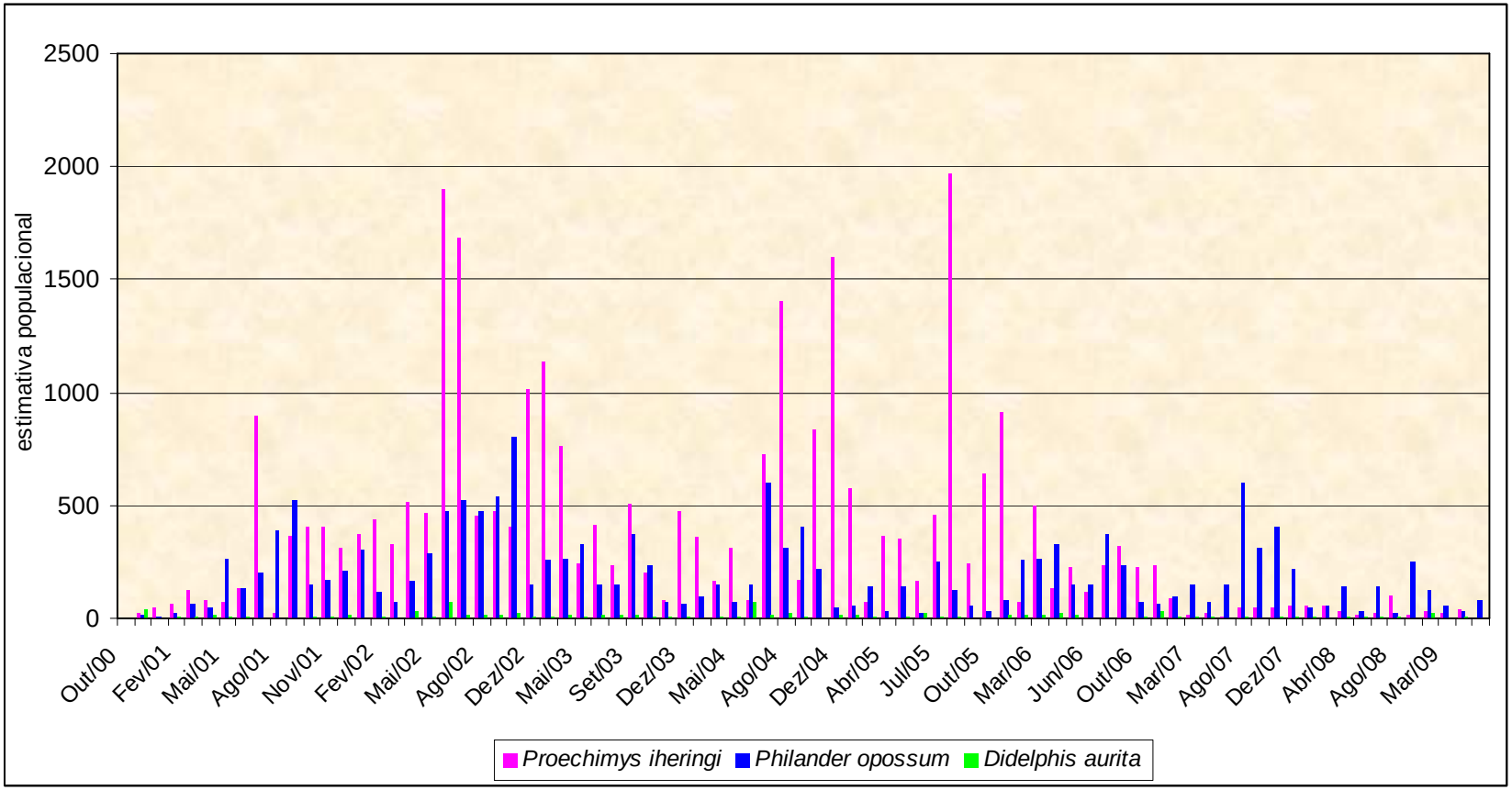


Figura 16 – Variação mensal de temperatura e precipitação e do número de indivíduos capturados em Ilhabela, por espécie. Período 2006 a 2009.

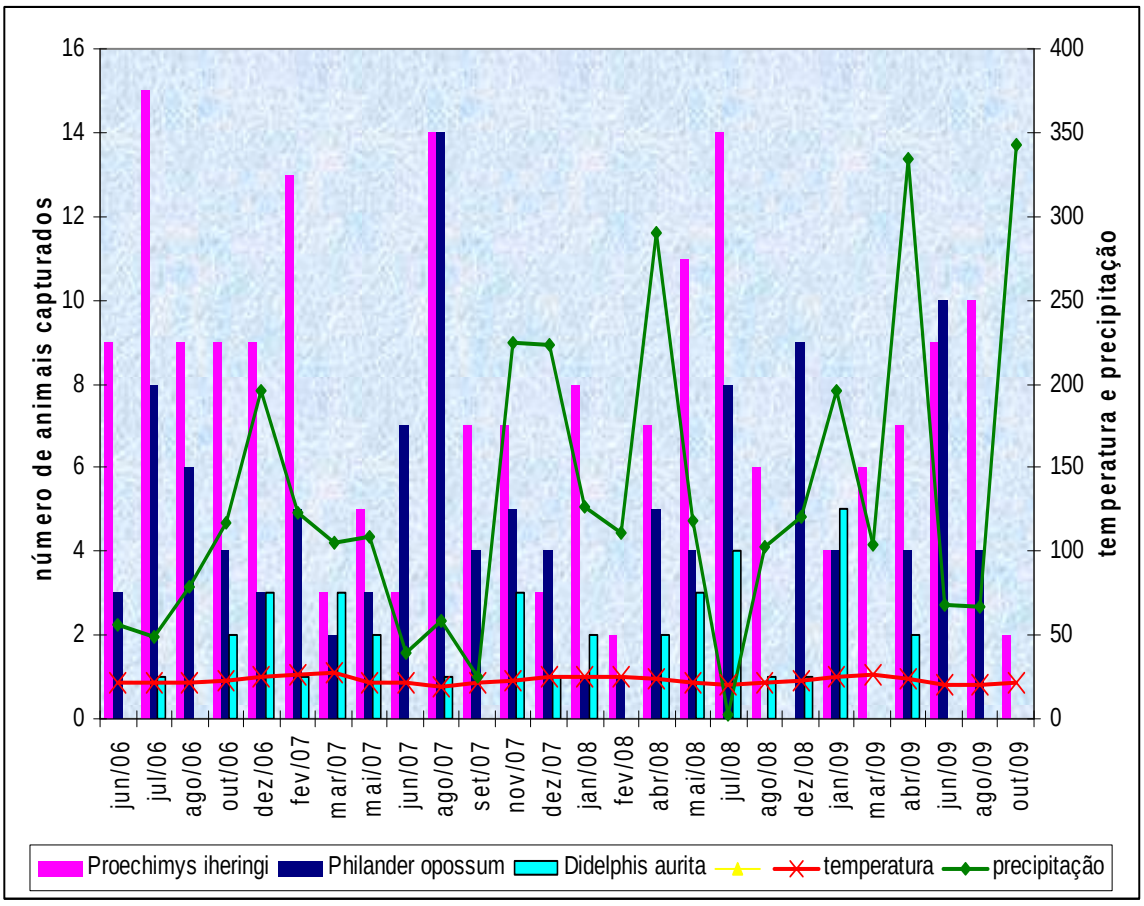
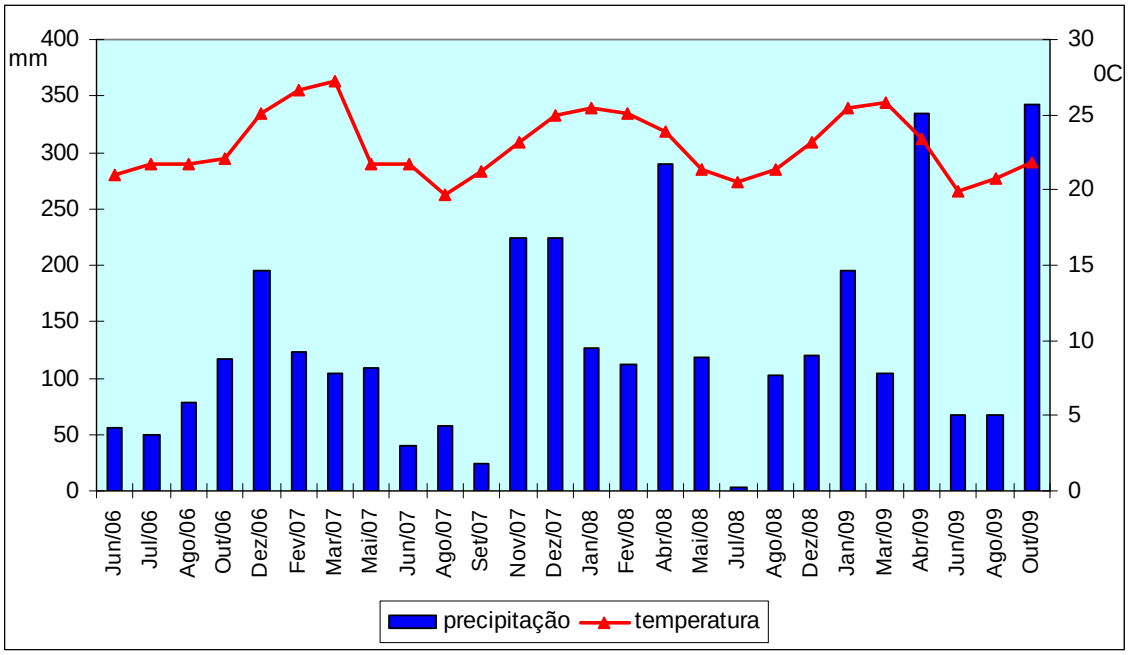


Figura 17 - Variação de precipitação e temperatura média mensal no município de Ilhabela no período de jun/06 a out/09.



Foi observada a presença de fêmeas prenhas de roedores e de filhotes no marsúpio e de marsupiais jovens em quase todos os meses do ano. Não foi observada correlação entre estes dados com temperatura e a precipitação do mês anterior à captura, pelo menos no período em que havia disponibilidade daqueles dados. No período de 2006 a 2009, em apenas quatro ocasiões foram capturadas fêmeas prenhas de *Proechimys iheringi* (fev/06, fev/07, ago e set/07).

Encontros de *Didelphis albiventris* jovens ou no marsúpio foram mais freqüentes nos meses de abril e dezembro, enquanto *Philander opossum* jovens ou no marsúpio foram encontrados em todos os meses do ano.

A maior abundância de espécies foi observada em junho, julho e agosto, época de menor intensidade de chuvas. A riqueza de espécies por

mês variou de 1 a 5, sendo que *Proechimys iheringi* e *Philander opossum* sempre estiveram presentes em todas as capturas. Por outro lado, durante o desenvolvimento deste estudo, os meses em que se verificou menor captura foram os de fevereiro e março, que coincide com a estação chuvosa. No entanto, estatísticamente não houve correlação significativa.

Quando se analisa a correlação entre o total de capturas das três espécies predominantes, verifica-se correlação significante entre roedores e marsupiais, mas não entre os marsupiais conforme se observa na Tabela 7.

Quando se trata da análise das recapturas, ocorreu correlação significativa entre as espécies, *Philander opossum* e *Didelphis aurita*, *P. opossum* e *Proechimys iheringi,* mas não esta e *D. aurita.* (Tabela 8)

Tabela 7 – Correlações entre total de animais capturados de cada espécie em Ilhabela. Período 2000 a 2009.

	Proechimys iheringi	*Philander opossum*	*Didelphis aurita*
Pearson			
Proechimys iheringi		**0,6253** **n(82)** **p= 0,000**	**0,2232** **n(82)** **p= 0,044**
Philander opossum	**0,6253** **n(82)** **p= 0,000**		0,1130 n(82) p= 0,312
Didelphis aurita	**0,2232** **n(82)** **p= 0,044**	0,1130 n(82) p= 0,312	
Spearman			
Philander opossum	**0,5384** **n(82)** **sig 0,000**		
Didelphis aurita	**0,2726** **n(82)** **sig 0,013**	0,0648 n(82) sig 0,563	

Tabela 8 – Correlações entre o total dos animais recapturados de cada espécie em Ilhabela. Período de 2000 a 2009.

	Proechimys iheringi	*Philander opossum*	*Didelphis aurita*
Pearson			
Proechimys iheringi		**0,6061** **n(83)** **P= 0,000**	0,1928 n(83) P= 0,081
Philander opossum	**0,6061** **n(83)** **P= 0,000**		**0,2458** **n(83)** **P= 0,025**
Didelphis aurita	0,1928 n(83) P= 0,081	**0,2458** **n(83)** **P= 0,025**	
Spearman			
Philander opossum	**0,6283** **n(83)** **sig 0,000**		
Didelphis aurita	**0,2362** **n(83)** **sig 0,032**	**0,2918** **n(83)** **sig 0,007**	

Nas Figuras 18 e 19, percebe-se uma variação de recapturas de *Proechimys iheringi* e *Philander opossum* entre 20 e 90%, principalmente até 2005, fase em que alterações ambientais tornaram-se mais freqüentes, enquanto *Didelphis aurita* em 68% das ocasiões não foi recapturado (Figura 20).

Figura 18 – Variação da freqüência de *Proechimys iheringi* recapturados em Ilhabela, período de 2000 a 2009.

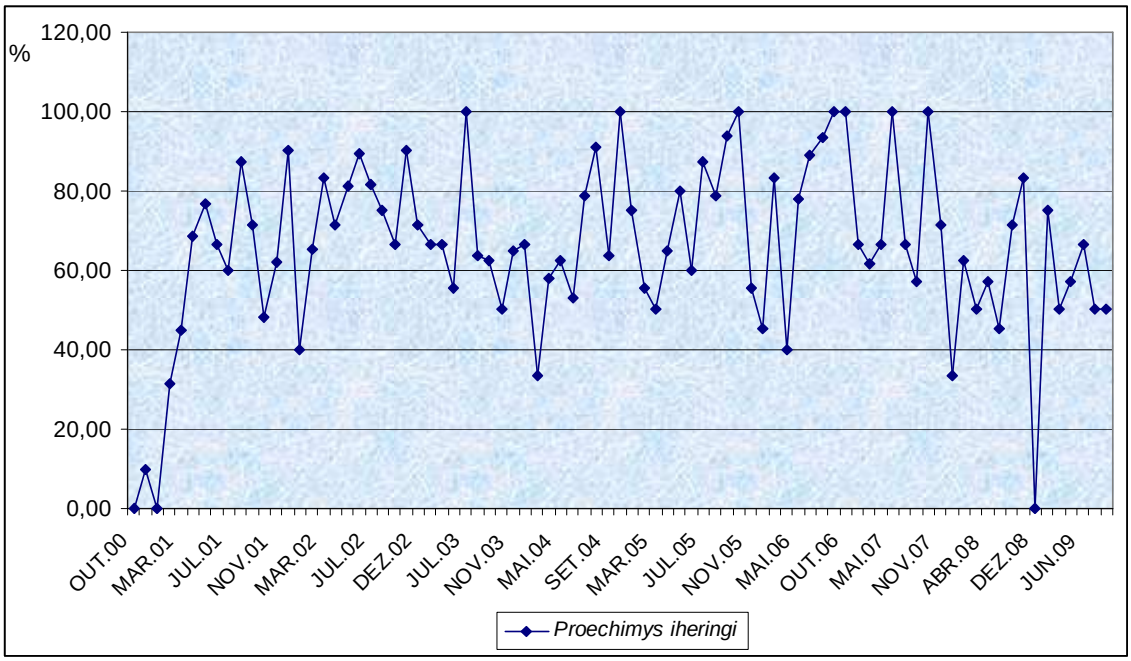


Figura 19 – Variação da freqüência de *Philander opossum* recapturados em Ilhabela, período de 2000 a 2009.

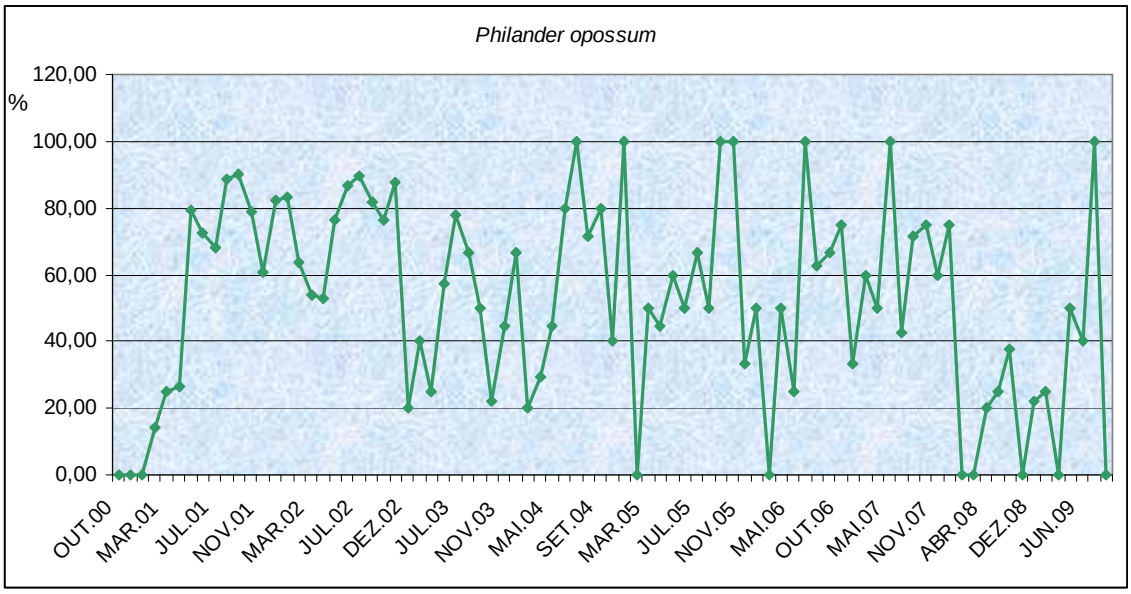
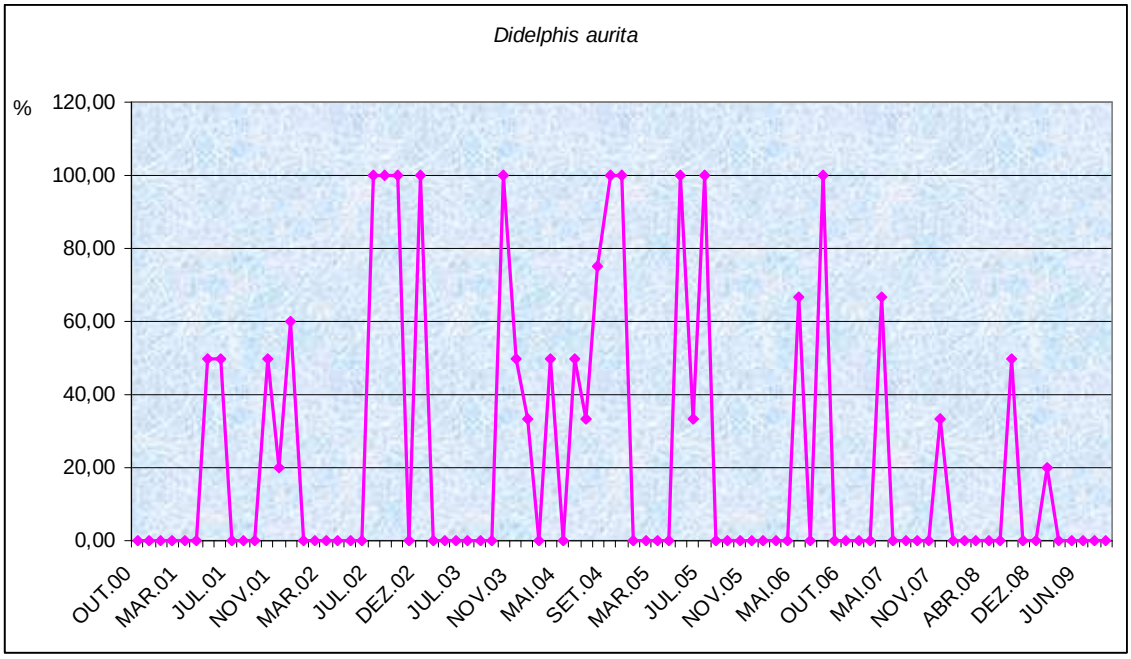


Figura 20 – Variação da freqüência de *Didelphis aurita* recapturados em Ilhabela, período de 2000 a 2009.



Em Ilhabela, no Bairro Cocaia, de outubro/00 até novembro/05, as coletas foram realizadas em duas trilhas que se bifurcavam a partir da trilha principal, que denominamos Cocaia de cima e Cocaia de baixo. A distância entre os primeiros pontos de coleta de cada trilha não é superior a 100m, entretanto, em nenhuma ocasião um animal capturado na Cocaia de cima foi recapturado na Cocaia de baixo e vice versa.

Na tentativa de se localizar prováveis tocas ou ninhos, mais de 100 exemplares de *D. aurita, P. opossum* e *P. iheringi* foram seguidos utilizando-se carretéis de rastreamento, com fios de nylon de 100 ou 200m, acoplados em seus dorsos. Em vista do terreno irregular e bastante acidentado com muitas pedras limosas e espécies de palmeiras espinhosas como as brejaúvas, não se obteve muito sucesso nesta empreitada, apenas 10% dos animais seguidos entraram em tocas ou ocos de pedras. Não se pode afirmar que sejam seus ninhos ou tocas ou se apenas se esconderam. De

qualquer maneira, as distâncias percorridas não ultrapassaram 100m, mesmo quando estavam com carretéis de 200m.

5.1.2 - Itupeva

No município de Itupeva observou-se uma diversidade (riqueza) de 13 espécies distribuídas em 6 ordens. (Tabela 9)

Tabela 9 – Número de animais silvestres capturados e recapturados e abundância relativa de cada espécie no município de Itupeva. Período de 2000 a 2009.

	TOTAL	Abundância relativa (%)	captura	%	recaptura	%
ORDEM DIDELPHIMORPHIA						
Didelphis albiventris	379	36,53	156	41,16	223	58,84
Didelphis aurita	119	18,50	79	66,38	40	33,62
Lutreolina sp	2	0,47	2	100,00	0	0,00
ORDEM RODENTIA						
Akodon sp	263	35,36	151	57,41	112	42,59
Nectomys squamipes	47	6,09	26	55,32	21	42,86
Oligoryzomys nigripes	1	0,23	1	100,00	0	0,00
Oxymycterus quaestor	9	0,70	3	33,33	6	66,67
Rattus rattus	1	0,23	1	100,00	0	0,00
ORDEM XENARTHRA						
Dasypus novemcinctus	2	0,47	2	100,00	0	0,00
ORDEM PRIMATES						
Callithrix sp	2	0,47	2	100,00	0	0,00
ORDEM SQUAMATA						
Teguxim tupinambis	2	0,47	2	100,00	0	0,00
ORDEM CARNIVORA						
Cerdocyon thous	1	0,23	1	100,00	0	0,00
Galictis vittatis	1	0,23	1	100,00	0	0,00
TOTAL	**829**	**100,00**	**427**	**51,51**	**402**	**48,49**

Tabela 10 – Número de animais silvestres capturados, segundo sexo, em Itupeva no período entre 2000 e 2009.

	macho	fêmea	não registrado	TOTAL
ORDEM DIDELPHIMORPHIA				
Didelphis albiventris	129	250	0	379
Didelphis aurita	48	71	0	119
Lutreolina crassicaudata	1	0	1	2
ORDEM RODENTIA				
Akodon sp	150	106	7	263
Nectomys squamipes	14	31	2	47
Oligoryzomys nigripes	1	0	0	1
Oxymycterus quaestor	2	7	0	9
Rattus rattus	1	0	0	1
ORDEM XENARTHRA				
Dasypus novemcinctus	1	1	0	2
ORDEM PRIMATES				
Callithrix sp	1	1	0	2
ORDEM SQUAMATA				
Teguxim tupinambis	0	0	2	2
ORDEM CARNIVORA				
Cerdocyon thous	0	0	1	1
Galictis vittatis	0	0	1	1
TOTAL	**348**	**467**	**14**	**829**

Em Itupeva, região do planalto, ocorrem duas espécies simpátricas *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*, que, juntamente com o roedor *Akodon* sp compõem 90,39% do total de animais capturados.

A espécie mais abundante foi *D. albiventris*, com 379 exemplares, 129 machos e 250 fêmeas (razão ♂:♀= 0,52:1; χ^2= 38,63, g.l.= 1; p<0,001). A segunda espécie mais abundante, *Akodon* sp, com 150 machos e 106

fêmeas (razão ♂:♀= 1,41:1; χ^2= 7,56; p<0,01) e *Didelphis aurita* com 48 machos e 71 fêmeas (razão ♂:♀= 0,67:1; χ^2= 4,44; p<0,04) (Tabela 10).

O esforço de captura e o sucesso de captura cada local de trabalho encontram-se representados na Tabela 11.

Tabela 11 – Sucesso de captura de animais silvestres segundo local de captura em Itupeva. Período de 2000 a 2009.

	Bairro Guacuri	**Bairro Paineiras**	**Bairro Monte Serrat I**	**Bairro Monte Serrat II**	**Total**
Total de animais capturados	248	432	86	63	829
Esforço de captura	2.537	2.824	732	367	6.460
Sucesso de captura	9,73%	15,30%	11,75%	17,17%	12,83%
Meses	66	68	62	25	

Em Itupeva foram capturados 829 diferentes animais, dos quais 266 (32,09%) tiveram uma única captura e os demais foram recapturados de 1 a 15 vezes, como uma fêmea de *Didelphis albiventris* (Tabela 12).

Tabela 12 – Número máximo de recapturas dos espécimes mais abundantes em Itupeva. 2000 a 2009.

Espécie	Sexo	Número de recapturas
Didelphis aurita	**Macho**	**2**
Nectomys squamipes	**Macho**	**3**
Nectomys squamipes	**Fêmea**	**4**
Didelphis aurita	**Fêmea**	**5**
Didelphis albiventris	**Macho**	**6**
Akodon sp	**Macho**	**6**
Akodon sp	**Fêmea**	**7**
Didelphis albiventris	**Fêmea**	**15**

Diferente do que aconteceu em Ilhabela, vimos que na região do planalto, o tempo de permanência foi consideravelmente menor, sendo o máximo de 34 meses observado de uma fêmea de *Didelphis albiventris.* (Tabela 13)

Tabela 13 - Tempo transcorrido, em meses, entre a captura até a ultima recaptura, dos espécimes mais abundantes em Itupeva. 2000 a 2009.

espécie	sexo	meses
Didelphis aurita	**Fêmea**	**6**
Nectomys squamipes	**Macho**	**15**
Nectomys squamipes	**Fêmea**	**21**
Didelphis aurita	**Macho**	**25**
***Akodon* sp**	**Macho**	**25**
Didelphis albiventris	**Macho**	**28**
Akodon sp	**Fêmea**	**30**
Didelphis albiventris	**Fêmea**	**34**

Os picos populacionais foram verificados nos meses de setembro/01 e julho/02, por *Didelphis albiventris* com população estimada em 750 e 733,5 respectivamente, também foi observada uma queda na densidade populacional nos anos seguintes, embora não tenha sido percebida qualquer alteração ambiental nas localidades de coleta. (Figuras 21, 22 e 23). No decorrer das capturas observou-se aumento da população de *D. aurita* e diminuição na população de *D. albiventris.*

A maior abundância de espécies capturadas foi observada nos meses de maio e setembro/02 e a diversidade de espécies variou de 1 a 5.

No período de 2000 a 2002, verificou-se correlação negativa significativa entre estimativa do tamanho populacional de *Didelphis albiventris* em relação a temperatura ($r_{spearman}$= -0,4455; sig 0,029; n=18) indicando aumento do tamanho populacional no inverno, conforme Figura 23. Nos demais períodos ocorreu apenas correlação significativa entre temperatura e precipitação. (Tabela 14).

Apesar de não ter ocorrido correlação significativa entre precipitação e estimativa populacional, observa-se, pelo menos visualmente no gráfico que, em períodos de menor precipitação, isto é, no inverno (de junho a setembro), há aumento no número de animais capturados e na estimativa do tamanho populacional.

Figura 21- Variação mensal da estimativa do tamanho populacional das espécies mais freqüentes em Itupeva. 2000-2009

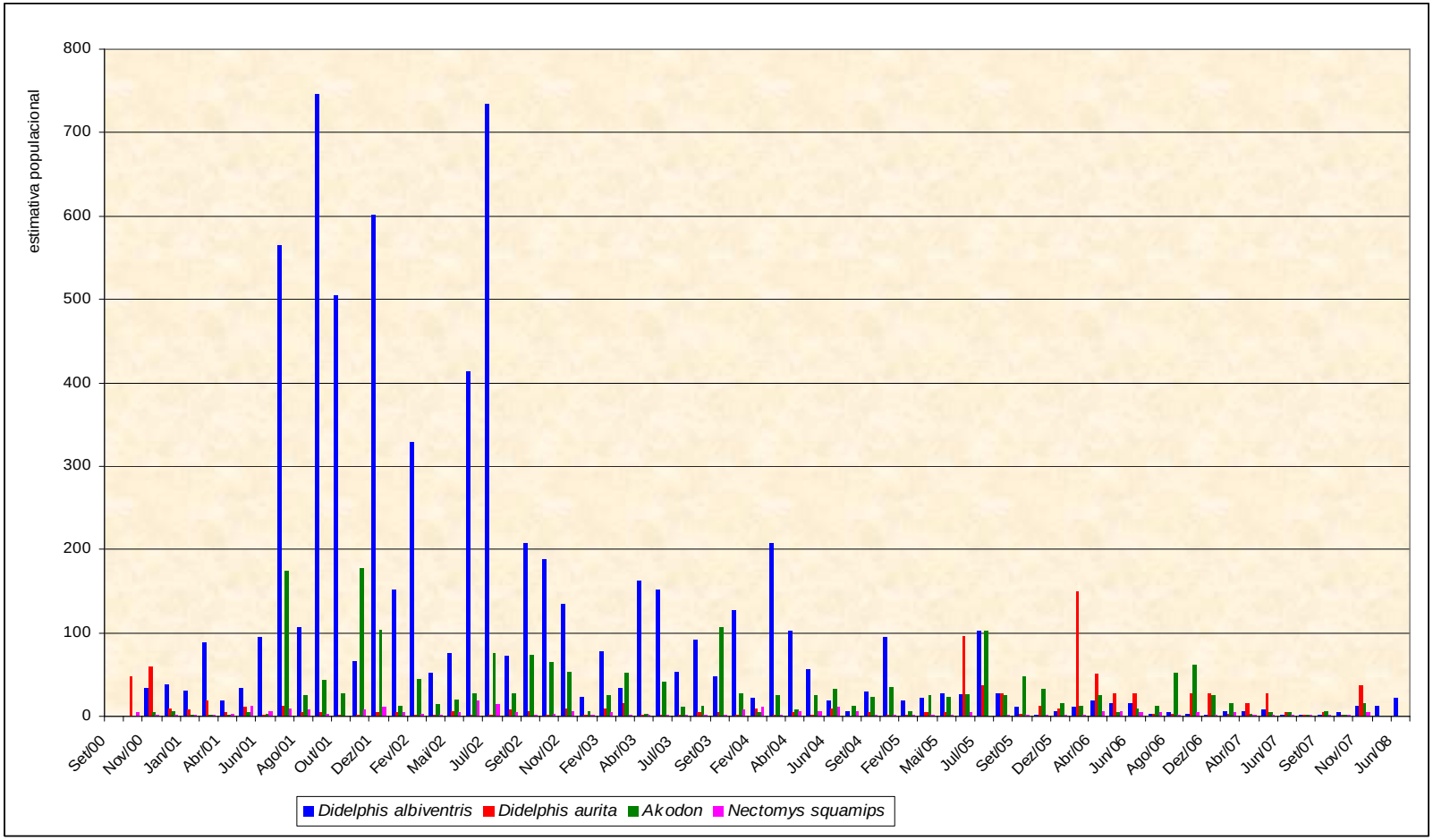


Figura 22 - Variação da precipitação e da temperatura média mensal no período de 2000 a 2009 em Itupeva.

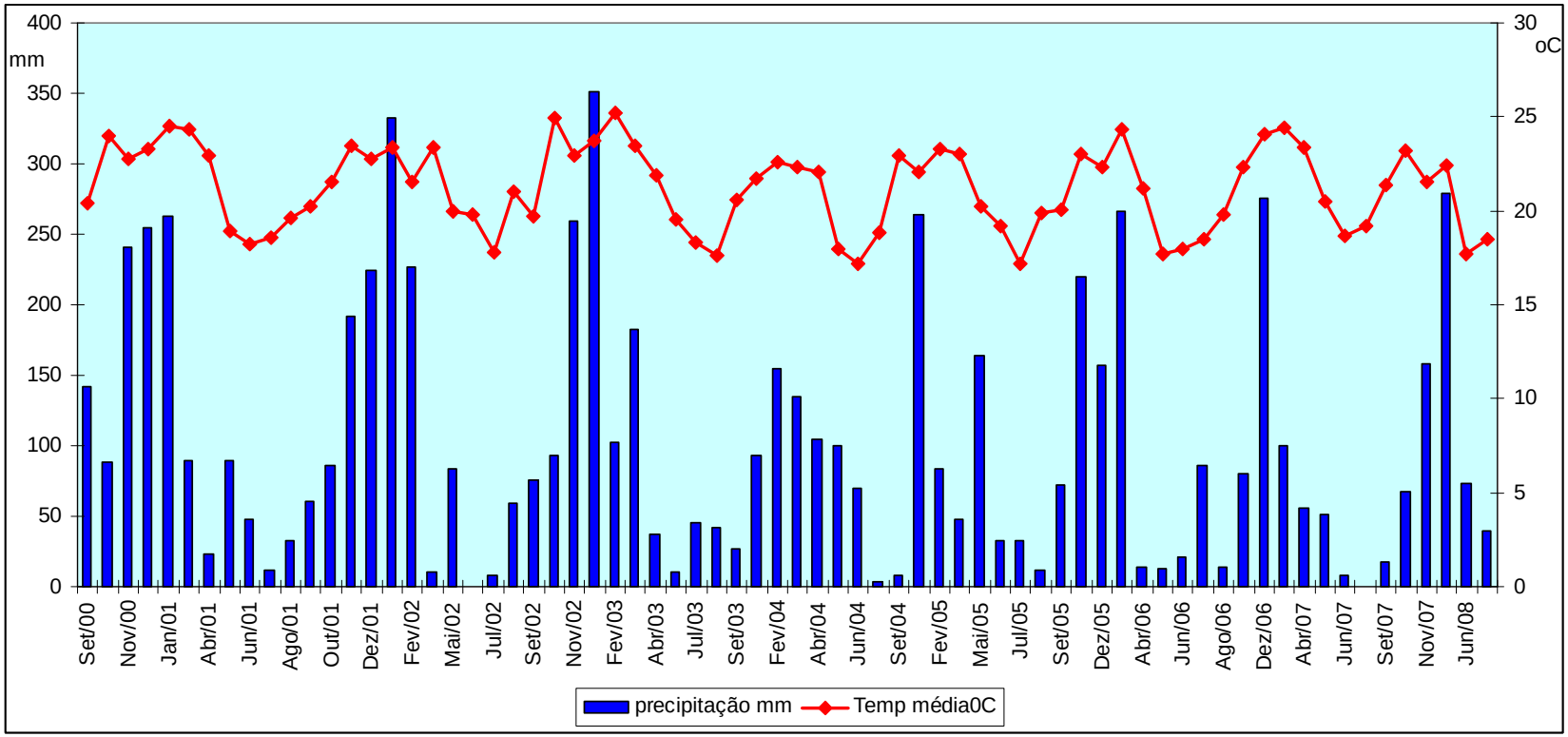


Figura 23- Estimativa populacional de *Didelphis albiventris* em relação a temperatura média mensal e precipitação em Itupeva. Período de 2000 a 2009.

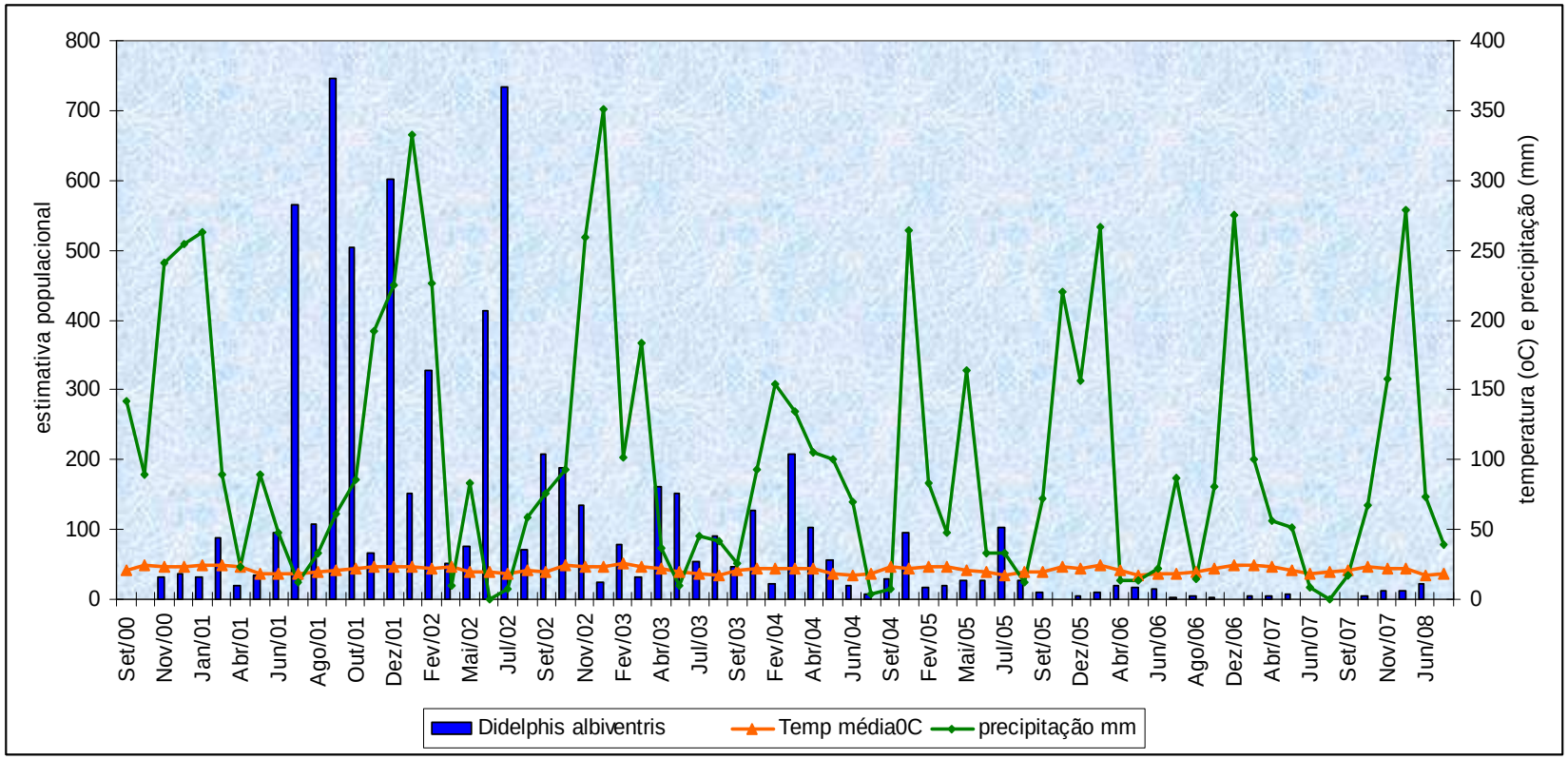


Tabela 14 – Correlações entre temperatura média mensal e precipitação no município de Itupeva.

	Temperatura x precipitação
2000-2002	**$r_{spearman}$ = - 0,5789** **n(18)** **sig 0,002**
2003-2005	**$r_{spearman}$= 0,5395** **n(18)** **sig 0,004**
2006-2009	**$r_{spearman}$ = 0,5926** **n(18)** **sig 0,007**

Fêmeas com filhotes no marsúpio ou jovens de *Didelphis albiventris* foram constantes ao longo do todo o período de estudo. Não foram observadas fêmeas prenhas e nem exemplares jovens de *Nectomys squamipes.*

O encontro de *Akodon sp* prenha e de *Didelphis aurita* jovem ou com filhote no marsúpio ocorreu em menos de 30% das capturas, especialmente nos três últimos anos de investigação. Não se observou correlação entre número de gestações ou infantes com dados de temperatura e precipitação.

Quando se analisa o total de animais capturados, considerando-se as quatro espécies predominantes, apenas entre *Didelphis albiventris* e *Akodon sp* se observa correlação significativa ($r_{spearman}$= 0,2852; sig 0,018; n=69), assim também ocorre quando se analisam as recapturas destas duas espécies ($r_{spearman}$= 0,3729; sig 0,02; n=18). Em relação a *D. aurita* e *D. albiventris*, observa-se correlação negativa nas capturas e recapturas, porém não significativas estatisticamente.

Foram seguidos com carretéis de rastreamento 25 exemplares de *Didelphis aurita* e 20 de *D. albiventris* assim como aconteceu em Ilhabela, observando-se que menos de 10% dos animais seguiram para prováveis tocas. Itupeva é rico em florações rochosas e, os animais geralmente procuram esconderijos sob estas formações, dificultando o acesso. Em todos os locais foram colocadas armadilhas luminosas para flebotomíneos com resultados negativos, o que pode sugerir que estes locais não sejam os verdadeiros abrigos ou ninhos. As distâncias percorridas não superaram os 100m.

Em Itupeva, também se verificou que animais capturados em uma trilha não foram recapturados em outra trilha, distantes 200m entre si, como foi no caso do Bairro Paineiras.

5.2 – FLEBOTOMÍNEOS

As coletas de flebotomíneos em Ilhabela e em Itupeva foram pouco rentáveis (tabelas 17 e 18); tentamos utilizar métodos diversos como armadilha de Shannon, aspiradores elétricos com cabo longo para coletas em tocas, papéis embebidos com vaselina líquida, armadilhas Disney e armadilhas luminosas tipo Falcão modificado, nas poucas coletas com resultados positivos, o número de flebotomíneos sempre foi muito reduzido. As coletas foram realizadas nos mesmos locais das capturas de animais silvestres, pois o objetivo era avaliar a dinâmica de circulação de *Leishmania* associada à presença de possíveis vetores e reservatórios silvestres. No total, 1.779 indivíduos, distribuídos em 14 espécies, foram capturados. *Ny. intermedia* (79,45%) na região do litoral norte e *Ny. neivai* (33,06%) na região do planalto foram as espécies predominantes.

Tabela 15 -Flebotomíneos coletados nos municípios de Ilhabela e Itupeva, Estado de São Paulo, Brasil. Período de 2000 a 2009

	Ilhabela		**Itupeva**		**total**	
	número	%	número	%	número	%
Nyssomyia intermedia	928	79,45	0	0,00	928	52,16
Nyssomyia neivai	0	0,00	202	33,06	202	11,35
Nyssomyia whitmani	0	0,00	147	24,06	147	8,26
Migonemyia migonei	105	8,99	33	5,40	138	7,76
Lutzomyia longipalpis	0	0,00	126	20,62	126	7,08
Pintomyia fischeri	27	2,31	60	9,82	87	4,89
Evandromyia edwardsi	42	3,60	19	3,11	61	3,43
Expapilata firmatoi	27	2,31	1	0,16	28	1,57
Pintomyia pessoai	0	0,00	23	3,76	23	1,29
Psathyromyia shannoni	17	1,45	0	0,00	17	0,96
Brumptomyia nitzulescui	11	0,94	0	0,00	11	0,62
Brumptomyia cunhai	7	0,60	0	0,00	7	0,4
Pintomyia monticola	3	0,26	0	0,00	3	0,17
Psychodopygus ayrozai	1	0,09	0	0,00	1	0,06
Total	**1168**	**100,00**	**611**	**100,00**	**1779**	**100,00**

5.2.1 – Ilhabela

Tabela 16– Flebotomíneos coletados em Ilhabela, no período de 2000 a 2009, segundo espécie e local de coleta.

Espécie/Bairro	galinheiro		mata		total	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	N	%
Bairro Cocaia						
Pi. monticola	...	...	-	3	3	0,73
Br. cunhai	...	...	7	-	7	1,72
Br. nitzulescui	...	...	7	-	7	1,72
Pi. fischeri	...	...	6	8	14	3,42
Pa. shannoni	...	...	-	16	16	3,91
Ex. firmatoi	...	...	4	16	20	4,89
Ev. edwardsi	...	...	-	21	21	5,13
Mg. migonei	...	...	21	39	60	14,67
Ny. intermedia	...	...	127	134	261	63,81
Sub total	...	...	**172**	**237**	**409**	**100**
Bairro Bixiga						
Ps. ayrozai	-	-	-	1	1	0,13
Pa. shannoni	-	-	-	1	1	0,13
Br. nitzulescui	1	-	3	-	4	0,53
Ex. firmatoi	-	-	3	4	7	0,92
Pi. fischeri	-	-	5	8	13	1,71
Ev. edwardsi	-	6	-	15	21	2,77
Mg. migonei	9	13	9	14	45	5,93
Ny. intermedia	89	132	236	210	667	87,88
Sub total	**99**	**151**	**256**	**253**	**759**	**100**
Total	**99**	**151**	**428**	**490**	**1168**	

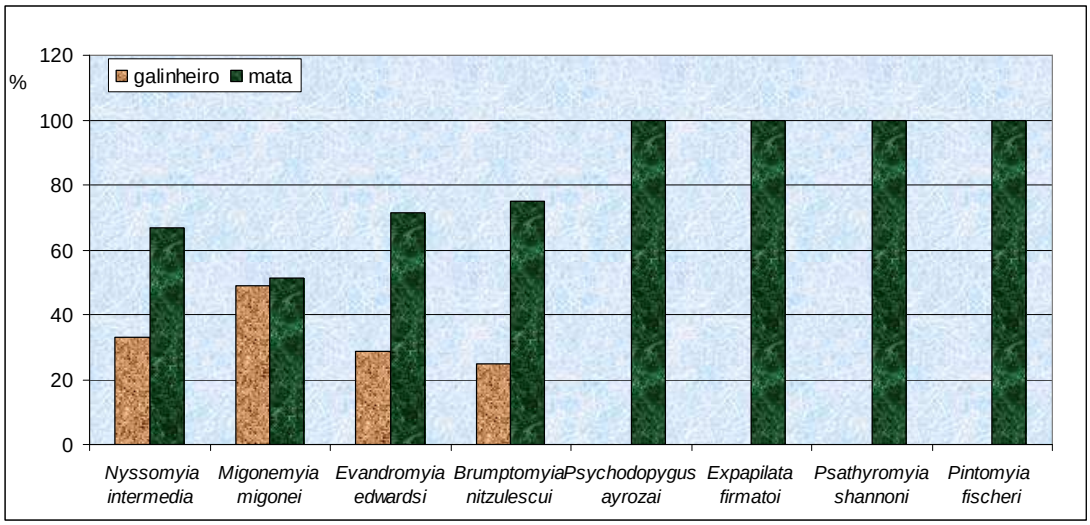
Tabela 17 – Esforço de captura de flebotomíneos, segundo local de captura em Ilhabela. Período de 2000 a 2009.

ILHABELA	Bairro Cocaia (mata)	Bairro Bixiga (galinheiro)	Bairro Bixiga (mata)
flebotomíneos	409	250	509
Esforço de captura	0,08*	0,07*	0,14*
Meses trabalhados	83	60	60

*indivíduo/hora/mês

O total obtido foi de 1.168 (527 machos e 641 fêmeas) flebotomíneos distribuídos em 10 espécies. *Ny. intermedia* predominou (79,45%), seja em ambiente de mata (77,0%) seja no galinheiro (88,49%), a razão sexual ♂:♀ apresentada por esta espécie foi 1,0:1,05 (452♂: 476♀; χ^2= 0,64; g.l.=1. p> 0,05). A segunda espécie foi *Mg. migonei* (8,99%) sendo 39♂ e 66♀ (1,0:1; χ^2= 6,94; g.l.=1; p<0,05). No galinheiro, *Ny. intermedia* apresentou maior abundância (88,4%) e *Mg. migonei*, 8,8% (Tabela 16).

Figura 24 – Freqüência das espécies de flebotomíneos, segundo local de coleta, mata ou galinheiro; Ilhabela, 2000 a 2009.



5.2.2 - Itupeva

Foram utilizadas as mesmas ferramentas de coleta utilizadas em Ilhabela, mas semelhante ao que aconteceu naquele município, as coletas em Itupeva foram pouco rendosas, conforme se observa na tabela 18.

Tabela 18 – Esforço de captura de flebotomíneos, segundo local de captura em Itupeva. Período de 2000 a 2009.

ITUPEVA	Bairro Guacuri (galinheiro)	Bairro Paineiras (mata)	Bairro Monte Serrat (galinheiro)
Flebotomíneos	4	33	574
Esforço de captura	0,001*	0,008*	0,15*
Meses trabalhados	66	68	66

* indivíduos/hora/mês

O número total de insetos coletados foi de 611 (222 ♂ 389♀), *Ny. neivai* predominou (33,06%) sendo 63 machos e 139 fêmeas, numa razão sexual ♂:♀ 1:2,21. *Ny. whitmani* e *Lu longipalpis* compareceram com 25,86% e 20,62% respectivamente. *Pi. fischeri* compareceu com 9,82% (Tabela 19).

Tabela 19– Flebotomíneos coletados em Itupeva, no período de 2000 a 2009, segundo espécie e local de coleta.

Espécie/Bairro	**galinheiro**		**mata**		**Total**	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	N	%
Bairro Guacuri						
Pi. fischeri	0	1	...	...	1	25,00
Mg. migonei	2	0	...	...	2	50,00
Ny. whitmani	1	0	...	...	1	25,00
Sub total	**3**	**1**	...	...	**4**	**100,00**
Bairro Monte Serrat						
Ex. firmatoi	0	1	...	...	1	0,17
Ny. neivai	57	131	...	...	188	32,75
Pi. fischeri	23	34	...	...	57	9,93
Mg. migonei	4	16	...	...	20	3,48
Ny. whitmani	62	84	...	...	146	25,44
Ev. edwardsi	2	12	...	...	14	2,44
Pi. pessoai	13	10	...	...	23	4,01
Lu. longipalpis	49	76	...	...	125	21,78
Sub total	**210**	**364**	...	...	**574**	**100**
Bairro Paineiras						
Ny. neivai	…	…	6	8	14	42,42
Ny. whitmani	…	…	3	8	11	33,33
Lu. longipalpis	…	…	0	1	1	3,03
Pi. fischeri	…	…	0	2	2	6,06
Ev. edwardsi	…	…	0	5	5	15,15
Sub total	…	…			**33**	**99,99**
Total	**213**	**365**	**9**	**24**	**611**	

5.3 - PESQUISA DE INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania* spp EM MAMÍFEROS

A partir do registro das informações geográficas nas diferentes áreas trabalhadas foi realizado o mapeamento espacial relacionando locais de captura, de abrigo dos hospedeiros não humanos desses protozoários. Identificando-se um provável padrão de agregação espacial (foco).

Nas Figuras 25 e 26, observam-se as áreas investigadas e com animais com infecção por *Leishmania* spp., em Ilhabela e Itupeva.

Figura 25 - Mapa do município de Ilhabela com amplificação das duas regiões estudadas (1– Bairro Bixiga e 2 – Bairro Cocaia). As cruzes vermelhas representam achados de animais infectados por *Leishmania* spp

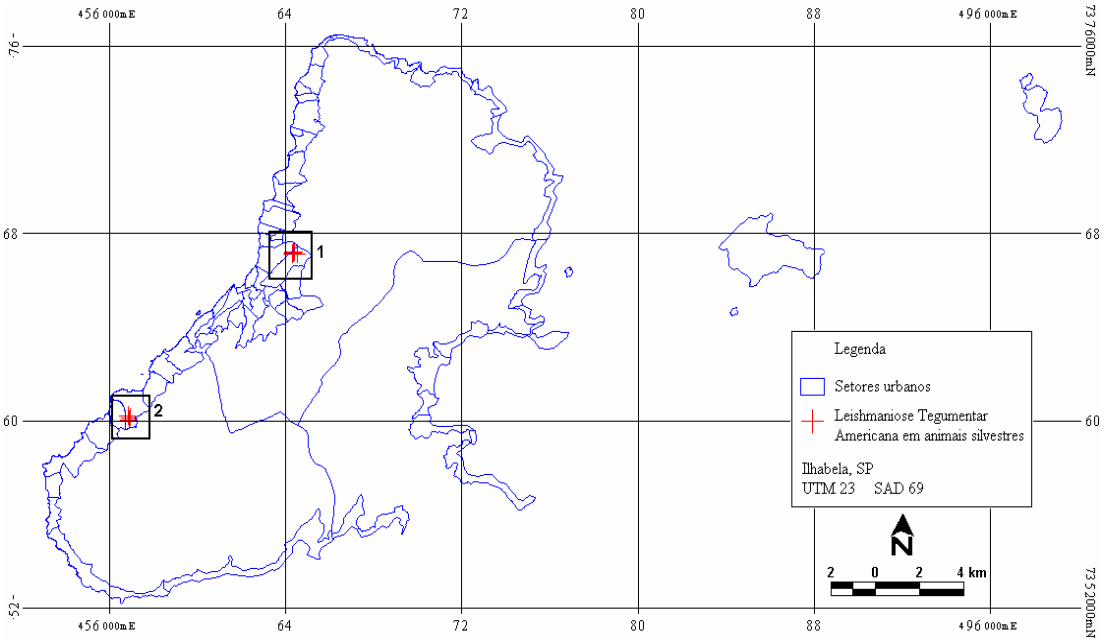
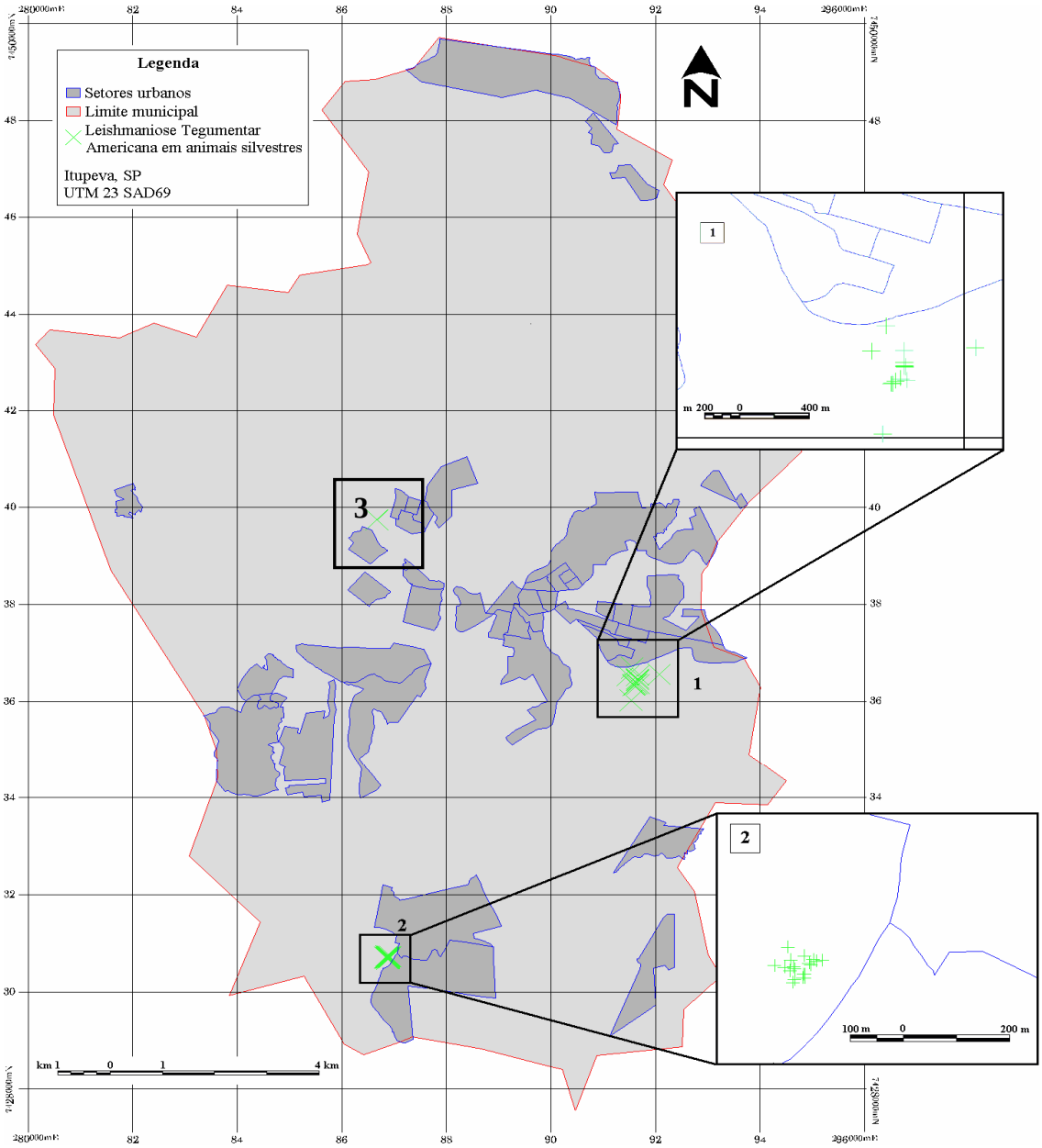


Figura 26 - Mapa do município de Itupeva com ampliação das três regiões: 1 – Bairro Paineiras, 2- Bairro Guacuri e 3 –Bairro Monte Serrat com a representação (cruzes em verde) das infecções por *Leishmania* spp. encontradas em animais silvestres



Na tabela 20 apresenta-se um resumo dos casos confirmados e notificados de LTA no Estado de São Paulo e nos municípios investigados, não houve correlação entre os casos notificados e os animais infectados encontrados nos municípios estudados.

Tabela 20 – Casos humanos confirmados e notificados de LTA no Estado de São Paulo e nos municípios de Ilhabela e Itupeva, no período de 2000 a 2009.

	São Paulo	Ilhabela	Itupeva
2000	170	1	0
2001	700	6	1
2002	874	1	1
2003	1067	12	2
2004	674	37	5
2005	505	12	0
2006	458	13	0
2007	416	10	1
2008	404	0	0
2009	277	6	0
Total	**5545**	**98**	**10**

Fonte: MS/SVS/SINAN, 2010

Dos 2.714 animais examinados, 455 (16,76%) foram considerados com evidências de infecção natural por *Leishmania,* destes 60,66% eram roedores e 39,34% marsupiais, *Proechimys iheringi* foi responsável por 50,11% de todos os animais silvestres naturalmente infectados.

Tabela 21 – Quadro sinóptico dos casos humanos notificados em São Paulo, em Ilhabela e dos animais com infecção, segundo períodos do estudo

	Casos humanos notificados*		Animais silvestres c/ infecção por *Leishmania* spp
Período	São Paulo	Ilhabela	
2000-2002	1.744	8	232
2003-2005	2.246	61	87
2006-2009	1.555	29	147

*Fonte: MS/SVS/SINAN, 2010

Tabela 22 – Quadro sinóptico dos casos humanos notificados em São Paulo, em Itupeva e dos animais com infecção, segundo períodos do estudo

	Casos humanos notiifcados*		Animais silvestres c/ infecção por *Leishmania* spp
Período	São Paulo	Itupeva	
2000-2002	1.744	2	30
2003-2005	2.246	7	50
2006-2009	1.555	1	9

*Fonte: MS/SVS/SINAN, 2010

Tabela 23 – Quadro sinóptico dos achados de animais infectados com *Leishmania* em Ilhabela no período de 2000 a 2009.

Mamíferos	Total capturado	lesão sem isolamento	Isolamento positivo	*Leishmania sp*	*Leishmania braziliensis*	*Leishmania amazonensis*
Proechimys iheringi	896	196	23	3	2	4
Philander opossum	756	112	5	1	0	0
Didelphis aurita	141	15	0	0	0	0
Sciurus ingrami	10	0	0	0	0	0
Oxymycterus incanus	44	2	1	0	0	0
Cavia aperea	9	0	0	0	0	0
Gracilinanus agilis	5	1	0	0	0	0
Echimys thomasi	7	0	0	0	0	0
Oryzomys sp	14	0	0	0	0	0
Teguxim tupinambis	1	0	0	0	0	0
Olygoryzomys sp	2	0	0	0	0	0
Total	**1885**	**326**	**29**	**4**	**2**	**4**

Tabela 24 - Quadro sinóptico dos achados de animais infectados com *Leishmania* em Itupeva no período de 2000 a 2009.

	Animais capturados	**lesão s/ isolamento**	**hamster positivo**	***Leishmania braziliensis***	***Leishmania i. chagasi***	***Leishmania spp***
Didelphis albiventris	379	20	5	1	2	2
Didelphis aurita	119	11	2	0	0	0
Akodon sp	263	26	3	0	1	4
Nectomys squamipes	47	8	0	1	0	0
Oxymycterus sp	9	2	0	0	0	0
Dasypus novemcinctus	2	0	0	0	0	0
Callithrix sp	2	0	0	0	0	0
Lutreolina crassicaudata	2	1	0	1	0	0
Teguxim tupinambis	2	0	0	0	0	0
Rattus rattus	1	0	0	0	0	0
Cerdocyon thous	1	0	0	0	0	0
Galictis vittatis	1	0	0	0	0	0
Oligoryzomys nigripes	1	0	0	0	0	0
TOTAL	**829**	**68**	**10**	**3**	**3**	**6**

Em Ilhabela observa-se que no período de abril a agosto, ocorre o pico de registro de animais silvestres com quadro de infecção evidente (Figura 27) e que em Itupeva este período se estende até setembro (Figura 28).

Figura 27- Número de animais com sinais de infecção segundo mês de captura em Ilhabela

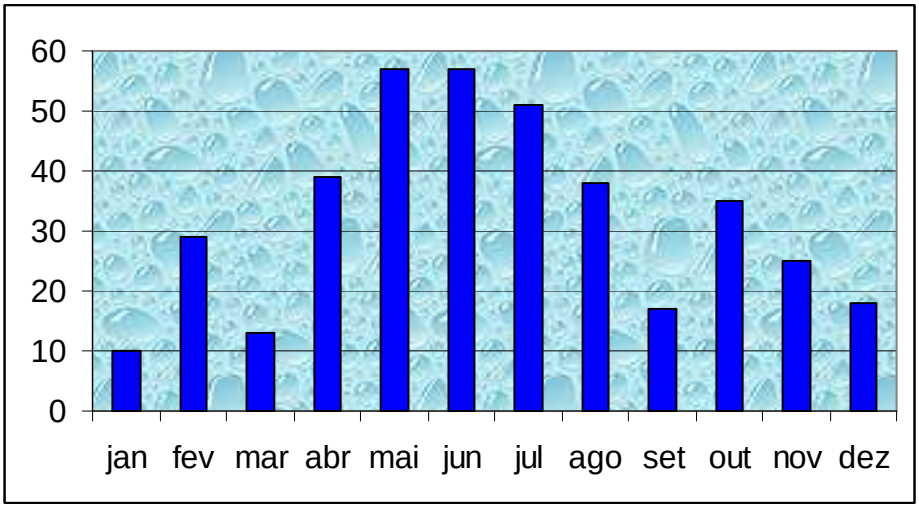
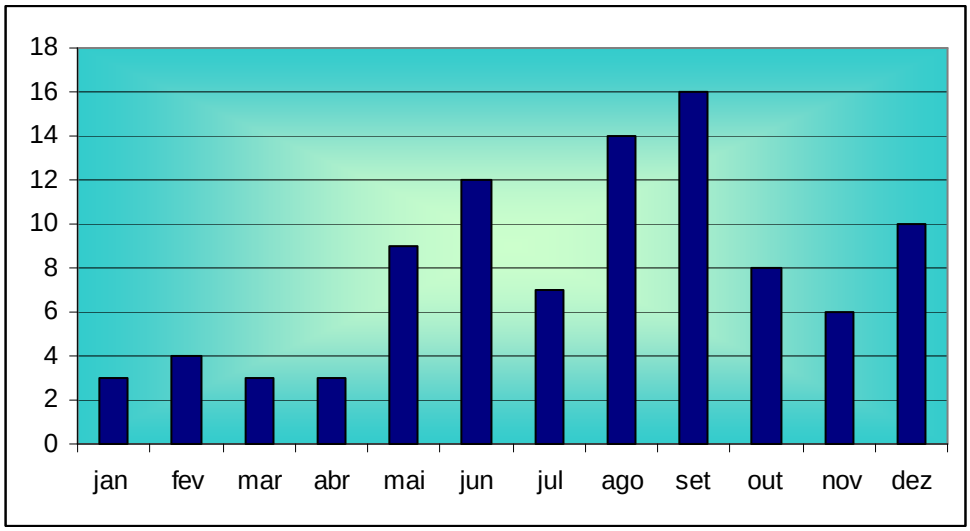


Figura 28 - Número de animais com sinais de infecção segundo mês de captura em Itupeva.

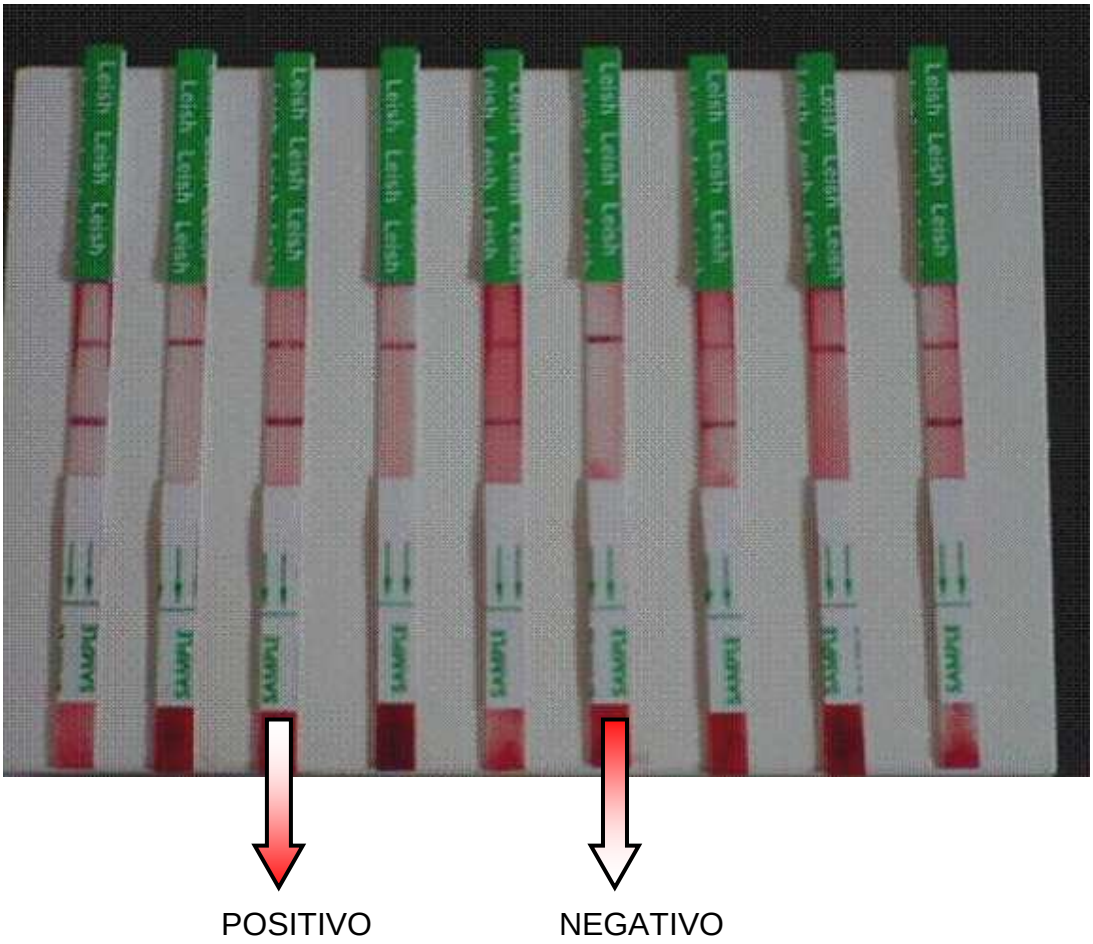


Na região de Itupeva, em 313 animais foi aplicado o teste rápido **rK39 dipstick test** em sangue total, destes, 64 (20,45%) apresentaram resultado “fracamente positivo” ou seja a linha teste onde se encontra o antígeno rK39 mostrou coloração mais fraca (Figura 29).

Para o teste rápido “rK39 dipstick” foi encontrada sensibilidade ao redor de 90%, qualquer que tenha sido a amostra examinada (sangue total, soro sangüíneo ou eluato de sangue em papel de filtro) (TOLEZANO ET AL. 2004).

Os animais que tiveram resultados de PCR reagentes para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania* sp, foram os mesmos que apresentaram reação fracamente positiva no teste rápido, conforme se observa na Tabela 25. No bairro Guacuri observaram-se amostras positivas para *L. i. chagasi* de *Akodon* e *D. albiventris; Akodon* sp e um *D. albiventris* com *Leishmania* sp, e um *D. albiventris* com *L.(V.) braziliensis.* No bairro Paineiras foram isolados *Leishmania (V.) braziliensis* de *Nectomys squamipes* e por fim, um *Didelphis albiventris* capturado no peridomicílio do bairro Monte Serrat com *Leishmania* sp.

Figura 29 - Teste rápido com antígeno rk39.



A infecção natural foi diagnosticada pelo Ensaio Imunocromatográfico rápido para detecção qualitativa de anticorpos anti-*L. (L) i. chagasi* rK dipstick test, por exames anatomopatológicos, imunohistoquímicos, pela inoculação em hamsters e PCR de fragmento de baço. Todos os hamsters apresentaram esplenomegalia e, pelo menos um *Akodon* sp apresentou ao exame anatomopatológico a presença de estruturas arredondadas agrupadas em macrófago portal e, ao exame imunohistoquímico para *Leishmania (V.) braziliensis* (policlonal) o resultado não foi conclusivo.

Tabela 25 – Relação de animais silvestres com teste rápido rk39 positivos, segundo espécie e local de captura do município de Itupeva, SP.

	Guacuri	Paineiras	Monte Serrat
Akodon sp	21	6	0
Didelphis albiventris	7	10	4
Didelphis aurita	5	3	0
Nectomys squamipes	0	7	0
Oxymicterus quaestor	0	1	0
Total	**33**	**27**	**4**

Em Ilhabela, utilizou-se o teste rápido para diagnóstico de leishmaniose visceral, **DPP™Leishmania Test** produzido por Biomanguinhos em 104 animais silvestres, dos quais 6 (5,71%) *Proechimys iheringi* mostraram alguma reatividade, todos do bairro Cocaia cujas capturas ocorreram em interior de mata. Não foi possível afirmar se estes estavam ou não infectados com *Leishmania i. chagasi.*

Em relação aos animais domésticos, durante o período deste estudo, foram examinados 155 cães, sendo 76 no Centro de Controle de Zoonoses de Itupeva, 73 cães em inquérito domiciliar no Bairro Monte Serrat e 6 cães no Bairro Guacuri, com sinais e sintomas de leishmaniose tegumentar (lesões no focinho e bolsa escrotal), apenas estes apresentaram cultura e PCR positivo para *Leishmania braziliensis.*

Em relação aos flebotomíneos dissecados, tanto de Ilhabela quanto de Itupeva, não se observou qualquer fêmea naturalmente infectada.

6 - DISCUSSÃO

6.1 - ANIMAIS SILVESTRES

O desenvolvimento desta investigação permitiu o conhecimento não só de aspectos da enzootia das leishmanioses, mas, também da biologia de pequenos mamíferos das regiões estudadas.

Em Ilhabela, foram capturados 902 (47,85%) marsupiais de três espécies e 982 (52,09%) roedores de 7 espécies; tendo *Proechimys iheringi* predominado significativamente em relação a *Philander opossum* (r_s=0,5384, n=82, sig 0,000) e em relação a *D. aurita* (r_s=0,2726, n=82, sig 0,000) entre as espécies mais prevalentes. Em Itupeva, 500 (60,32%) marsupiais de 3 diferentes espécies e 323 (38,96%) roedores de 5 espécies diferentes além de outros 8 exemplares de 4 ordens diversas. Embora o número de indivíduos tenha sido superior ao número de roedores, estes compareceram com maior número de espécies diferentes. Estes dados corroboram outros estudos com animais de pequeno porte em florestas tropicais e Cerrado (LESSA et al., 1999; LYRA JORGE et al., 2001; GRAIPEL et al., 2006; MILANO, 2007; RODRIGUES, 2007).

A recaptura sistemática e o longo tempo de permanência nos mesmos locais de alguns espécimes indicam, de maneira inequívoca, a existência de territórios bem definidos, principalmente para *Philander opossum* e *Proechimys iheringi*.

Em Ilhabela, *Proechimys Iheringi* e *Philander opossum* foram espécies que durante todo o período da pesquisa foram recapturadas com freqüência, fato não observado em *Didelphis aurita*, esta peculiaridade pode ser entendida como um processo de adaptação de uma espécie que, ainda não tem território definido, por causa de sua recente introdução em Ilhabela. Ao início das investigações neste município, em 1997, procuramos a Administração do Parque Estadual de Ilhabela e consultamos a lista de

animais existentes na ilha, e verificamos a ausência de *Didelphis,* o que reforça a idéia de recente introdução.

A não utilização de armadilhas em extratos diferentes do solo pode ter interferido nos resultados concernentes à abundância de marsupiais, reconhecidos por seus hábitos arborícolas, subestimando sua amostra, como aconteceu no estudo de LYRA JORGE (2001).

O período de maior abundância e riqueza de espécies, entre maio e setembro, coincide com outros estudos de ecologia de pequenos mamíferos em regiões neotropicais e no cerrado brasileiro. (LESSA et al., 1999, GRAIPEL et al., 2006; MILANO, 2007; SANTOS-FILHO, 2008). O período entre o final do verão e começo do outono caracteriza-se pelo período de frutificação e desprendimento de folhas das árvores, esta época de grande oferta de alimentos coincide com o período de reprodução de roedores e marsupiais o que pode explicar o incremento no tamanho da população de pequenos mamíferos entre maio e setembro (FONSECA e KIERULFF, 1989; LEE e COCKBURN, 1985, citados por LESSA (1989) e MOZERLE (2008).

A estação reprodutiva sazonal e movimentos de imigração e dispersão são as mais importantes causas bióticas diretamente relacionadas às flutuações na densidade da população são: (MONTEIRO-FILHO e CÁCERES, 2006).

A menor quantidade de animais capturados no período das chuvas pode ter ocorrido pelo fato de que as armadilhas iscadas com frutas não foram tão atrativas em virtude da maior disponibilidade de alimentos no ambiente nesta época do ano. AMARAL (2008) cita comentários de outros autores quanto ao fato de que o aumento populacional dos marsupiais no período de secas decorreria do aumento no número de animais capturados atraídos pelas iscas, em função da escassez de alimentos nesta época ou se constituiria em aumento de fato do tamanho populacional.

Em Santa Catarina, GRAIPEL et al. (2006) registrou correlação negativa para *D. aurita* em relação à temperatura, semelhante ao que observamos em Itupeva com *D. albiventris.* A literatura consultada não cita correlação entre roedores e variações de temperatura o que pode explicar a maior abundância e riqueza de espécies deste grupo em relação aos marsupiais em todas as épocas do ano. A presença desses roedores durante o ano todo pode explicar o maior índice de positividade (60,66%) (276/455) às infecções por *Leishmania* em relação aos marsupiais que é de 39,34% (179/455).

O sucesso de captura obtido nos nossos resultados, utilizando-se apenas duas noites/mês, variou de 9,73% a 24,83% dependendo do local de captura, superando dados de literatura, 11,5% (GRAIPEL et al., 2006); 1,5% (MOZERLE, 2008); 10,7% (MILANO, 2007) e 3,7% (RODRIGUES, 2007).

Tanto em Ilhabela quanto em Itupeva, as fêmeas das diferentes espécies capturadas foram as que mais tempo permaneceram nos locais investigados e as que mais vezes foram recapturadas, com a razão de sexo sempre foi favorável às fêmeas dos marsupiais, dados estes coincidentes com os achados de vários autores (CÁCERES, 1996; CÁCERES E MONTEIRO-FILHO,1999; CHEREM 1996), citados por Rodrigues (2007), e por Maragona e Marinho-Filho (2009) que sugerem uma maior territorialidade das fêmeas em relação aos machos e uma maior mobilidade destes em relação às fêmeas, ao menos em relação aos marsupiais.

A partir de 2006, embora a média de armadilhas montadas tenha permanecido inalterada, houve sensível queda na densidade populacional dos animais silvestres, principalmente de *P. iheringi,* parte explicada em função de alterações ambientais ocorridas nas localidades investigadas, como construção de moradias.

Após algum tempo, também se nota o desaparecimento dos animais recapturados, o que pode ser explicado em função de mortes, emigração e predação.

Segundo BURT, 1943, “home range” ou área de vida é o espaço ocupado pelo animal nas proximidades de seu “home site” onde circula e exerce atividades normais de busca de alimento, acasalamento, etc. Esta área pode não ser permanente, especialmente para as espécies migratórias, e seu tamanho variável conforme a espécie. Território é uma parte mais restrita da área de vida, é a parte protegida contra ataques de predadores ou de outros de mesma espécie que em alguns casos pode ser a própria “home range” ou, na maioria das vezes, só os arredores do ninho.

Estudos apontam que *Didelphis* podem caminhar por mais de 1km por noite (FERNANDEZ e PIRES, 2006); *Didelphis albiventris* já foi observado a 454m entre um ponto e outro de recaptura (OLIVEIRA et al. 2010); já foi registrado um comportamento de “homing” para *Philander frenatus* que se locomoveu 1.054m em 3 noites para retornar ao fragmento onde fora capturado (PREVEDELLO et al., 2009), tendo, inclusive transposto diferentes biomas. Roedores, como *Akodon* e *Nectomys,* segundo Pires et al. (2002), percorreram distâncias entre 500 e 700m.

Nossos estudos registram que a locomoção das diferentes espécies ficou restrita aos locais em que foram realizadas as capturas, cuja área média foi em torno de 2000m^2 cada, podendo constituir a “home range” das mesmas, o que pode ser constatada pela não recaptura de espécies de uma área em outra próxima, por exemplo, entre Cocaia abaixo e Cocaia acima ou Paineiras abaixo e acima. A distância máxima percorrida observada foi menor que 100m, podendo ser este o raio de seu território, ou os limites do foco natural dos animais e também da circulação de *Leishmania.*

MILANO (2007) menciona em sua tese que: *“Em geral, os estudos realizados em florestas tropicais citam a dificuldade de se obter um sucesso de captura alto e taxas de recaptura que possibilitem estudos de persistência dos indivíduos (Ex. Mares & Ernest, 1995; August, 1983; Voss & Emmons, 1996).”*

Em nove anos deste estudo, foram obtidos resultados surpreendentes: apenas 21,22% dos animais tiveram uma única captura, enquanto 78,78% foram recapturados até 35 vezes, outros com tempo de permanência de, até 79 meses. Além disto, as marcações com furos nas orelhas, raramente causaram transtornos na decodificação, pois persistiram por longo tempo mostrando-se eficazes como formas de identificação em trabalhos de campo com captura-marcação-recaptura. Somente um estudo de longa duração, períodos curtos de coleta e grande número de etapas, permite resultados desta natureza (GURNELL e FLOWERDEW, 1994) citado por MLANO (2007).

A estratégia de se estabelecer “coortes” de animais silvestres foi fundamental, na obtenção de informações e conhecimentos em relação à biologia desses mamíferos em seu ambiente natural, bem como em relação à prevalência e a circulação de *Leishmania* spp.

6.2 – FLEBOTOMÍNEOS

Estudos anteriores já revelavam que: no ambiente florestado de Ilhabela havia o predomínio de *Ny. intermedia, Pa. shannoni, Ev. edwardsi, Pi. monticola* e *Mg. migonei* e em Itupeva, *Ex. firmatoi, Pi. pessoai, Pi. fischeri, Mg. migonei, Martinsmyia alphabetica* e *Ny. whitmani.* Por outro lado, em ambientes modificados pela ação antrópica, em Ilhabela *Ny.intermedia* e *Mg. migonei* predominaram com 92,9% e em Itupeva, *Ny. intermedia s.lat., Pi. fischeri, Mg. migonei, Ny. whitmani* e *Lu longipalpis*. Foram encontradas formas promastigotas em exemplares de *Ny. intermedia* em Ilhabela e em Itupeva em exemplares de *Ny intermedia s.lat.* (TANIGUCHI et al., 1998).

Em Ilhabela, CONDINO (2007), no período de 1993 a 2005, obteve a captura de 356 exemplares de flebotomíneos, com predominância de *Ny. intermedia* (82,87%), seguida por *Mg. migonei* (8,43%) nos ambientes

domiciliares e mata, resultados compatíveis com os obtidos neste estudo e no de TANIGUCHI et al. (1998), confirmando a baixa densidade de flebotomíneos em Ilhabela.

Nyssomyia intermedia pode ser considerada o principal vetor da LTA causada por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis,* considerado o principal agente etiológico na região, pela predominância nas capturas e comportamento antropofílico. (CONDINO et al., 2008)

Este flebotomíneo também pode ser o responsável pela transmissão de *L. (L.) amazonensis* entre os animais silvestres naturalmente infectados de Ilhabela e em paciente infectado em Itupeva (TANIGUCHI et al., 2005), pois já foram constatadas infecções experimentais em *Ny. intermedia* com *L. (L.) amazonensis*. (CONDINO et al., 2008)

No Vale do Ribeira, em margem de mata e em ambientes alterados pela ação antrópica, *Ny. intermedia s. lat.* foi a espécie predominante. Verificou-se acentuada presença de Ps*. ayrozai,* seguido por *Pi. fischeri, Mg. migonei, Ny.. intermedia s.lat.* e *Pi. monticola* no interior de mata (TANIGUCHI, 2000).

Em outros municípios paulistas, também, já haviam sido observadas fortes evidências de que *Ny whitmani*, *Mg. migonei*, *Pi. fischeri* e *Ps. ayrozai* pudessem manter o ciclo silvestre de *Leishmania (V.) braziliensis* e que *Ny. intermedia*, s. lat. seria responsável pelo ciclo peridoméstico envolvendo o homem e animais domésticos. (TOLEZANO et al. 2001b).

As alterações ambientais, redução da cobertura vegetal do Estado de São Paulo ao longo do século XX, resultantes da ação do homem, determinaram diferentes perfis epidemiológicos para a LTA em terras paulistas; estas alterações também afetaram as populações de flebotomíneos, *Ny. intermedia, s. lat.* demonstrou capacidade em ultrapassar ambientes abertos e se adaptar a ambientes modificados. Aliando-se seus

atributos comportamentais e ecológicos que possibilitam a manifestação de seu potencial vetorial, é possível entender a disseminação e atual estágio de perpetuação dos focos de LTA. (TOLEZANO et al., 2001a).

AFONSO et al. (2005), investigando, por técnicas de precipitina, a fonte do sangue ingerido por *Ny. intermedia*, em um foco de LTA em Mesquita, RJ, observaram que além de sangue humano e de animais domésticos, a alimentação em roedores também constituíam uma forte evidência da competência vetorial de *Ny. intermedia*, uma vez que roedores sinantrópicos e silvestres são comprovadamente reservatórios.

Apesar de não ter sido encontrada qualquer fêmea de flebotomíneos naturalmente infectada, ao menos nos municípios de Itupeva e Ilhabela, a predominância de *Ny. neivai* e *Ny intermedia* em mata e ambiente antrópico associada à freqüência de roedores silvestres nas proximidades do ambiente modificado, podem indicar o papel destes vetores e animais na manutenção do ciclo enzoótico das leishmanioses. Reforçando este ponto de vista, destaca-se a captura de um dos exemplares de *Nectomys squamipes* foi capturado perto de um curso d'água a cerca de 30m de distância do domicílio.

Em Itupeva foram coletadas 14 espécies de flebotomíneos, riqueza semelhante à obtida por MAYO et al. (1998), também em Itupeva, porém em outra localidade N*y. neivai, Ny whitmani* e *Lu longipalpis* foram predominantes no galinheiro, totalizando 77,74% dos espécimes. Chama atenção a presença de *Lu.longipalpis* em Itupeva, região sem registro de casos de leishmaniose visceral, porém com registro de ciclo silvestre de *L.(L.) i. chagasi* em gambás e roedores.

As semelhanças dos dados dos flebotomíneos obtidos no presente estudo aos de MAYO et al. (1998) no qual se observou picos de densidade nos meses mais frios e secos (abril a setembro) e à captura de animais silvestres também com picos de densidade neste período, quando ocorre a

introdução de indivíduos suscetíveis e aumento de animais infectados, conforme detectado, pode-se inferir que este é o período mais propício para a transmissão das leishmânias, garantindo sua perpetuação na natureza, ao menos para o Estado de São Paulo.

6.3 - ANIMAIS SILVESTRES E DOMÉSTICOS INFECTADOS

Desde o início dos anos 90, vários casos humanos e caninos de LTA têm sido registrados no litoral norte do Estado de São Paulo, associados à *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Investigações com animais silvestres tiveram início a partir de 1995 em Ilhabela nos locais acima descritos. Um exemplar de *Proechimys iheringi* foi capturado naturalmente infectado, no mesmo local onde dois pacientes e dois cães com LTA tendo como agente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, já haviam sido diagnosticados. O roedor apresentava lesão ativa na base da cauda, de onde se colheu uma biópsia que foi semeada em meios de cultura acelular e inoculada em hamster (*Mesocricetus auratus*). O parasita isolado, posteriormente, foi identificado por técnica molecular como *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (TOLEZANO et al. 1998). Este roedor também já foi relatado como o principal reservatório silvestre de *L (L.) amazonensis* na região amazônica (SHAW, 1988).

TOLEZANO et al. (1988), investigando leishmaniose tegumentar em animais silvestres em Iguape, Vale do Ribeira, isolaram *Leishmania (L.) sp.* por meio de punção cardíaca em *Akodon* sp., posteriormente caracterizada como *L.(L.) amazonensis.*

Animais silvestres dos gêneros *Oryzomys, Neacomys, Nectomys* e *Dasyprocta* da Ordem Rodentia*, e marsupiais* dos gêneros *Marmosa,*

Metachirus, Didelphis e *Philander* são importantes reservatórios, entretanto, *Proechimys* é considerado o principal hospedeiro de *L. (L.) amazonensis* (LAINSON & SHAW, 2005).

Um exemplar de *Oryzomys* sp*,* mantido como sentinela no interior de mata, respondeu ao teste intradérmico com antígeno particulado total ou antígeno íntegro de *Leishmania (Viannia) braziliensis* com uma enduração de 5 mm e, dois hamsters inoculados com vísceras deste roedor, também, responderam ao teste intradérmico com enduração de 4 mm, sugerindo a possibilidade da manutenção, em ambiente silvestre, de ciclo enzoótico de *Leishmania sp.* no município de Eldorado Paulista no Vale do Ribeira, SP (TANIGUCHI, 2000)

O encontro de pequenos mamíferos dos gêneros *Didelphis* e *Proechimys* com infecções por *Leishmania (L.) i. chagasi,* diagnosticados por PCR, já havia sido relatado em Honduras, Bahia e Colômbia (LAINSON e SHAW, 2005), assim como encontramos em Itupeva.

A concomitância de circulação de espécies diferentes de *Leishmania* só foi possível confirmar após o advento da ferramenta sensível e específica como a PCR, os resultados obtidos permitiram a elucidação do diagnóstico diferencial de reservatórios silvestres e domésticos no Estado de São Paulo (GOMES et al., 2005; GOMES et al., 2007; GOMES, 2008).

Em Ilhabela não se realizaram exames em animais domésticos durante o período deste estudo, porém em anos anteriores foi realizado inquérito epidemiológico com a população canina utilizando-se de testes intradérmicos com antígeno particulado total ou antígeno íntegro de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2903. Foi considerado positivo todo teste que resultou em uma enduração igual ou maior que 5mm. Em 99 cães inquiridos verificou-se que 22,4% dos cães da face continental da ilha apresentaram reatividade ao teste. Considerando-se que em uma região nova de ocorrência de leishmaniose humana a

transmissão ainda dependeria da estrutura natural do foco silvestre (GOMES et al, 1990), esses resultados indicaram que o risco de infecção para as populações caninas não difere do risco geral observado para a população humana das mesmas regiões de estudo (TOLEZANO et al., 2001a).

Ao menos para o Litoral Norte do Estado de São Paulo, CONDINO (2007) identifica dois perfis epidemiológicos de ocorrência de leishmaniose tegumentar, um associado à área de transição entre o periurbano e a mata e o outro pela instalação de casas dentro da mata, estando neste caso associado aos ciclos silvestres.

Nas áreas investigadas (Bairros Cocaia e Bixiga) de Ilhabela, nos últimos anos de nossa pesquisa, observamos a intensa alteração ambiental pela ação antrópica. Em particular no Bairro Bixiga, verificou-se intensa derrubada de mata marginal próxima à área de conservação florestal e mangueiras de borracha que se espalhavam em trilhas na floresta em busca de fontes de água para abastecer as moradias nas proximidades.

Foi, ainda, nesse período que a abundância e riqueza de animais silvestres diminuíram em nossas coletas.

As mudanças ambientais não foram muito evidentes no município de Itupeva ao longo desta década de investigação. Na mata onde foram realizadas as capturas no Bairro Guacuri, percebeu-se uma diminuição da quantidade das árvores tornando o ambiente mais aberto.

Nos Bairros Quilombo e Monte Serrat, onde as florações rochosas são mais intensas, também ocorreu a depredação ambiental por causa da extração destas rochas para fins de produção de folhelhos, paralelepípedos etc., alterando as condições primitivas. Essas localidades, onde foram diagnosticados os primeiros casos de leishmaniose tegumentar em 1992, caracterizam-se pela presença de antigas fazendas de café, atualmente desmembradas em pequenas fazendas ou vilas cujos moradores descendem daqueles antigos habitantes. É portanto, é uma região de

colonização antiga, porém considerada área de recente ocorrência de casos humanos e caninos.

Até meados da década de 90, quase não se verificavam movimentos migratórios importantes, os mesmos moradores que conhecemos no início das nossas investigações em Itupeva, em 1992, continuavam até o final dos anos 90 e, segundo os mesmos, seus ascendentes já moravam no local há muito tempo. A partir do início do século 21, novos conjuntos habitacionais foram sendo construídos e habitados por moradores da região e de outras mais distantes, constituindo-se uma nova feição epidemiológica com afluência de novos suscetíveis.

7 – CONCLUSÕES

- O período de maior abundância e de riqueza de espécies de pequenos mamíferos foi entre maio e setembro, e, também é o período em que mais se obteve captura de animais silvestres com sinais de infecção ou com infecção comprovada por diferentes métodos diagnósticos (cultura, inoculação em hamsters e PCR), podendo ser o período com nível de transmissão mais intensa.

- Foram capturados 2.714 animais, dos quais 21,22% tiveram uma única captura, enquanto 78,78% foram recapturados até 35 vezes (Uma fêmea de *Proechimys iheringi* em Ilhabela). Exemplares de *Philander opossum* foram recapturados até 79 meses após a captura no mesmo local em Ilhabela. A recaptura sistemática e o longo tempo de permanência nos mesmos locais de alguns espécimes indicam, de maneira inequívoca, a existência de territórios bem definidos, principalmente para *Philander opossum* e *Proechimys iheringi*.

- A leishmaniose tegumentar americana no município de Itupeva ocorre em áreas de antiga colonização. Caracteriza-se por apresentar casos humanos e caninos em áreas com intensa ação antrópica próximas à mata e com evidências de participação de *Ny. neivai, Ny. whitmani* nos ambientes peri e intradomiciliar. Em interior de mata verificou-se que *Ny. neivai, Ny. whitmani* e *Ev. edwardsi* são as espécies predominantes. Não se observou infecção natural por *Leishmania* sp em qualquer dos exemplares de flebotomíneos examinados. Em relação aos possíveis reservatórios silvestres, identificou-se: *Leishmania (V.) braziliensis* em *D. albiventris, Nectomys squamipes* e *Lutreolina crassicaudata* e

Leishmania sp em *Akodon* sp e *D. albiventris*. No bairro Monte Serrat, foi isolada *Leishmania* sp de um *Didelphis albiventris* capturado no peridomicílio, podendo este marsupial atuar como elo entre o ciclo silvestre e o doméstico.

- A presença de *L.(L.) i. chagasi* em ciclo silvestre (*Akodon* sp e *D. albiventris*) em região sem LVA (humana ou canina) em Itupeva e a presença do vetor *Lu. longipalpis* merecem destaque e cuidado redobrado das autoridades de vigilância e controle das leishmanioses, em particular da forma visceral que grassa em todo o território paulista, inclusive em locais com ausência dessa espécie.

- Estudos epidemiológicos demonstraram que a transmissão humana e canina estaria relacionada a ciclos enzoóticos, ocorrendo no intra e no peridomícilio no Litoral Norte paulista. Em Ilhabela, em uma fazenda próxima à área de proteção ambiental, verificou-se a presença concomitante de *L. (V) braziliensis* e *L.(L) amazonensis* em exemplares de *P iheringi*; também foram encontrados exemplares de *P.iheringi* e *P. opossum* infectados por *Leishmania sp .* capturados em ambiente florestal. Os flebotomíneos mais abundantes foram *Ny. intermedia* e *Mg migonei* , tanto em galinheiros no peridomicílio quanto em interior de mata e presença menos expressiva de *Ev. edwardsi* nos dois ambientes. Casos humanos de LTA ocorreram em áreas muito próximas às matas.

- Apesar da drástica redução da cobertura vegetal, das alterações ambientais impostas pelo homem (construção de moradias nos limites da floresta), ainda assim, se mantém ciclos enzoóticos de *Leishmania*;

- A movimentação dos animais restritas às áreas de vida pode confirmar a característica focal da circulação daqueles parasitas em ciclos enzoóticos. O encontro de infecção natural, com identificação do agente em diferentes espécies de mamíferos silvestres, fala a favor de presença/persistência de ciclos silvestres e reservatórios silvestres

- A partir do registro das informações geográficas nas diferentes áreas trabalhadas foi realizado o mapeamento espacial relacionando locais de captura, de abrigo dos hospedeiros não humanos desses protozoários. Foi possível a identificação de padrão de agregação espacial (foco).

- A utilização de antígeno recombinante rK39 mostrou-se importante ferramenta para a identificação de animais silvestres naturalmente infectados por *L.(L.) i. chagasi* em condições de serviço em campo;

- .A manutenção destes ciclos enzoóticos de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* garantem a perpetuação da transmissão de leishmaniose tegumentar para o homem e animais domésticos.

- O seguimento de uma “coorte” de animais durante um período de quase uma década , inédito em estudos desta natureza, permite avaliações de sua biologia, da dinâmica de circulação destes animais e de seus eventuais parasitas e suas relações com seus vetores.

8 - **REFERÊNCIAS**

Afonso MMS, Gomes AC, Meneses CRV, Range EF. Estudos sobre os hábitos alimentares de *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vetor de leishmaniose cutânea no Brasil. Cad. Saúde Pública, 2005. 21(6):1816-1820.

Almeida Neto E, Proença N. Occurrence of autochthonous tegumentary american leishmaniasis in the city of São Paulo and vicinity. Rev Paul Med. 1960; 56:374-379.

Amaral HHOM. Ecologia de Phthiraptera, Siphonaptera e Acari (Ixodidae) de pequenos roedores e marsupiais do Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro, Brasil. [Tese de Doutorado]:Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2008

Arruda Zamith V. Caso de leishmaniose tegumentar autóctone nos arredores da capital. Rev Paul Med. 1960; 57:68.

Ashford RW and Bettini S. Ecology and epidemiology: old world. In: Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniases in Biology and Medicine, 1v. I. Biology and Epidemiology. Peters W e Killick-Kendrick R, eds. London: Academic Press Inc, 1987, pp 1-120..

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology. 2000. 30(12-13):1269-1281

Bechelli LM, Pimenta WP, Menezes EF, Uthida Tanaka AM. Leishmaniose tegumentar autóctone na região de Ribeirão Preto. Rev Paul Med. 1961; 59:130.

Brandão Fº SP. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana associada à Leishmania (Viannia) braziliensis na Zona da Mata Atlântica do

Estado do Pernambuco, Brasil. [Tese de Doutorado]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: 2001

Brandão F° SP e Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. Parasitology Today, 1994; 10(9): 329-330.

Burt WH. Territoriality and Home Range Concepts as Applied to Mammals. Journal of Mammalogy, 1943. 24(3): 346-352

Camargo-Neves VLF. Características da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1999.

Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Silans LNMP, Desjeux P. Domestic and Peridomestic Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis: Changing Epidemiological Patterns Present New Control Opportunities. 2001. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 96(2): 159-162.

Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Manual de Vigilância Epidemiológica - Leishmaniose Tegumentar Americana. Normas e Instruções. São Paulo: 1995.

Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos Notificados por Regional de Residência e Ano de Notificação – 1993 a 2006. São Paulo, 2007. [acesso em 26/07/07] Disponível em:http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta

Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Leishmaniose Tegumentar Americana. Distribuição dos casos de LTA segundo município de infecção e ano da notificação Estado de São Paulo 1998 - 2010. São Paulo, 2010 [acesso em 05/07/2010] Disponível em:http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta

Chagas, E.; Cunha, A. M.; Castro, G. O.; Ferreira,L. C. & Romanã, C. – 1937 – *Leishmaniose visceralamericana* (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul) – Relatórios dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936 – Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 32: 321-285.

Chagas, E.; Cunha. A. M.; Ferreira, L .C.; Deane, L.; Deane, G.; Guimarães, F. N.; Paumgartten, M. J. & Sá, B. – 1938 – *Leishmaniose visceral americana* (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937) – Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 33-89-229.

CIIAGRO - Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. São Paulo. [base de dados na Internet. CIIAGRO*ONLINE*]. disponível EM http://www.**ciiagro**.sp.gov.br/ [útimo acesso em 08/07/2010]

Condino, MLF. Leishmaniose tegumentar americana no litoral norte paulista, período de 1993 a 2005. [Dissertação Mestrado] 2007. São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi Jr G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania* . Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(5): 663-668.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad. Saúde Pública, 2000, Rio de Janeiro, 16(4):925-950.

Da-Silva LMR; Cunha PR. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas –São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. An Bras Dermatol. 2007; 82(6):515-9.

Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro ACC. Primeiro relato da ocorrência da *Leishmania amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35(Supl III): 220.

ERDAS Inc. **Erdas Imagine version 9.1**. Atlanta – Georgia. 2006. CD-ROM.

Falqueto A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo. [Tese Doutorado]. Rio de Janeiro. Curso de Pós Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. 1995

Fernandez FAS, Pires AS. Perspectivas para a sobrevivência dos marsupiais brasileiros em fragmentos florestais: o que sabemos, e o que ainda precisamos aprender. In: Os marsupiais do Brasil, ecologia e evolução. Cáceres, N.C; Monteiro-Filho, E.L.A Editora: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Ano de lançamento: 2006. Páginas: 364; capítulos: 23; autores: 27.

Forattini OP, Oliveira O. Focus of cutaneous leishmaniasis in an area of south of the State of São Paulo, Brazil. Arch Fac Hig Saúde Públ Univ S Paulo. 1957;11:23-34.

Forattini OP, Pattoli DBG, Serra OP, Rocha e Silva EO, Rabelo EX. Nota sobre a leishmaniose tegumentar no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Públ. 1973; 7:447-452.

Forattini OP, Rabelo EX, Pattoli DBG, Ferreira AO. Nota sobre um foco de leishmaniose na região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Públ. 1972; 6:103-105.

Forattini OP, Rabelo EX, Serra OP, Cotrim MD, Galati EAB, Barata JMS. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Públ. 1976; 10:31-43.

Galati EAB. Morfologia e Taxonomia. In: Rangel EF e Lainson R, organizadores. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 23-175

Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 2004; 23(2): 661-676.

GLCF: *Earth Science Data Interface*. Disponível em <http://glcfapp.umiacs.umd.edu:8080/esdi/index.jsp>, último acesso em 27 de julho de 2009.

Gomes AC, Coutinho SG, Paim GV, Oliveira SMO, Galati EAB, Nunes MP, Capinzaiki NA, Yamamoto YI & Rotter P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8 – Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Méd trop São Paulo. 1990; 32(2):105-115.

Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1 – Estudo experimental da freqüência de flebotomíneos à ecótopos artificiais com referência especial a *Psychodopygus intermedius* . Rev Saúde Públ. 1980;14:540-556.

Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. An Bras Dermatol. 1992; 65:55-60.

Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF, Pereira-Chioccola VL, PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2007 Mar 31;1:234-241.

Gomes AHS, Ferreira IMR, Cunha EA, Araújo MFL, Taniguchi HH, Tolezano JE, Pereira-Chioccola VL. Contribuição da Reação Polimerase em Cadeia (PCR) nas ações de controle das leishmanioses visceral e tegumentar no estado de São Paulo. Anais do XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2005. Florianópolis. P 354.

Gomes, AHS. Contribuição da Reação Polimerase em Cadeia (PCR) nas ações de controle das leishmanioses visceral e tegumentar no estado de São Paulo.[Tese Doutorado]. São Paulo: Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2008

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Soc.Bras Med Trop 2003; 36 (1).

Graipel ME, Cherem JJ, Monteiro-Filho, ELA, Glock, L. Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. Mastozoologia Neotropical 2006; 13(1):31-49.

Hertig M, Fairchild GB e Johnson CM.. Leishmaniasis transmission-reservoir project. Ann Rep. Gorgas Memorial Laboratory 1957: 9-11.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [Acesso em 06/08/2010.] Disponível em http://www.ibge.gov.br/estatística/população/estimativa 2009

IBGE. Mapas. Malha municipal vetorial do Estado de São Paulo. IBGE, 2007a. Disponível em <ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/malhas_digitais/municipio_2007/Malha_Municipal_Digital_2007_2500/Disseminacao_2007/Proj_Geografica/SAD_69/ArcView_Shp/2007/E2500/UF/SP/>, último acesso em 29 de julho de 2009.

IBGE. Mapas. Malha vetorial do setor urbano do Município de Caraguatatuba. IBGE, 2007b. Disponível em <ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/malhas_digitais/setor_urbano_2007/SP/SHAPE_UTM_GEO_S69/Caraguatatuba/>, último acesso em 29 de julho de 2009 .

IBGE. Mapas. Malha vetorial do setor urbano do Município de Ilhabela. IBGE, 2007c. Disponível em

<ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/malhas_digitais/setor_urbano_2007/SP/SHAPE_UTM_GEO_S69/Ilhabela/>, último acesso em 29 de julho de 2009 .

IBGE. Mapas. Malha vetorial do setor urbano do Município de Itupeva. IBGE, 2007d. Disponível em <ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/malhas_digitais/setor_urbano_2007/SP/SHAPE_UTM_GEO_S69/Itupeva/>, último acesso em 29 de julho de 2009 .

Informe Epidemiológico do SUS, ano vii, nº 1, jan-MAR/98MS/FNS/CENEPI/CNDS;Http:/Www.Saúde.Gov.Br/Inform/Indica/Indica4.Htm

JAPI 2010 [homepage na internet] São Paulo 2010 [página em atualização, acesso em 08/09/2010]. Disponívem em: http://www.japi.org.br/mamíferos.html.

Johnson PT, Mcconnell E.e Hertig M. Natural infections of Leptomonad flagellates in Panamaniam *Phlebotomus* sandflies. Experimental Parasitology. 1963; 14:107-122.

Krebs CJ. Ecologia. Análisis experimental de la distribucion y abundancia. Madrid: Ediciones Pirámide, S.A., 1989

Lacerda MM. The brazilian Leishmaniasis Control Program. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89(3): 489-495.

Lainson R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazonian Region of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1985, 18: 47-56.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FJ, Braga RR, Ryan L, Povoa MM, Ishikawara EAY. A *Leishmania* e as Leishmanioses - Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Vol. 1. 1986.

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: Lumsden WHR e Evans DA. The Biology of the Kinetoplastida. 2v. London: Academic Press. 1979.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniases in Biology and Medicine, 1v. I. Biology and Epidemiology. Peters W e Killick-Kendrick R, eds. London: Academic Press Inc, 1987.pp 1-120.

Lainson R., Shaw JJ. New World leishmaniasis,. In: COX FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley & Wilson's Arnold. Microbiology and Microbial Infections, Parasitology, London, Sydney, Auckland; 2005. p.313-349.

Lainson, R. The American Leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans R Soc Trop.Med Hyg 1983, 77: 569-596.

Lessa G, Gonçalves PR, Morais Jr MM, Costa FM, Pereira RF, Paglia AP. Caracterização e monitoramento da fauna de pequenos mamíferos terrestres de um fragmento de mata secundária em Viçosa, Minas Gerais. Bios, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas, 1999, 7(7):41-49.

Lyra Jorge MC, Species richness and the abundance of small mammals in cerrado and forest environments in São Paulo state, Brazil. Naturalia (São Paulo), 2001, v.6, p. 287-302

Maragona M, Marinho-Filho J. História natural e reprodutiva de marsupiais no Pantanal, Mato Grosso, Brasil. Zoologia, 2009; 26(2):220-30

Marcondes, CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomological News. 2007. 118(4): 351-356.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As Leishmanioses Tegumentares. JBM 1992; 63(5/6): 82-104.

Marzochi MCA, Barbosa-Santos EGO, Possas ME. `Processo de preparação de antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev Prod Indust. 1990, 1021-29.

Marzochi MCA, Shubach AO, Marzochi KBF. Leishmaniose Tegumentar Americana In: Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. Cimerman B e Cimerman S eds. 1999 São Paulo , Editora Atheneu

Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Wanderley DMV, Azevedo FM. Flebotomíneos(Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar amercana no município de Itupeva, região sudeste do estado de São Paulo, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1998. 31(4): 339-345.

Mello DA. Parasitic disease in Brazil and the role of wild mammals: an analysis based on leishmaniasis, Chagas disease and Schistosomiasis mansoni. Ci e Cult 1991; 43: 274-278.

Milano MZ. Ecologia da comunidade de pequenos mamíferos da floresta estacional aluvial da RPPN Cabeceira do Prata, região da Serra da Bodoquena, estado do Mato Grosso do Sul.[Dissertação de Mestrado] Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2007

Miles MA. A simple method of tracking mammals and locating triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Amazonian forest. Am.J.Trop.Med.Hyg., 1976; 25: 671-674.

Ministério da Saúde – Vigilância Epidemiológica – Doenças Transmissíveis – Série Histórica de casos de Doenças de Notificação Compulsória por Unidade Federada (1980-2005) Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: http://www.saude.gov.br - Vigilância Epidemiológica de Doenças transmissíveis [acesso em 27/07/07]

Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Organização:

Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília – 2000

Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. Brasília. 2010. [último acesso em 23/06/2010]. Disponível em http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta/bases/ltabr.def

Momem H. II National Meeting on Strategic Research in Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90(6): 775-776.

Monteiro Filho ELA, Cáceres NC. Biologia reprodutiva de fêmeas de marsupiais didelfídeos. In: CÁCERES, N. C.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. (orgs.). **Os marsupiais do Brasil:** biologia, ecologia e evolução. Campo Grande (MS): UFMS, Cap. 8, 2006, 99-110p.

Mozerle HB. Dinâmica populacional de *Oligoryzomys flavescens* (Waterhouse, 1837) na restinga do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, Santa Catarina. [Tese Conclusão de Curso]: Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008

Negrão GN, Ferreira MEMC. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas Américas. Revista Percurso – NEMO. 2009. v. 1, n. 1 , p. 85-103.

Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. **Parasitologia Humana**. 9ª Ed. Ed. Atheneu; 1995.

Oliveira ML, Ferreira RM, Gomes MP, Iha DS, Lorenzon CS, Duarte MB. Estudo populacional de gambás, *Didelphis albiventris* (Mammalia, Didelphidae), em um pequeno fragmento florestal. Mastozoología Neotropical, en prensa, Mendoza, 2010 ©SAREM, 2010 ISSN 0327-9383 Versión on-line ISSN 1666-536 http://www.sarem.org

Parque Estadual de Ilhabela. 2010. (Disponível em: www.ambiente.sp.gov.br/parques acesso em 06/08/2010)

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Trop.1999. 72:251-258.

PCI GEOMATICS. **Geomatica version 9.1**. Ontario – Canadá. 2003. CD-ROM.

Pessôa SB, Barretto MP. Leishmaniose Tegumentar Americana. Min. Ed. Saúde, 1948.

Pignatti MG, Mayo RC, Alves MJCP, Souza SSAI, Macedo F & Pereira RM. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) na região nordeste do estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc. Bras Med tropical, 1995. 28(3):243-247.

Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN. Interação vetor-hospedeiro. In Rangel EF e Lainson, R organizadores. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003, pp 275-289.

Pinto CM. Ocorrência de *Leishmania* sp em animais domésticos e silvestres em Capão Bonito, São Paulo, Brasil. [Tese Doutorado] São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2004

Pires AS, Lira PK, Fernandez FAZ, Schittini GM, Oliveira LC. Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal fragments in Brazil. Biological Conservation, 2002. 108:229-37.

Prefeitura Municipal de Itupeva. Disponível www.itupeva.sp.gov.br [acesso em 31/08/07].

Prevedello JÁ, Delciellos AC, Veira MV. Homing behavior of *Philander frenatus* (Didelphimorphia, Didelphidae) across a fragmented landscape in the Atlantic Forest of Brazil. Mastozool. Neotrop. 2009. 16(2)

Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania intantum* within human peripheral blood mononuclear cells. Acta Trop. 1995. 59:187-196.

Rocha e Silva EO, Capinzaiki NA, Kuratomi CA, Guedes ACM. A leishmaniose tegumentar americana no litoral sul do Estado de São Paulo. Rev Bras de Malariol D Trop. 1980; 32:9-25.

Rodriques RG. Dinâmica populacional de duas espécies simpátricas de marsupiais Didelfídeos num fragmento florestal no sul do Estado do Paraná. [Dissertação Mestrado]: Paraná. Universidade Federal do Paraná. 2007

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 1989. *New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press*

Sampaio LF. O aparecimento, a expansão e o fim da Leishmaniose no Estado de São Paulo. Rev Bras Med. 1951; 8:717-721.

Santos-Filho M, Silva, DJ, Sanaiott TM. Variação sazonal na riqueza e na abundância de pequenos mamíferos, na estrutura da floresta e na disponibilidade de artrópodes em fragmentos florestais no Mato Grosso, Brasil. Biota Neotropica, 2008. Vol. 8 (number 1) p. 115-121.

Serra do Japi/ home. Disponível: www.japi.org.br [acesso 01/09/07].

Shaw JJ. Animal reservoirs of Leishmania in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1988. Suppl I Vol 83: 486-490.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil

caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp, a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite 2002; 9: 43-50.

Simpson MH, Mullins JF e Stone O. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. An autochthonous case in Texas and the Mexican State of Tamaulipas and Nuevo Leon. Arch Dermatol 1968; 97:301-303.

STALLINGS, J.R.. Small mammal inventories in an Eastern Brazilian Park. Bulletin of Florida State Museum, Biological Science 1989. 34 (4): 153-200.

Taniguchi HH. Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no município de Eldorado, Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. período de 1996-1997. [Dissertação Mestrado]. São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 112p. 2000.

Taniguchi, HH, Siqueira ML, Elias CR, Larosa R, Tolezano JE. Epidemiology of american cutaneous leishmanisis (ACL) in the state of São Paulo. Sandflies colonization in endemic environment, natural infection by promastigote and spread of *Lutzomyia longipalpis.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1998. 93(suppl II): 331-332.

Taniguchi HH, Chiocolla VLP, Cunha EA, Gomes AHS, Araújo MFL, Garcia AS et al. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em paciente de região endêmica do Estado de São Paulo, Brasil. Relato de caso. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 408

Tolezano JE. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Perpetuação da LTA no Estado de São Paulo, região endêmica de colonização antiga. [Tese Doutorado]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2000.

Tolezano JE ; Taniguchi HH ; Araújo MFL; Barbosa JAR; Barbosa JER; Bisugo MC; Cunha EA; Larosa R; Elias CR; Rosa OL; Stempliuk W; Uliana

SRB; Floeter-Winter LM; Shaw JJ. Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. Disseminação da LTA em populações caninas em diferentes regiões endêmicas. In: XV Congresso Latino Americano de Parasitologia; XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia e I Congresso Paulista de Parasitologia, 2001a, São Paulo.

Tolezano JE, Macoris SAG, Diniz JMP. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz. 1980; 40: 49-54.

Tolezano JE, Araújo MFL, Balanço, JMF, Valentin AM, Barca ML. *Leishmania* sp, isolated from blood heart of *Akodon* sp (Rodentia, Cricetidae) caught in Iguape city, São Paulo State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988.83:38

Tolezano JE, Taniguchi HH, Barbosa JAR, Barbosa JER, Araújo MFL, Cunha EA, Bisugo MC, Colombo FA, Garcia AS, Larosa R, Elias CR, Larosa O, Garcia ELR, Garcia RA. Avaliação/Validação de Teste Rápido ("Rk39 dipstick test) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) no estado de São Paulo. Boletim do Instituto Adolfo Lutz, 2004. vol. 14(1/2):18-19.

Tolezano JE, Taniguchi HH, Elias CR, Larosa R. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar americana (LTA) no estado de São Paulo. III - Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 2001b. 60(1): 47-51.

Tolezano JE, Taniguchi HH; Araújo MFL, Barbosa JAR, Barbosa JER, Bisugo MC, Cunha EA, Larosa R, Elias CR, Rosa OL, Floeter-Winter LM, Shaw JJ - Ecoepidemiology Of American Cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. Dynamics of circulation of L*eishmania* in natural forested environment in São Sebastião Island (Ilhabela). Rev. Inst Med trop. São Paulo, 2002; 44(suppl. 12):58.

Tolezano JE, Taniguchi HH; Araújo MFL, Cunha EA, Garcia AS, JAR, Barbosa JER, Bisugo MC, Chioccola VLP e Shaw JJ – Ecoepidemiology of leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil: 25 years of studies in na ancient endemic region. In: XI International Congress of Parasitology; 2006 Aug 6-11; Glasgow, Scotland

Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz.1994; 89(3): 427-434.

Tolezano JE. Taniguchi HH, Bisugo MC, Araújo MFL, Cunha EA, Elias CR, Larosa R. Occurrence of natural *Leishmania (Leishmania)* infection in *Proechimys iheringi* in an endemic área of human and canine american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) brazliensis* in Ilhabela, São Paulo, Brazil. 1998. In: Anais da XII Jornada Paulista de Parasitologia da Sociedade Brasileira de Parasitologia, Taubaté, São Paulo. p.9

Tolezano JE; Taniguchi HH; Barbosa JER; Barbosa JAR; Garcia AS; Araújo MFL; Elias CR; Larosa R. Enzootia silvestre por L*eishmania (L) chagasi* no Estado de São Paulo. Utilização de antígeno recombinante rk39 para a identificação de animais naturalmente infectados. In: XX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses, 2004a Oct 22-24; Uberaba, MG. p 25.

Tolezano JE; Taniguchi HH; Barbosa JER; Barbosa JAR; Garcia AS; Araújo MFL; Larosa R; Elias CR; Chioccola VLP e Di Loreto C. Utilização de antígeno recombinante rk39 para identificação de animais silvestres naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em áreas florestadas do Estado de São Paulo. [resumo] Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37 suppl 1:253-254. [apresentado : XL Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2004b, Aracajú, Se, BR].

Vanzeli AC; Kanamura HY – Estudo de fatores socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, São Paulo, Brasil. Rev Panam Infectol. 2007. 9(3):20-25.

WHO - REPORT of the Scientific Working Group on the Leishmaniasis., Geneve, 1981

WHO – Lutte contre les leishmanioses. Rapport d'un Comité OMS d'Experts. Organisation Mondiale de la Santé. *Serie de Rapports Techniques,* 793: 1-176, 1990.

WHO. World Health Organization. 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Trainning inTropical Diseases 2006. Disponível: http://www.who.int/tdr/leishmaniasis.htm [acesso em 31/08/07].

Young DG; Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidade). Mem Am Entomol Inst. 1994; 54:1-881.

Zuckerman A, Lainson R. *Leishmania*. In: Kreier JP. Parasitic Protozoa. 1v. New York: Academic Press; 1977. p. 56-133.

.