



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**

**Tâmara Dias Oliveira Machado**

**OCORRÊNCIA E INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) EM MATAS DE GALERIA E  
UNIDADES DOMICILIARES NO MUNICÍPIO DE PALMAS,  
TOCANTINS, BRASIL**

**Brasília**  
**2017**

**Tâmara Dias Oliveira Machado**

**OCORRÊNCIA E INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) EM MATAS DE GALERIA E  
UNIDADES DOMICILIARES NO MUNICÍPIO DE PALMAS,  
TOCANTINS, BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de doutora em Medicina Tropical.

Área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Andrey José de Andrade



**Brasília  
2017**

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

MT153 Machado, Tâmara Dias Oliveira  
Ocorrência e infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) em matas de galeria e unidades domiciliares no município de Palmas, Tocantins, Brasil / Tâmara Dias Oliveira Machado; orientador Rodrigo Gurgel Gonçalves ; co orientador Andrey José de Andrade. -- Brasília, 2017.  
140 p.

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

1. Nyssomyia whitmani. 2. Lutzomyia longipalpis. 3. Leishmania amazonensis. 4. Leishmania infantum. 5. savana brasileira. I. Gurgel Gonçalves , Rodrigo , orient. II. José de Andrade, Andrey , co-orient. III. Título.

**Tâmara Dias Oliveira Machado**

**OCORRÊNCIA E INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) EM MATAS DE GALERIA E UNIDADES  
DOMICILIARES NO MUNICÍPIO DE PALMAS, TOCANTINS, BRASIL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de doutora em Medicina Tropical.

Data de Aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Ciro Martins Gomes - Membro titular. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

---

Dra. Elisa Neves Vianna - Membro suplente. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

---

Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati - Membro titular externo ao programa. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

---

Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves - Presidente. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

---

Dra. Mariana Machado Hecht - Membro titular. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Dedico a Deus, aos meus pais e ao meu esposo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, ele foi a minha força; às pessoas mais importantes da minha vida, meu Pai, Antônio Otaciano Machado, e a minha amada e inesquecível mãe, Lindenalva Oliveira Machado (*in memoriam*), por me ensinarem tudo o que sou. E ao meu esposo Levi Dias pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador professor Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves da Faculdade de Medicina da UnB por ter aceitado me orientar e ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores. Tenho imensa admiração por seu trabalho, o qual faz com tanto zelo e resignação. Obrigada por seus ensinamentos durante todo o curso que tanto me fizeram crescer e por sua colaboração em todas as etapas do trabalho de campo em Palmas, Tocantins, como também durante a elaboração dessa tese, o que fez a diferença para o sucesso desse trabalho.

Ao meu co-orientador professor Dr. Andrey José de Andrade, professor de parasitologia médica da Faculdade de Medicina da UnB na ocasião das coletas e atualmente professor na Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio durante as etapas do trabalho em Palmas, Tocantins, em campo e no decorrer da escrita dessa tese, por sua habilidade em taxonomia e sistemática de flebotomíneos e até mesmo por conselhos que muito me ajudaram.

Ao professor Dr. Marcos Takashi Obara da Faculdade de Ceilândia da UnB, que também colaborou nos trabalhos de campo em Palmas, Tocantins, e cujo auxílio foi de muita valia.

Aos professores: Dr. Ciro Gomes do Hospital Universitário de Brasília (UnB), Dra. Eunice Galati da Faculdade de Saúde Pública da USP, Dra. Mariana da Faculdade de Medicina da UnB e Dra. Elisa Vianna da Faculdade de Medicina da UnB por terem aceitado participar da defesa desta tese de doutorado.

Ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da UnB por ter me oferecido apoio durante a realização do doutorado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFTO) na pessoa do diretor do Campus de Palmas, professor Me. Octaviano Sidnei Furtado, pela parceria durante a execução do projeto de doutorado e aos meus coordenadores pelo apoio e amizade.

A Tauana de Sousa Ferreira por seu grande auxílio e empenho na preparação e na dissecação dos flebotomíneos, com a posterior montagem das lâminas, na extração do DNA dos flebotomíneos e na realização das PCRs (SSU e ITS) de parte das amostras do período seco e chuvoso, e também por nossa amizade.

A Tamires Emanuele Vital por seu auxílio na realização das PCRs SSU da maioria das amostras do período seco, por sua cordialidade e por nossa amizade.

A Thaís Tâmara Castro Minuzzi-Souza pela sua imensa ajuda na realização das PCRs ITS da maioria das amostras do período seco, pelo envio das amostras positivas obtidas para sequenciamento, por ter analisado o resultado do sequenciamento das mesmas e por nossa amizade.

Às técnicas do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores: Renata Velôzo Timbó - por me auxiliar na preparação, dissecação dos flebotomíneos e montagem das lâminas e Luciana Pereira Freire – pelo auxílio na realização das PCRs (SSU e ITS) de parte das amostras do período seco e chuvoso.

Aos colegas de laboratório Aline Machado Rapello do Nascimento, Douglas de Almeida Rocha e Mariana Neiva Silva, que direta ou indiretamente me auxiliaram no decorrer do meu doutorado.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica do IFTO - campus Palmas, Alcinei de Souza Santos Junior e Nathyla Morgana Cunha Sales por sua imensa ajuda na captura e triagem dos flebotomíneos em Palmas, Tocantins.

Aos colegas da Secretaria Municipal de Saúde (SEMUS): Maria do Socorro Cordeiro de Souza e Ademilton Alves Guimarães, pelo auxílio com os dados de casos humanos e caninos confirmados, respectivamente; e da Secretaria Estadual de Saúde (SESAU): Marcelle Lorrane Silveira Carneiro

Brito pela liberação dos dados de LV e LTA. E aos moradores de Taquaruçu e de Palmas – TO que nos receberam em suas residências sem medir esforços.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potenciais reservatórios ou fontes de infecção de espécies de <i>Leishmania</i> , flebotomíneos vetores e as formas clínicas da LT no Brasil. ....	25
Tabela 2 – Estudos com registro de espécies de flebotomíneos inéditas para o Tocantins.....	38
Tabela 3 - Total de flebotomíneos coletados com HP e Shannon nas duas áreas amostradas, centro e distrito de Taquaruçu, no município de Palmas em julho (mês seco) e novembro (mês chuvoso) de 2014.....	64
Tabela 4 - Flebotomíneos registrados em três ambientes nas duas áreas amostradas, centro e distrito de Taquaruçu, no município de Palmas (TO) em julho (mês seco) de 2014.....	65
Tabela 5 - Flebotomíneos registrados em três ambientes nas duas áreas amostradas, centro e distrito de Taquaruçu, do município de Palmas (TO) em novembro (mês chuvoso) de 2014.....	66
Tabela 6 - Espécimes de flebotomíneos coletados de unidades domiciliares e matas de galeria em Palmas, Tocantins, em julho (mês seco) de 2014 e considerados positivos para infecção com base nos marcadores SSU rDNA e ITS1. ....	72
Tabela 7 - Espécimes de flebotomíneos coletados de unidades domiciliares e matas de galeria em Palmas, Tocantins, Brasil, em novembro (mês chuvoso) de 2014 e considerados positivos para infecção com base nos marcadores SSU rDNA e ITS1. ....	73
Tabela 8 - Tripanossomatídeos identificados por sequenciamento dos produtos amplificados de SSU rDNA detectados em espécimes de flebotomíneos do centro de Palmas (TO) e do distrito de Taquaruçu, Tocantins, em julho (mês seco) e novembro (mês chuvoso) de 2014. ....	75
Tabela 9 - Características do intradomicílio das unidades domiciliares trabalhadas no centro de Palmas, Tocantins, em 2014. ....	77
Tabela 10 - Características gerais do peridomicílio das unidades domiciliares trabalhadas no centro de Palmas, Tocantins, em 2014. ....	78
Tabela 11 - Características dos animais domésticos presentes no peridomicílio de algumas das unidades domiciliares trabalhadas no centro de Palmas, Tocantins, em 2014.....	79
Tabela 12 - Características gerais da circunvizinhança das unidades domiciliares trabalhadas no centro de Palmas, Tocantins, em 2014. ....	80
Tabela 13 - Características do intradomicílio das unidades domiciliares trabalhadas no distrito de Taquaruçu, Tocantins, em 2014. ....	83

Tabela 14 - Características gerais do peridomicílio das unidades domiciliares trabalhadas no distrito de Taquaruçu, Tocantins, em 2014. ....	84
Tabela 15 - Características dos animais domésticos presentes no peridomicílio de algumas das unidades domiciliares trabalhadas no distrito de Taquaruçu, Tocantins, em 2014.....	85
Tabela 16 - Características gerais da circunvizinhança das unidades domiciliares trabalhadas no distrito de Taquaruçu, Tocantins, em 2014.....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O ciclo de vida de <i>Leishmania</i> em um vetor competente.....	29
Figura 2 - Flebotomíneos adultos: fêmea (à esquerda) e macho (à direita).....	30
Figura 3 - Localização do Estado do Tocantins e do município de Palmas (área destacada).....	46
Figura 4 - Macrozoneamento e zonas especiais de interesse ambiental e turístico. ....	47
Figura 5 - Mata de Galeria (A) e Unidade Domiciliar (B) em Palmas. ....	49
Figura 6 - Mata de Galeria (A) e Unidade Domiciliar (B) em Taquaruçu. ....	49
Figura 7 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 01 em Palmas/TO.....	50
Figura 8 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 02 em Palmas/TO.....	51
Figura 9 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 01 em Taquaruçu/TO. ....	51
Figura 10 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 02 em Taquaruçu/TO. ....	52
Figura 11 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 01 em Palmas/TO.....	52
Figura 12 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 02 em Palmas/TO.....	53
Figura 13 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 01 em Taquaruçu/TO. ....	53
Figura 14 - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 02 em Taquaruçu/TO. ....	54
Figura 15 - Tipos de armadilhas HP (à esquerda) e Shannon com isca luminosa (à direita).....	55
Figura 16 - Abundância de flebotomíneos machos e fêmeas em três ambientes da área central de Palmas em julho (seco) e novembro (chuvoso) de 2014. ....	68
Figura 17 - Abundância de flebotomíneos machos e fêmeas em três ambientes de Taquaruçu em julho (seco) e novembro (chuvoso) de 2014. ....	69
Figura 18 - Gel de agarose a 1,3% corado pelo brometo de etídeo, mostrando os produtos amplificados da reação de PCR com alvo na região S4 e S12 do gene SSU rDNA18S de tripanossomatídeos em amostras de fêmeas capturadas no município de Palmas, Tocantins, em julho (2014). ....	74
Figura 19 - Características do peridomicílio de uma unidade domiciliar próximo ao fragmento de mata de galeria 02 em Palmas, Tocantins. ....	81

Figura 20 - Características do peridomicílio de uma unidade domiciliar próxima ao fragmento de mata de galeria 02 em Taquaruçu, Tocantins. ....	87
Figura 21 - Diferenças nas matas de galeria durante os dias secos e chuvosos em Palmas, Tocantins. A: julho (mês seco). B: novembro (mês chuvoso). .....	89

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

®	marca registrada
μL	microlitro
μM	micromolar
∞	indeterminado
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LTA	leishmaniose tegumentar americana
LV	leishmaniose visceral
mL	mililitro
mm	milímetro
MS	Mato Grosso do Sul
ng	nanograma
pb	pares de bases
PBS	Phosphate-buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato)
PCR	reação em cadeia da polimerase
rDNA18S	DNA ribossomal região 18S
SEMARH	Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
SEPLAN	Secretaria do Planejamento do Estado de Tocantins
SSU	Small Subunit (subunidade menor)
™	Trademark (marca registrada)
U	unidade de enzima
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
μL	microlitro
μM	micromolar

## **FINANCIAMENTO**

Este trabalho foi financiado em parte pela Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS (chamamento público nº 20/2013. Estudos e Pesquisas Aplicadas em Vigilância em Saúde). Ministério da Saúde. Brasília - DF.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	As Leishmanioses.....	21
1.1.1	Leishmaniose visceral (LV) .....	22
1.1.2	Leishmaniose tegumentar (LT).....	24
1.2	<i>Leishmania</i> no vetor e no hospedeiro .....	28
1.3	Biologia dos flebotomíneos .....	29
1.4	Distribuição geográfica dos flebotomíneos .....	32
1.5	Alterações antrópicas e aumento do risco de transmissão das leishmanioses por flebotomíneos.....	33
1.6	Infecção natural e uso da PCR para a detecção de tripanossomatídeos em flebotomíneos .....	35
1.7	Leishmaniose visceral (LV) e Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado do Tocantins e em Palmas .....	37
2	JUSTIFICATIVA.....	42
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	Geral .....	44
3.2	Específicos.....	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Áreas de estudo.....	45
4.2	Caracterização dos sítios amostrais .....	48
4.3	Coleta e identificação dos flebotomíneos.....	54
4.4	Extração de DNA de flebotomíneos.....	56
4.5	PCR Cacophany .....	57
4.6	“Nested” SSU rDNA18S PCR .....	58
4.7	PCR dirigida à região espaçadora interna do DNA ribossômico (ITS) 1 de <i>Leishmania</i> .....	59
4.8	Preparação dos produtos da PCR para sequenciamento .....	60
4.9	Sequenciamento e análises das sequências .....	60
4.10	Caracterização ambiental das unidades domiciliares (UDs) do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu, Tocantins .....	61

4.11	Análise dos dados.....	61
5	RESULTADOS.....	63
5.1	Ocorrência de flebotomíneos em matas de galeria e unidades domiciliares no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu no município de Palmas, Tocantins. ....	63
5.2	Ocorrência de <i>Leishmania</i> e de outros tripanossomatídeos em flebotomíneos no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu, Tocantins.....	70
5.3	Caracterização ambiental das unidades domiciliares (UDs) próximas a fragmentos de mata de galeria do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu, Tocantins. ....	76
5.3.1	Palmas .....	76
5.3.2	Taquaruçu .....	82
6	DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
6.1	Ocorrência de flebotomíneos em matas de galeria e unidades domiciliares no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu no município de Palmas, Tocantins. ....	88
6.2	Ocorrência de <i>Leishmania</i> e de outros tripanossomatídeos em flebotomíneos no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu, Tocantins.....	93
6.3	Caracterização ambiental das unidades domiciliares (UDs) próximas a fragmentos de mata de galeria no centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu, Tocantins. ....	96
7	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
	APÊNDICE.....	120
	APÊNDICE A - Formulário de caracterização ambiental .....	120
	ANEXOS .....	125
	ANEXO A - Artigo publicado na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2017.....	125
	ANEXO B – Protocolo de extração .....	140

## RESUMO

O conhecimento das espécies de flebotomíneos e de seus níveis de infecção natural por *Leishmania* é necessário para a identificação do risco de ocorrência das leishmanioses. Considerando o pouco conhecimento da fauna flebotomínica em Palmas, Tocantins, e a inexistência de dados de ocorrência de espécies de *Leishmania* em flebotomíneos nesse município, o presente trabalho objetivou: investigar a fauna flebotomínica em fragmentos de matas de galeria e em unidades domiciliares (UDs) bem como a infecção natural por tripanosomatídeos nas fêmeas de flebotomíneos capturados em dois períodos distintos, seco e chuvoso. Quatro fragmentos de matas de galeria e quatro áreas domiciliares adjacentes foram amostradas utilizando armadilhas luminosas HP e Shannon. Após a identificação, 752 fêmeas foram agrupadas em 154 pools para a extração do DNA. A qualidade do DNA foi verificada por PCR do gene cacophony da região IVS6 de flebotomíneos. A detecção de tripanosomatídeos nas fêmeas de flebotomíneos foi realizada a partir da amplificação da região SSU rDNA e as amostras positivas foram submetidas a PCR ITS-1. A identificação das espécies de tripanosomatídeos foi realizada por sequenciamento. A caracterização ambiental das 40 casas amostradas foi realizada a partir de questionários. Variáveis estruturais do intra, do peridomicílio e da circunvizinhança foram obtidas. Foram capturados 949 (28 spp.) e 578 (22 spp.) espécimes em julho e novembro, respectivamente. *Nyssomyia whitmani* foi a mais abundante (n = 743). Em julho, a maioria dos espécimes foram capturados nas matas de galeria (n = 762, 80%) e em novembro, a maioria dos espécimes foi encontrada nas UD's (n = 551, 95%) com predominância de *Ny. whitmani*. *Lu. longipalpis* foi a mais frequente em áreas domiciliares e *Bi. flaviscutellata* em matas de galeria. A PCR SSU rDNA identificou *L. amazonensis*, *L. infantum* e *Crithidia fasciculata* em *Ny. whitmani*. A PCR SSU rDNA identificou *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* e *Crithidia fasciculata* em *Ny. whitmani*; *L. amazonensis* em *Lu.*

*longipalpis*; *Trypanosoma* sp. e *L. amazonensis* em *Pintomyia christenseni*; *L. amazonensis* em *Psathyromyia hermanlenti* e *Evandromyia walkeri*. Determinadas UDs de Palmas (no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu) apresentaram características que permitem a manutenção da população de flebotomíneos no peridomicílio, tais como a presença de árvores frutíferas, matéria orgânica e animais, como cães e galinhas. As matas de galeria são importantes para manter os flebotomíneos vetores de *Leishmania* em Palmas e as UDs são receptivas à manutenção da população de flebotomíneos no peridomicílio. Dessa forma, recomenda-se uma vigilância mais ativa principalmente nas UDs próximas a matas de galeria.

**Palavras-chave:** *Nyssomyia whitmani*; *Lutzomyia longipalpis*; *Leishmania amazonensis*; *Leishmania infantum*; *Trypanosoma* sp.; *Crithidia fasciculata*; Caracterização ambiental; savana brasileira.

## ABSTRACT

Knowledge on phlebotomine species and levels of natural infection by *Leishmania* are necessary to identify potential areas of risk of leishmaniasis. Given the limited knowledge on phlebotomine fauna in the city of Palmas, State of Tocantins, Brazil and the lack of data on the occurrence of *Leishmania* species in phlebotomines in this municipality, this study aimed to: to investigate the phlebotomine fauna in fragments of gallery forests and in household units (HUs) as well as the natural infection by trypanosomatids in females of sandflies captured in two different periods, dry and rainy. Four fragments of gallery forests and four adjacent HUs were sampled using HP light traps and Shannon traps. After their identification, 752 females were grouped into 154 pools for DNA extraction. The quality of the DNA was determined by PCR of the cacophony gene of the IVS6 region in Phlebotominae. Trypanosomatids were detected in Phlebotominae females through the amplification of the SSU rDNA region, and the positive samples were tested using ITS1-PCR. Trypanosomatids species were identified using sequencing. The environmental status of the 40 houses sampled was characterized using questionnaires. Structural variables within the HUs, around the HUs, and in the surrounding neighborhood were obtained. A total of 949 specimens (28 spp.) and 578 specimens (22 spp.) were captured in July and November, respectively. *Nyssomyia whitmani* was the most frequent species (n=743). In July, the majority of specimens were captured in the gallery forests (n=762; 80%), while in November, most of the specimens were found in the HUs (n=551; 95%). The specimens found were predominantly *Ny. whitmani*. *Lutzomyia longipalpis* was most frequent in domestic areas (84/86), while *Bichromomyia flaviscutellata* in gallery forests. The SSU rDNA PCR identified *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* and *Crithidia fasciculata* in *Ny. whitmani*, as well as *L. amazonensis* in *Lu. longipalpis*; *Trypanosoma* sp. and *L. amazonensis* in *Pintomyia christenseni*; and *L. amazonensis* in

*Psathyromyia hermanlenti* and *Evandromyia walkeri*. Certain HUs in Palmas (some in downtown Palmas and others in the Taquaruçu district) exhibited characteristics that allow the maintaining of Phlebotominae population in the peridomestic environment, such as the presence of fruit trees, organic matter, and animals such as dogs and chickens. The gallery forests are important to maintain the phlebotomine vectors of *Leishmania* in the city and the HUs are receptive to maintain Phlebotomine populations in peridomestic environments. Therefore, more active surveillance is recommended, particularly in the HUs close to gallery forests.

**Keywords:** *Nyssomyia whitmani*; *Lutzomyia longipalpis*; *Leishmania amazonensis*; *Leishmania infantum*; *Trypanosoma* sp.; *Crithidia fasciculata*; Environmental characterization; Brazilian savanna.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são doenças resultantes da infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Cerca de 20 espécies e subespécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem, para as quais diversas espécies de mamíferos funcionam como hospedeiras (Maroli et al., 2013). Esses protozoários são transmitidos principalmente por espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) que se infectam durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros mamíferos como canídeos, roedores, marsupiais, seres humanos entre outros (Cardoso et al., 2015; Akhoundi et al., 2016). Outra via de transmissão relatada é por doação de sangue ou órgãos infectados (Harhay et al., 2011).

A maioria das transmissões de *Leishmania* no Velho Mundo ocorre em peridomicílios de áreas semiáridas modificadas pelo homem, já no Novo Mundo, esses parasitos estão frequentemente ligados a habitats silvestres, embora certas espécies apresentem transmissão predominantemente peridomiciliar (Akhoundi et al., 2016). Segundo esses autores, a preferência pelo hospedeiro é também um fator importante que afeta o tipo de transmissão vetorial da *Leishmania*.

Além da Leishmaniose Visceral (LV), há outras manifestações clínicas no Velho Mundo: leishmaniose cutânea, cutânea difusa e disseminada, mucosa, além da leishmaniose dérmica pós Kala-azar e das recidivas de leishmaniose cutânea, que são formas de leishmaniose tegumentar (LT) (Harhay et al., 2011; WHO, 2010). No Novo Mundo estão presentes a LV, leishmaniose cutânea, mucocutânea, além da cutânea difusa e disseminada (WHO, 2010; Maroli et al., 2013).

As leishmanioses são endêmicas em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e bacia do Mediterrâneo, incluindo mais de 98 países, com exceção da Antártica, com cerca de 1,5 milhão de casos a cada ano e pelo menos 350 milhões de pessoas no mundo em situação de risco (Akhoundi et al., 2016; Marcondes et al., 2017). Esse conjunto de enfermidades constitui um importante problema de saúde pública, mostrando um aumento crescente entre 2003 e 2012 (Alvar et al., 2012), principalmente quanto aos casos de LT.

### 1.1.1 Leishmaniose visceral (LV)

A LV é uma doença causada, nas Américas (assim como na área do Mediterrâneo, Médio Oriente, África Ocidental e Ásia Central), por *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e tem uma natureza zoonótica. Na Índia (nordeste), em Bangladesh, Nepal, no leste da África e na península Arábica, a LV é causada por *Leishmania donovani* (Harhay et al., 2011; Maroli et al., 2013), com a maior parte da transmissão desse parasito ocorrendo de forma antroponótica (Ready, 2014; Maroli et al., 2013), ou seja, a transmissão é homem - vetor - homem. No nordeste da Índia, em Bangladesh, Nepal e no leste da África, o vetor envolvido nessa transmissão é *Phlebotomus argentipes*. Já no leste da África (Quênia, Etiópia, Somália, Sudão e Uganda) e na Península Arábica, *L. donovani* está associada ao flebotomíneo *Phlebotomus orientalis* e/ou ao *Phlebotomus martini* (Maroli et al., 2013).

A LV é uma doença sistêmica que acomete os órgãos internos, em especial o baço, fígado e a medula óssea (Akhoundi et al., 2016), originando um quadro de hepatoesplenomegalia progressiva e a supressão da medula óssea; se os pacientes acometidos não forem tratados (em geral, com sais de antimônio pentavalente), desenvolvem pancitopenia, imunossupressão e tornam-se propensos a superinfecções com outros patógenos, com elevado índice de morbimortalidade (McGwire; Satoskar, 2014).

Segundo Maroli et al. (2013), no Velho Mundo estão envolvidas várias espécies de flebotomíneos na transmissão de *L. infantum*, sendo que a

maioria delas pertence ao gênero *Phlebotomus* e subgênero *Larroussius* e os principais reservatórios domésticos desse parasito são os cães, enquanto que as raposas, chacais e lobos representam seus reservatórios silvestres. Porém, mais recentemente, foi comprovado que a lebre (*Lepus granatensis*) é um reservatório ativo de *L. infantum* na Espanha e podem desempenhar um papel importante em ciclos de transmissão sob condições variáveis (Arce et al., 2013; Antoniou et al., 2013).

O principal vetor de *L. infantum* nas Américas é *Lutzomyia longipalpis* (Santini et al., 2012), porém, *Lutzomyia cruzi* foi apontada como vetor em Mato Grosso do Sul (Galati et al., 1997; Santos et al., 1998; Pita-Pereira et al., 2008) e Mato Grosso (Missawa et al., 2011) no Brasil. As espécies *Lutzomyia forattinii*, *Lutzomyia almerioi*, *Evandromyia sallesi*, *Migonemyia migonei* e *Nyssomyia neivai* também podem estar envolvidas na transmissão de LV no Brasil (Pita-Pereira et al., 2008; Saraiva et al., 2009; Savani et al., 2009; Carvalho et al., 2010b; Dias et al., 2013). Recentemente também foi detectado DNA de *L. infantum* em *Psychodopygus lloydi* (Lara-Silva et al., 2015).

Os reservatórios domésticos mais importantes de *L. infantum* são os cães (Dantas-Torres, 2009). O marsupial *Didelphis albiventris* é um reservatório potencial de *L. infantum* no Brasil, assim como *Didelphis marsupialis* na Colômbia e na Venezuela. O roedor *Thrichomys laurentius*, a raposa *Cerdocyon thous* e o cachorro-vinagre *Speothos venaticus* também são considerados reservatórios potenciais de *L. infantum* no Brasil (Roque; Jansen, 2014).

Baseado nas estimativas de incidência, cerca de 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV ocorrem a cada ano (Alvar et al., 2012). Tem sido estimado que mais de 90% desses casos estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2010; Alvar et al., 2012) e que ocorram 20.000 a 40.000 mortes por LV no mundo anualmente (Alvar et al., 2012). No continente Americano, a LV é registrada como endêmica em 12 países, predominantemente no Brasil (Maroli et al., 2013).

No Brasil, a LV se distribui em 21 Estados e cinco regiões com uma média anual de 3.565 casos entre 2003 a 2012 e incidência de 1,9

casos/100.000 habitantes, com letalidade média de 6,9%. Os dados epidemiológicos desse período mostram que a doença se encontra urbanizada, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Brasil, 2014a).

### 1.1.2 Leishmaniose tegumentar (LT)

No Velho Mundo, as espécies *Leishmania major*, *L. aethiopica* e *L. tropica* são os principais agentes etiológicos de diferentes formas clínicas de LT, além de *L. infantum* e de *L. donovani*. Já no Novo Mundo, 14 espécies de *Leishmania* levam a diversas manifestações clínicas da LT. Sete delas já foram registradas no Brasil, sendo elas: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Lainson, 2010).

No Velho Mundo, *Leishmania tropica* está associada a leishmaniose cutânea antroponótica, altamente prevalente em regiões semiáridas subtropicais e se estendem de sudeste da Turquia ao noroeste da Índia. A sua transmissão ocorre de pessoa para pessoa por meio de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* em focos urbanos bem estabelecidos (Maroli et al., 2013). A leishmaniose cutânea clássica é zoonótica, sendo causada por *L. major* e espécies de roedores atuam como hospedeiros reservatórios. Seus vetores comprovados pertencem ao gênero *Phlebotomus* e subgênero *Phlebotomus*, sendo a espécie *Phlebotomus papatasi* o principal vetor, estendendo-se do norte da África à Índia. A leishmaniose cutânea com etiologia atribuída a *Leishmania aethiopica* também é zoonótica e está limitada às terras altas de Etiópia e Quênia. É um parasito clássico de mamíferos da ordem Hyracoidea (como *Procavia capensis*) e é transmitido por espécies do gênero *Phlebotomus* (Maroli et al., 2013).

Os reservatórios potenciais das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo mencionadas para o Brasil, seus flebotomíneos vetores e as formas clínicas de LT causadas por esses parasitos estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Potenciais reservatórios ou fontes de infecção de espécies de *Leishmania*, flebotomíneos vetores e as formas clínicas da LT no Brasil.

Potenciais reservatórios ou fontes de infecção	Espécies de <i>Leishmania</i>	Flebotomíneos vetores	Formas clínicas
<i>Choloepus didactylus</i> <i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	<i>Nyssomyia anduzei</i> <i>Nyssomyia umbratilis</i> <i>Nyssomyia whitmani</i>	LC e LMC
<i>Dasypus novemcinctus</i>	<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	<i>Psychodopygus amazonensis</i> * <i>Psychodopygus ayrozai</i> <i>Psychodopygus paraensis</i> * <i>Psychodopygus squamiventris</i> *	LC
<i>Proechimys</i> sp.	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i> <i>Bichromomyia olmeca olmeca</i> <i>Bichromomyia reducta</i> <i>Lutzomyia longipalpis</i>	LC, LCD
<i>Thrichomys laurentius</i> <i>Rattus rattus</i> <i>Necromys lasiurus</i>	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	<i>Evandromyia edwardsi</i> * <i>Migonemyia migonei</i> <i>Nyssomyia intermedia</i> * <i>Nyssomyia neivai</i> <i>Nyssomyia whitmani</i> <i>Pintomyia fisheri</i> <i>Pintomyia pessoai</i> * <i>Psychodopygus complexus</i> <i>Psychodopygus paraensis</i> * <i>Psychodopygus wellcomei</i>	LC; LMC; LCD+
<i>Agouti paca</i>	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	LC
<i>Cebus apella</i> <i>Chiropotes satanas</i>	<i>Leishmania (V.) shawi</i>	<i>Nyssomyia whitmani</i>	LC
<i>Homo sapiens sapiens</i>	<i>Leishmania (V.) lindenbergi</i>	<i>Nyssomyia antunesi</i> *	LC

Fonte: Lainson (2010); Maroli et al. (2013); Roque e Jansen (2014).

\*espécies suspeitas; +em casos de imunossupressão severa; LC, leishmaniose cutânea; LMC, leishmaniose mucocutânea; LCD, leishmaniose cutânea difusa ou disseminada.

Segundo Goto e Lindoso (2012), a LT compõe um conjunto de várias formas clínicas, as quais dependem da espécie de *Leishmania*, da estirpe envolvida e da resposta do hospedeiro.

A forma cutânea simples ou localizada manifesta-se geralmente como lesões cutâneas e ulcerativas peculiares (normalmente indolores, rosas e redondas, com bordas elevadas e bem delimitadas, com um fundo limpo onde às vezes pode aparecer uma crosta central que pode sangrar), em áreas expostas do corpo, em geral na face, antebraços e pernas, sendo que sua progressão se dá ao longo de semanas a meses e, quase sempre, a cura pode se dar de forma espontânea, deixando uma cicatriz permanente hipopigmentada, suave e fina; alguns casos evoluem para outras formas da doença (Goto; Lindoso, 2012; Mcgwire; Satoskar, 2014).

A forma cutânea difusa é rara e evolui progressivamente da cutânea simples, sendo caracterizada por anergia persistente das células T, múltiplas lesões nodulares cheias de parasitos, de diversos tamanhos e em vários locais, pápulas ou tubérculos com infiltração cutânea difusa e sem ulceração, as quais se localizam principalmente em áreas expostas do corpo e muitas vezes distantes do local de picada dos insetos (Goto; Lindoso, 2012; Mcgwire; Satoskar, 2014; Marcondes et al., 2017). Em geral, os pacientes acometidos com essa forma da doença apresentam resultados negativos no teste de Montenegro e respondem apenas à terapia com pentamidina (Marcondes et al., 2017).

A forma cutânea disseminada é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões pleomórficas em duas ou mais áreas não contíguas do corpo, provavelmente causadas por disseminação hematogênica ou linfática. São lesões do tipo acneiformes, papulosas, raramente ulceradas e associadas a calafrio e febre, sendo a mucosa acometida em quase 30% dos casos (Goto; Lindoso, 2012; Marcondes et al., 2017). Os pacientes que apresentam essa forma clínica possuem resultados positivos no teste de Montenegro e respondem à terapia com anfotericina B, em oposição à terapia com antimoniais (Marcondes et al., 2017).

A forma mucosa geralmente se apresenta como uma infecção desfigurante, surgindo simultaneamente às lesões cutâneas (mucocutânea) ou, até mesmo, 20 anos após sua cura. As lesões nasais, quando presentes, apresentam nódulos e infiltração do septo cartilaginoso, obstrução da narina, perfuração do septo e até mesmo destruição total do nariz. Partes da face, faringe, laringe, palato mole e traqueia podem ser afetadas, com linfadenopatia (Goto; Lindoso, 2012; Marcondes et al., 2017), prejudicando a função respiratória e dificultando a nutrição dos pacientes acometidos dessa forma de LT, os quais, em geral, vêm a óbito por desnutrição e infecções secundárias, já que o parasito é muitas vezes resistente à quimioterapia (Mcgwire; Satoskar, 2014). A associação de drogas, como antimonial e a pentoxifilina, reduz a reação inflamatória responsável pela lesão tecidual em lesões mucocutâneas (Marcondes et al., 2017).

A coinfeção *Leishmania*-HIV favorece o aparecimento de formas difusas ou mucosas (Marcondes et al., 2017). Nos pacientes coinfectados, as manifestações clínicas parecem ser semelhantes aos não coinfectados, mas podem se apresentar como formas incomuns: infiltração difusa e disseminada da superfície mucosa do palato e lesões genitais (Lindoso et al., 2016).

A LT é mais amplamente distribuída do que a LV e cerca de um terço dos casos ocorre em regiões tropicais das Américas, na bacia do Mediterrâneo, na Ásia Central e Ocidental (Rangel et al., 2014). Baseado nas estimativas de incidência, 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea ocorrem a cada ano, sendo que os países como Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru têm o maior número de casos estimado dessa forma clínica, respondendo por 70 a 75% da estimativa mundial de incidência para LT (Alvar et al., 2012).

Todos os Estados do Brasil têm registros de casos de LT e o número de municípios acometidos pela doença cresce a cada ano (Rangel et al., 2014). No período entre 2003 a 2012, a LT apresentou média anual de 26.965 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 15,7 casos a cada 100.000 habitantes. Tomando como base esse período, a região Norte contribuiu com o maior número de casos (aproximadamente 37,3% do total de

casos registrados) e com o mais elevado coeficiente médio de detecção de casos (73,3 casos a cada 100.000 habitantes), seguida pelas regiões Centro-Oeste (35,4 casos a cada 100.000 habitantes) e Nordeste - 18,8 casos a cada 100.000 habitantes (Brasil, 2014b).

## 1.2 *Leishmania* no vetor e no hospedeiro

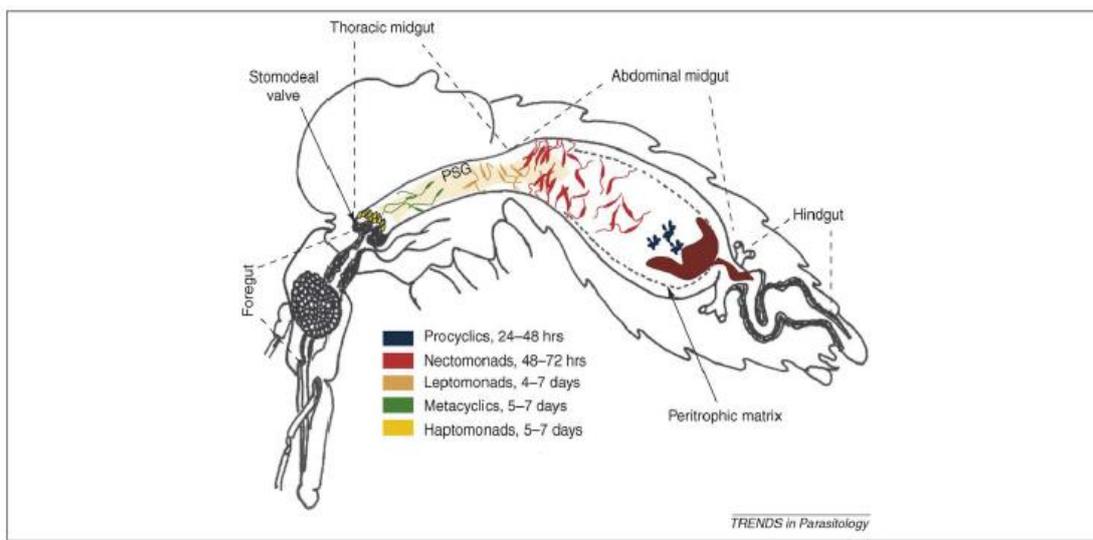
A infecção das fêmeas dos flebotomíneos com o parasito do gênero *Leishmania* ocorre durante o seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (fonte de infecção), por meio da ingestão de células infectadas do sistema fagocítico mononuclear (Kamhawi, 2006; Harhay et al., 2011).

Os macrófagos infectados contêm amastigotas de *Leishmania*, formas parasitárias pequenas (3-5 mm), imóveis e arredondadas (Dostálová; Volf, 2012). As formas amastigotas são liberadas no intestino médio abdominal dos flebotomíneos, e dentro do bolo alimentar (envolvido por uma matriz peritrófica) ocorre a transformação e o desenvolvimento morfológico do parasito (associada a intensa multiplicação celular) em promastigotas procíclicas, que são formas fracamente móveis com um flagelo curto na extremidade anterior da célula - Figura 1 (Kamhawi, 2006; Harhay et al., 2011; Dostálová; Volf, 2012; Teixeira et al., 2013).

Ainda no intestino médio abdominal desses insetos, as promastigotas procíclicas mudam para nectomonas. Tais formas migram para o intestino médio torácico anterior. As leptomonas surgem das nectomonas, e nesse local passam pelo segundo ciclo de multiplicação no flebotomíneo. Após isto se diferenciam em formas metacíclicas infectantes que se acumulam atrás da válvula estomodeal, garantindo a disponibilidade de um grande número de parasitas para transmissão. No intestino anterior, os parasitos produzem o PSG (*promastigote secretory gel*), o qual os mantém encharcados e presos. As haptomonas são formas que surgem por último (após 5-7 dias) e ficam ligadas à válvula estomodeal. Em flebotomíneos fortemente infectados pode haver rompimento dessa válvula, e algumas promastigotas metacíclicas

migram para a probóscide - Figura 1 (Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2012). Durante contínuas picadas de fêmeas desses insetos, essas formas infectantes são liberadas, podendo infectar um novo hospedeiro mamífero silvestre ou humanos (Harhay et al., 2011; Teixeira et al., 2013).

**Figura 1** - O ciclo de vida de *Leishmania* em um vetor competente.



Fonte: Kamhawi (2006).

Após a transmissão para um vertebrado mamífero, as formas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas e, logo em seguida, transformam-se em amastigotas e se multiplicam por divisão simples e, ao romperem a membrana do macrófago, são liberadas para o tecido (Kamhawi, 2006; Harhay et al., 2011; Teixeira et al., 2013). As amastigotas presentes nos macrófagos desse mamífero podem invadir novos macrófagos ou serem ingeridas por um novo flebotomíneo durante o seu repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (Teixeira et al., 2013).

### 1.3 Biologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos pertencem à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Akhoundi et al., 2016). Eles são insetos comprovados na

transmissão de *Leishmania* por meio da picada de fêmeas, bem como de outros patógenos como os vírus da febre por flebotomíneos (febre Siciliana e febre Toscana), os vírus da estomatite vesicular como Chandipura e Isfahan (Maroli et al., 2013), a bactéria da doença do Carrión - *Bartonella bacilliformis* (Sharma; Singh, 2008), além de que também transmitem outros tripanossomatídeos como *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum* (Shaw et al., 2003). Há evidências de que a transmissão de *Leishmania* na Austrália ocorre por meio de ceratopogonídeo (Dougall et al., 2011).

Durante o dia, os adultos podem ser encontrados em diversos locais de repouso como celeiros de animais, no interior e exterior das casas, ninhos de aves, cavernas, buracos de árvores, folhagens e espaços entre ou sob rochas, tocas de animais e fendas de rochas, fissuras nas paredes e entre a vegetação (Alkan et al., 2013). Os flebotomíneos são pequenos, dificilmente ultrapassam 3,5 mm de comprimento, têm o corpo “piloso”, em geral a cor varia de quase branco a quase preto, têm pernas muito longas e delicadas (Figura 2), mantêm as asas sobre o abdome em uma forma de asa delta quando estão em repouso (Maroli et al., 2013).

**Figura 2** - Flebotomíneos adultos: fêmea (à esquerda) e macho (à direita).



Fonte: o autor.

Ambos os sexos alimentam-se de secreções açucaradas de plantas ou de secreções produzidas por pulgões homópteros (Hemiptera: Aphidoidea) (Moore et al., 1987; Petts et al., 1997), porém as fêmeas dependem do sangue para completarem o desenvolvimento dos seus ovos. O repasto sanguíneo pode ocorrer em diferentes períodos do dia, pois essas fêmeas entram em atividade principalmente à noite, no decorrer da noite e no começo da manhã, (Maroli et al., 2013), porém há espécies que podem picar durante o dia, a exemplo de *Lu. almerioi* (Galati et al., 2006). Segundo Alkan et al. (2013), ao saírem para ingurgitar, eles normalmente saltam em torno do hospedeiro antes de realizarem a hematofagia. Elas podem se alimentar em diversos animais, entre eles aves, répteis, vários roedores, carnívoros, artiodáctilos e primatas como o ser humano (Sharma; Singh, 2008).

Em experimentos de laboratório com *Lu. longipalpis*, foi observado que, após o repasto sanguíneo e a oviposição das fêmeas, as larvas de primeiro instar surgiram entre 12-15 dias, as pupas entre 28-37 dias e os adultos entre 37-47 dias (Volf; Volfova, 2011), porém esse desenvolvimento de ovo a adulto varia de espécie para espécie, associado a fatores como temperatura, umidade, número de indivíduos confinados, substrato e alimento oferecido para as larvas (Brazil et al., 1997; Andrade Filho et al., 2004b; Goulart et al., 2015; Ribeiro et al., 2015). Independente dessas variáveis, os ovos são postos por fêmeas adultas em um habitat com umidade e temperatura adequada, e na natureza em solo, rico em matéria orgânica, que fornece às larvas, recém eclodidas, abrigo, nutrição e ambiente úmido (Maroli et al., 2013).

A densidade dos flebotomíneos neotropicais e de outras regiões do mundo é dependente de condições climáticas (Quaresma et al. 2012), a exemplo da temperatura, umidade e precipitação, além de fonte alimentar para fêmeas. Algumas espécies de flebotomíneos estudadas predominam no período chuvoso e mais quente do ano como *Lu. longipalpis* (Barata et al., 2011; Lara-Silva et al., 2015), *Ny. whitmani* (Aguiar et al., 2014; Barata et al., 2011), *Ny. intermedia* (Aguiar et al., 2014; Barata et al., 2011), *Mg. migonei* e *Pintomyia fischeri* (Aguiar et al., 2014). Contudo, este padrão pode sofrer variações como já visto por Saraiva et al. (2011) e Pinheiro et al. (2013). Tais

variações foram observadas em Belo Horizonte (MG) para a espécie *Ny. whitmani*, a qual foi mais abundante nos meses com baixa umidade relativa do ar e temperaturas amenas (Saraiva et al., 2011), e em Parnamirim (RN) onde a maioria das espécies estudadas (a exemplo de *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani*) foi predominante na estação seca e em temperaturas mais altas (Pinheiro et al., 2013). Outros estudos não registraram nenhuma correlação entre tais fatores climáticos e a densidade de flebotomíneos (Oliveira et al., 2013; Saraiva, 2015).

#### **1.4 Distribuição geográfica dos flebotomíneos**

Os flebotomíneos estão distribuídos ao longo da maioria das regiões do mundo, com 1.003 espécies ou subespécies descritas, sendo 974 atuais (Shimabukuro; Galati, 2011; Andrade et al., 2013; Galati, 2016a; Brilhante et al., 2016; Shimabukuro et al., 2017).

Os flebotomíneos do Velho Mundo são encontrados nas regiões Paleártica, Afrotropical, de Madagascar, Oriental e Australiana, sendo representados por mais de 420 espécies; destas, 49 espécies do gênero *Phlebotomus* são vetores comprovados ou prováveis de *Leishmania* (Akhound et al., 2016).

No Novo Mundo, os flebotomíneos são encontrados nas regiões Neártica e Neotropical (Akhoundi et al., 2016), sendo representados por 537 espécies (Shimabukuro; Galati, 2011; Andrade et al., 2013; Shimabukuro et al., 2017) e 56 destas são prováveis ou suspeitas de transmissão de *Leishmania* para o homem e outros animais (Maroli et al., 2013). Dessas 537 espécies de flebotomíneos, 277 são encontradas no Brasil (Andrade et al., 2013; Brilhante et al., 2016; Shimabukuro et al., 2016), sendo que 20 espécies são apontadas como vetores de *Leishmania* (Ready, 2013), entre elas estão: *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi*, *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* e *Bi. flaviscutellata*.

*Lutzomyia longipalpis* tem ampla distribuição geográfica no Brasil, sendo encontrada em quase todas as unidades federativas, com exceção do Amazonas e do estado de Santa Catarina (Galardo et al., 2013; Galati, 2016a). Provavelmente isto ocorre devido a condições climáticas. *Lutzomyia cruzi* tem ocorrência restrita a Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Galati, 2016a), e está presente em 52 municípios distribuídos entre esses estados (Almeida et al., 2015).

*Nyssomyia whitmani* ocorre em todas as 27 unidades da federação e já foi detectada em 634 municípios brasileiros (Rangel et al., 2014). *Nyssomyia intermedia* está presente em Tocantins, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal (Galati, 2016a).

*Bichromomyia flaviscutellata* já foi encontrada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Maranhão, Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal (Galati, 2016a), sendo que essa espécie foi detectada em 131 municípios brasileiros (Rangel et al., 2014), e a maioria dessas áreas são pertencentes à região Centro-Oeste do Brasil (Almeida et al., 2015).

## **1.5 Alterações antrópicas e aumento do risco de transmissão das leishmanioses por flebotomíneos**

Ações antrópicas relacionadas ao desenvolvimento, intensificação da agricultura e à urbanização elevam as taxas de desmatamento (Afonso, 2013) que, por sua vez, darão origem à fragmentação de habitats. Em fragmentos de tamanhos menores, espécies que ocorrem naturalmente em densidades muito baixas podem ter reduções consideráveis no tamanho de suas populações, sendo assim mais vulneráveis. Certas espécies de flebotomíneos com importância médica podem ocupar habitats degradados e ainda serem

capazes de se manter; além disto, o desmatamento pode favorecer a dispersão de espécies dessas áreas para ambientes próximos e com melhores condições de vida (Pessoa et al., 2007). Esse processo pode favorecer algumas espécies de flebotomíneos em ambientes antropizados e desencadear surtos de leishmanioses (Azevedo et al., 2011).

Outro fator associado ao desmatamento é a migração humana como, por exemplo, no caso de grandes empreendimentos, que acontece devido à quantidade de mão de obra necessária para a execução de uma obra. Com isto, pode ser observado um aumento no desmatamento e no número de assentamentos não planejados, aliados a outros impactos ambientais. Tais alterações expõem o ser humano aos flebotomíneos, levando à propagação de leishmanioses e à possível instauração do ciclo enzoótico em áreas domiciliares (Vilela et al., 2011). Tal mudança no perfil de transmissão dessas doenças também está ligada ao ser humano devido à ocupação de áreas de encostas e agregação em áreas periurbanas (Rangel et al., 2014), onde a falta de saneamento básico e a coleta esporádica de lixo fornecem os ambientes ideais para reprodução de flebotomíneos (Bigeli et al., 2012).

Segundo Maroli et al. (2013), a proliferação desordenada de favelas com condições sanitárias precárias é derivada do processo de urbanização. Para esses autores, em tais localidades, a pobreza e as condições precárias de habitação são considerados fatores de risco comuns para ambos os tipos de leishmanioses humanas. Os conglomerados humanos podem contribuir com a manutenção do ciclo de várias espécies de flebotomíneos mais adaptáveis, já que a densidade populacional humana é capaz de produzir ambientes favoráveis para tal se forem fornecidos locais propícios para criadouros, descanso, reprodução e se houver disponibilidade de fontes de repasto para esses insetos nessas localidades (Ramos et al., 2014).

A distribuição da LV associada à *Lu. longipalpis* para áreas urbanizadas é consequência da adaptação da espécie a ambientes modificados e é favorecida por sua capacidade de se alimentar com frequência em animais domésticos e sinantrópicos, por sua notável antropofilia (Rangel; Vilela, 2008) e por drásticas mudanças ambientais.

A ecoepidemiologia da LT no Brasil está fortemente ligada ao ciclo de transmissão de *L. (V.) braziliensis* e ao vetor *Ny. whitmani*, particularmente em áreas impactadas ambientalmente, áreas rurais na periferia das cidades, de forma que este novo perfil epidemiológico é decorrente das mudanças ambientais e da adaptação dessa espécie a esses novos habitats modificados pelo ser humano (Vilela et al., 2013).

## **1.6 Infecção natural e uso da PCR para a detecção de tripanossomatídeos em flebotomíneos**

Para incriminar uma espécie como vetora de *Leishmania*, o inseto deve ser encontrado infectado em ambientes peridomésticos e domésticos; a distribuição da espécie também deve coincidir com a da doença em seres humanos; ele deve alimentar-se regularmente em seres humanos e outros hospedeiros (Killick-Kendrick, 1999), e atualmente, Ready (2013) propôs que a interação entre o vetor e os hospedeiros deve ser analisada por modelos matemáticos. Por essa razão, a identificação das espécies de tripanossomatídeos nos flebotomíneos é uma das formas de avaliação necessária para se estabelecer isso.

A pesquisa de flagelados no intestino médio do inseto vetor e a identificação da espécie do parasito geralmente são feitas após a dissecação do intestino do mesmo a partir do encontro das formas promastigotas por microscopia óptica. Em alguns casos, a infecção é confirmada a partir da inoculação de material de insetos em meios de cultura (Paiva et al., 2007) ou inoculação em cobaias (Rangel et al., 1984; Ryan; Brazil, 1984; Lainson et al., 1985). Essa técnica é considerada padrão ouro para determinação da infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. Por outro lado, esse método tem limitações: é trabalhoso, demorado e oneroso (Paiva et al., 2007), sendo necessário analisar várias amostras de flebotomíneos a fim de se obter dados informativos para as áreas em estudo (Sharma; Singh, 2008), pois geralmente a taxa de infecção das fêmeas por *Leishmania* spp. é baixa

(Savani et al., 2009). Outro fator a se considerar é que flebotomíneos são hospedeiros de outras espécies de tripanossomatídeos, por exemplo, *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, cujos estágios no vetor são similares aos das espécies de *Leishmania* (Dias, 2011; Ferreira et al., 2015).

Ultimamente, a técnica da dissecação do intestino de flebotomíneos vem sendo substituída pela PCR (reação em cadeia da polimerase) que representa uma alternativa para detecção e identificação de *Leishmania* spp. (Pita-Pereira et al., 2011), a qual consiste em ampliar o DNA do parasito presente no inseto vetor. Embora seja um método mais caro do que a retirada do intestino para pesquisa de infecção natural por microscopia, a PCR é mais sensível e tem maior especificidade (Paiva et al., 2006). Por outro lado, a infecção por *Leishmania* de uma determinada espécie de flebotomíneo detectada pela PCR, por si só não permite dizer que o mesmo seja vetor daquela espécie, assim como nas demais técnicas.

Ainda assim, a PCR vem sendo utilizada em vários estudos relacionados a taxa de infecção de flebotomíneos e para identificar o parasito *Leishmania* (Michalsky et al., 2011; Quaresma et al., 2012; Vilela et al., 2013), mostrando-se vantajosa em relação às outras técnicas disponíveis e permitindo uma identificação correta do parasito ao nível de gênero, subgênero e espécie (Pita-Pereira et al., 2011), porém nem sempre é possível determinar a espécie. A taxa de infecção por *Leishmania* no vetor é considerada baixa na natureza (Michalsky et al., 2011), mesmo em áreas endêmicas para leishmanioses. Os valores médios dessas taxas permanecem abaixo dos 3%, dificilmente chegando a 10% quando avaliada por dissecação ou por PCR (Missawa et al., 2010). Resultados diferentes foram obtidos por Lara-Silva et al. (2015) e Saraiva et al. (2010), cujas taxas de infecção de *Lu. longipalpis* por *L. infantum* foram de 18,8% e 19%, respectivamente.

A detecção da infecção natural nesses insetos, em diferentes ambientes e com graus de alteração antrópica distintos é importante para a epidemiologia das leishmanioses (Soares et al., 2010; Saraiva, 2015).

## 1.7 Leishmaniose visceral (LV) e Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado do Tocantins e em Palmas

A criação do Estado do Tocantins em 1988 pela Constituição Federal do Brasil levou ao rápido crescimento socioeconômico, o que está associado à migração de pessoas, ao desmatamento, à precariedade ou ausência de escoamento sanitário etc. (Matteo et al., 2016). Porém, na última década, o Tocantins tem sido submetido a alterações ambientais ligadas a atividades agropecuárias e construção de usinas hidrelétricas (Afonso, 2013).

A construção da capital, Palmas, em áreas de mata deu origem a vários fragmentos de floresta distribuídos pela cidade (Glória, 2006) e também está associada à migração de muitas pessoas pobres, às quais se estabeleceram nas regiões periféricas da cidade e em condições de difícil acesso à pavimentação de ruas, ao abastecimento de água, à energia elétrica e à iluminação pública (Teixeira, 2009), assim como ausência de saneamento básico, de sistema de coleta e disposição final do lixo. Fatores esses que expõem o homem e animais domésticos ao contato direto com os flebotomos e assim são consideradas áreas de risco para se adquirir leishmanioses.

Em três cidades do Tocantins (Alvorada, Itacajá e São Sebastião do Tocantins), Lustosa et al. (1986) registraram pela primeira vez duas espécies de flebotomíneos (Tabela 2), e *Ny. whitmani* foi a de maior abundância. No mesmo Estado, Andrade-Filho et al. (2001) capturaram 32 espécies de flebotomíneos entre as cidades de Porto Nacional, Paraíso do Tocantins, Monte do Carmo e Monte Santo. Neste estudo, 18 espécies foram registradas pela primeira vez no Tocantins (Tabela 2), além de uma denominada como *Lutzomyia* sp. As espécies *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* estavam entre as mais abundantes, com preferência pelo peridomicílio das residências. Em 2004, tais espécimes de *Lutzomyia* sp. foram considerados como pertencentes a uma espécie nova (*Micropygomyia echinatopharynx*) (Andrade-Filho et al., 2004a). Carvalho et al. (2010b) analisaram espécimes de flebotomíneos capturados no ano de 1965 em uma caverna no município

de Arraias (TO) e descreveram uma nova espécie (*Martinsmyia reginae*) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Estudos com registro de espécies de flebotomíneos inéditas para o Tocantins.

<b>Espécies</b>	<b>Autores</b>	<b>Ano</b>
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Brumptomyia avellari</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Brumptomyia brumpti</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Evandromyia bacula</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Evandromyia begonae</i>	Vilela et al.	2011
<i>Evandromyia bourrouli</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Evandromyia brachyphala</i>	Vilela et al.	2011
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Evandromyia corumbaensis</i>	Vilela et al.	2011
<i>Evandromyia pinottii</i>	Vilela et al.	2011
<i>Evandromyia sallesi</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Evandromyia saulensis</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Evandromyia walkeri</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Expapillata cerrandicola</i>	Vilela et al.	2011
<i>Lutzomyia elizabethrangela</i>	Vilela et al.	2015
<i>Lutzomyia gomezi</i>	Lustosa et al.	1986
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Lutzomyia sherlocki</i>	Vilela et al.	2011
<i>Martinsmyia minasensis</i>	Vilela et al.	2011
<i>Martinsmyia oliveirai</i>	Machado et al.	2012
<i>Martinsmyia reginae</i>	Carvalho et al.	2010
<i>Micropygomyia echinatopharynx</i>	Andrade Filho et al. & Vilela et al.	2004; 2011
<i>Micropygomyia longipennis</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Micropygomyia micropyga</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Micropygomyia osvaldoi</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	Vilela et al.	2011
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Micropygomyia villelai</i>	Vilela et al.	2011
<i>Migonemyia migonei</i>	Vilela et al.	2011
<i>Nyssomyia richardwardi</i>	Vilela et al.	2011
<i>Nyssomyia whitmani</i>	Lustosa et al.	1986
<i>Pintomyia damascenoi</i>	Vilela et al.	2013
<i>Pressatia choti</i>	Machado et al. & Vilela et al.	2012; 2013
<i>Psathyromyia aragai</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	Vilela et al.	2011
<i>Psathyromyia campbelli</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Psathyromyia dasymera</i>	Vilela et al.	2011
<i>Psathyromyia dendrophyla</i>	Vilela et al.	2011
<i>Psathyromyia dreisbachi</i>	Vilela et al.	2013
<i>Psathyromyia inflata</i>	Vilela et al.	2011
<i>Psathyromyia lutziana</i>	Vilela et al.	2011
<i>Psathyromyia pascallei</i>	Vilela et al.	2011
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	Vilela et al.	2011
<i>Psathyromyia pradobarrientosi</i>	Machado et al. & Vilela et al.	2012; 2013
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	Vilela et al.	2013
<i>Psychodopygus claustreri</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Psychodopygus complexus</i>	Vilela et al.	2013
<i>Psychodopygus davisii</i>	Vilela et al.	2013
<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i>	Vilela et al.	2013
<i>Psychodopygus llanosmartinsi</i>	Vilela et al.	2013
<i>Psychodopygus paraensis</i>	Vilela et al.	2013
<i>Sciopemyia microps</i>	Vilela et al.	2011
<i>Viannamyia tuberculata</i>	Andrade Filho et al.	2001
<i>Viannamyia furcata</i>	Vilela et al.	2011
<i>Trichopygomyia dasypodogeton</i>	Vilela et al.	2011
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	Vilela et al.	2013

Posteriormente, Machado et al. (2012) capturaram 32 espécies de flebotomíneos, e só três delas foram registradas pela primeira vez em Tocantins no distrito de Taquaruçu (Tabela 2). As espécies *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* foram as mais abundantes entre as espécies vetores, tendo preferência pelo intradomicílio de residências de Taquaruçu.

Segundo Vilela et al. (2011), das 51 espécies de flebotomíneos identificadas na cidade de Porto Nacional (TO), 22 foram observadas pela primeira vez no Tocantins (Tabela 2). Porém esta informação não está de acordo, já que foi Andrade-Filho et al. (2004a) que capturaram pela primeira vez uma dessas espécies (*Mi. echinatopharynx*) nesse Estado. Entre as espécies vetores, *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* foram as mais abundantes e com preferência pela área urbana.

Em Guaraí (TO), Vilela et al. (2013) identificaram 43 espécies de flebotomíneos, sendo 11 registradas pela primeira vez no Estado (Tabela 2). Porém este relato também está incoerente já que Machado et al. (2012) registraram primeiro duas dessas espécies (*Pressatia choti* e *Psathyromyia pradobarrientosi*) para o Tocantins (Tabela 2). *Nyssomyia whitmani* e *Lu. longipalpis* foram as mais abundantes entre as espécimes que não foram identificadas no campo, porém vetores coletadas nas áreas periurbanas da cidade.

Na ocasião de estudos bioecológicos conduzidos durante o monitoramento entomológico vetorial, como parte da avaliação do impacto da construção da Planta hidrelétrica Peixe Angical no rio Tocantins, em Palmeirópolis (TO), houve captura de espécimes sem prévia identificação no campo. Porém, mais tarde uma nova espécie foi observada e descrita como *Lutzomyia elizabethrangela* (Vilela et al., 2015).

Diante dessas informações, o número de espécies de flebotomíneos registrado no Tocantins passou a ser 70 (Lustosa et al., 1986; Andrade-Filho et al., 2001; Andrade-Filho et al., 2004a; Carvalho et al., 2010b; Machado et al., 2012; Vilela et al., 2011; Vilela et al., 2013; Vilela et al., 2015). Algumas destas, como *Ny. whitmani*, *Lu. longipalpis*, *Evandromyia bourrouli*, *Ny. antunesi*, *Micropogomyia villelai*, *Psychodopygus complexus*, *Ps. ayrozai*, têm

sido registradas com maior frequência em ambientes modificados (Machado et al., 2012; Vilela et al., 2013; Godoy et al., 2017). *Psychodpopygus complexus* e *Ps. ayrozai* já foram encontradas infectadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no estado (Vilela et al. 2013) comprovando a circulação dessa espécie de protozoário no estado. Em municípios de Tocantins, tem sido registrada alta frequência de cães e crianças infectadas por *Leishmania* evidenciando esse processo (Bigeli et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Teles et al., 2016; Guimarães et al., 2017).

No período de 2003 a 2012, observou-se um aumento significativo no número de casos da LTA no Brasil (Brasil, 2014b), em detrimento da LV (Brasil, 2014a). Já é sabido que fatores como migração, desmatamento, ações relacionadas ao desenvolvimento, à intensificação da agricultura e à urbanização, favorecem a transmissão das leishmanioses (WHO, 2010; Vilela et al., 2011; Afonso, 2013; Maroli et al., 2013), e a consequência disso foi o aumento do número de casos humanos desses agravos nos assentamentos e nas cidades.

A Região Norte ocupa a 3ª posição no ranking de casos de LV humana no Brasil, e o Tocantins é responsável pela maioria dos casos desse agravo na região (Brasil, 2015a); além disso, esse Estado está na sexta posição com relação aos casos de LTA na Região Norte, a qual está em primeiro lugar no ranking de casos dessa doença no Brasil (Brasil, 2015b).

Entre os anos de 2011 a 2015, foram confirmados 1.473 casos novos de LV humana para o Estado, o que representa uma média de 294,6 casos por ano. Porém nos últimos três anos, essa média diminuiu para 216,3 casos por ano (Tocantins, 2015a). Considerando o mesmo período (2011-2015), foram confirmados 2.685 casos novos de LTA no Tocantins, o que representa uma média anual de 531,6 casos por ano. Mas nos últimos três anos, houve aumento dessa média, passando para 591,3 casos por ano (Tocantins, 2015b).

Considerando Palmas como o município de residência, entre os anos de 2011 a 2015 foram notificados e confirmados 111 casos de LV humana e 169 casos de LTA nessa cidade (Palmas, 2015a, b).

A média de casos de LV humana em Palmas entre 2011 a 2015 foi de 22,2 casos por ano. Mas tal média reduziu para 17,3 casos por ano quando se considera só os casos de LV humana dos últimos três anos (Palmas, 2015a). A média de casos de LTA em Palmas nos anos de 2011 a 2015 foi de 33,8 casos por ano. Porém, houve um aumento dessa média para 44 casos por ano quando se leva em conta os últimos três anos (Palmas, 2015b).

Nos anos de 2011 a 2015 se registrou 10.483 cães positivos para LV em Palmas (TO), e os anos de 2011 e 2015 foram os que apresentaram maior número de cães com LV, sendo confirmados 2.968 e 3.450 casos positivos, respectivamente (Palmas, 2015c).

Estes dados indicam a necessidade de uma vigilância mais ativa incluindo o monitoramento da ocorrência e da infecção natural de flebotomíneos em municípios de Tocantins.

## 2 JUSTIFICATIVA

Com exceção da Austrália, os flebotomíneos são os principais e comprovados vetores de espécies de *Leishmania*. O perfil epidemiológico das leishmanioses vem sofrendo influência da ação antrópica nos ambientes em que ocorrem as doenças, aproximando o ser humano e seus animais domésticos desses insetos e, conseqüentemente, do parasito. Esses processos constantes de degradação ambiental como urbanização e o desmatamento, por exemplo, podem alterar negativamente a biodiversidade de um determinado local. Uma das conseqüências dessa interferência do ser humano é a formação de fragmentos florestais. Nestes ambientes, a quantidade de recursos alimentares (mamíferos silvestres) disponíveis para os flebotomíneos pode alterar as suas taxas de infecção natural por *Leishmania* e selecionar as espécies generalistas com maior capacidade de adaptação ao ambiente degradado.

Tal processo pode ser observado em Palmas (TO), que é uma capital brasileira em franco processo de urbanização (com constante aumento populacional) e com fragmentos de área florestada de diferentes tamanhos que se misturam a essa nova paisagem urbana. Dada a algumas dessas características, a fauna flebotomínica do município tem sido amostrada, e a riqueza de espécies, quando comparada a outros estados do Brasil, é elevada. Tais espécies se distribuem em maior ou menor frequência em diferentes ambientes, tanto em área urbana como em área rural. Os dados da SEMUS de Palmas elucidam essa tríade epidemiológica (humano + vetor + parasito), associados a esse ambiente em processo de degradação onde foram notificados e confirmados 111 casos de LV humana e 169 casos de LTA no município, entre os anos de 2011 a 2015.

Embora se conheça essa fauna flebotomínica, não há registro de infecções naturais por *Leishmania* nesses insetos capturados em fragmentos

florestais e habitações humanas de Palmas, bem como as espécies de *Leishmania* que circulam nos flebotomíneos nesses ambientes e nesse município.

O conhecimento das espécies de flebotomíneos que apresentam maior tendência de adaptação ao ambiente antrópico e de seus níveis de infecção natural por *Leishmania* são necessários para a identificação de áreas de risco potencial de ocorrência das leishmanioses. Mais especificamente, acredita-se que os dados adquiridos no presente estudo permitirão uma avaliação epidemiológica das duas formas da doença em Palmas, bem como poderão auxiliar os órgãos competentes na definição das estratégias de controle da LTA e da LV no município.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Investigar a fauna flebotomínica em fragmentos de matas e em unidades domiciliares (UDs), bem como a infecção natural por tripanosomatídeos nas fêmeas de flebotomíneos capturados em dois períodos distintos, seco e chuvoso.

#### 3.2 Específicos

1. Analisar a flebotomínica em fragmentos de matas de galeria e unidades domiciliares (UDs) em Palmas (centro da cidade e no distrito de Taquaruçu) em dois períodos do ano (seco e chuvoso).
2. Identificar as espécies de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos presentes em flebotomíneos nessas áreas em dois períodos do ano (seco e chuvoso).
3. Estimar a taxa mínima de infecção natural por tripanosomatídeos em fêmeas de flebotomíneos coletadas nessas áreas em dois períodos do ano (seco e chuvoso).
4. Comparar as taxas de infecção natural por tripanosomatídeos em flebotomíneos entre fragmentos de matas de galeria e UD's adjacentes a esses fragmentos em Palmas (centro da cidade e no distrito de Taquaruçu) em dois períodos do ano (seco e chuvoso).
5. Avaliar a receptividade das unidades domiciliares de Palmas para a ocorrência de flebotomíneos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Áreas de estudo

Tocantins possui uma área de 277.720,50 km<sup>2</sup>, representando 3,26% do território nacional e 7,2% da Região Norte (Matteo et al., 2016) (Figura 3). A população tocantinense é composta por 1.515,126 habitantes (IBGE, 2015b). Localiza-se entre as coordenadas geográficas 46°00' e 51°00' de longitude Oeste e 05°00' e 13°00' de latitude Sul; sendo limitado ao norte com o Estado do Maranhão; a leste, com o do Piauí e o da Bahia; a oeste, com o estado do Pará e Mato Grosso; e ao sul, com o de Goiás (Matteo et al., 2016). Há três grandes regiões fitogeográficas no Estado (Cerrado, Floresta Estacional e Floresta Ombrófila) e três regiões de tensão ecológica (um ecótono – zonas de contato entre regiões fitogeográficas e dois enclaves – manchas de outros ecossistemas). O clima predominante é do tipo úmido subúmido, com moderada deficiência hídrica no inverno (C2wA'a"), e a temperatura média anual varia entre 25°C a 29°C (SEPLAN, 2012). A precipitação pluvial média anual é 1.300 a 1.500 mm, sendo que o período chuvoso é de outubro a abril e o seco é de maio a setembro; em seu relevo predominam planícies com altitudes que não ultrapassam 500 metros, a maior parte dos planaltos, patamares e das depressões tem pouca variação de altitude em relação ao nível do mar (Matteo et al., 2016).

Palmas é a mais nova capital brasileira, com uma estimativa de 272.726 habitantes (IBGE, 2015b) e uma área territorial de 2.218,943 km<sup>2</sup> (IBGE, 2016a). A capital está localizada na região central do Estado do Tocantins (10°09'48" de latitude sul e 48°21'04" de longitude oeste) (IBGE, 2015a; Figura 3). Os municípios limítrofes (Figura 4) são Aparecida do Rio Negro, Novo Acordo, Lajeado, Tocantínia e Miracema do Tocantins ao norte; Monte do Carmo e Porto Nacional ao sul; Santa Tereza e Novo Acordo a leste

e Porto Nacional e Miracema do Tocantins a oeste; e o acesso ao município pode ser feito pela TO-010, TO-030, TO-050 e TO-080.

**Figura 3** - Localização do Estado do Tocantins e do município de Palmas (área destacada).



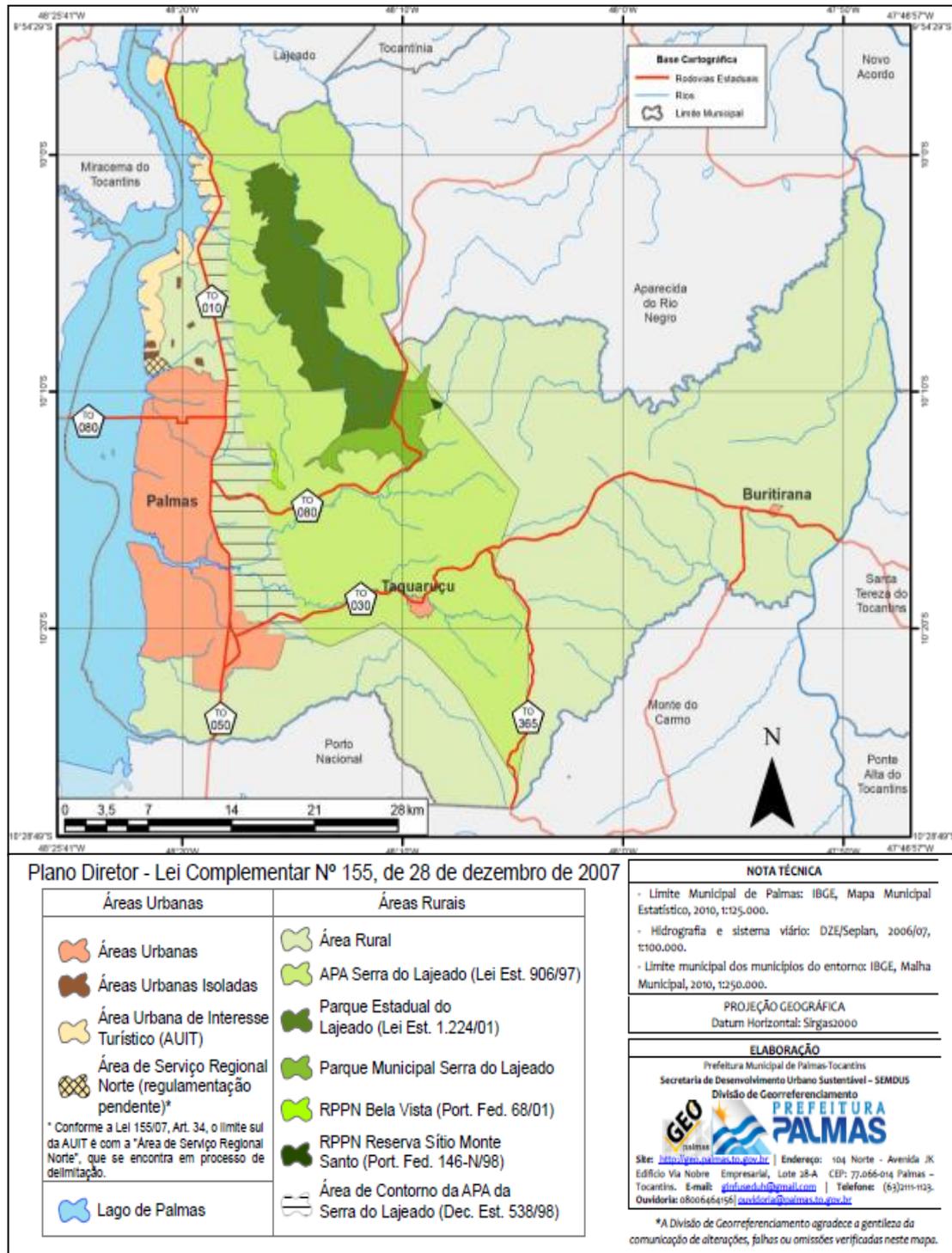
Fonte: IBGE (2013); IBGE (2016b).

O clima de Palmas é do tipo úmido subúmido (C2wa'a"), apresentando moderada deficiência hídrica no inverno (SEPLAN, 2012). A temperatura média de Palmas é de 28°C e a precipitação média anual varia de 1.600 a 1.700 mm; o ribeirão Taquaruçu Grande, o córrego Brejo Comprido e o ribeirão Água Fria têm destaque na hidrografia da área da cidade; a cobertura natural do solo é de vários tipos: Cerrado Sentido Restrito Ralo e Rupestre, Cerrado Sentido Restrito Denso e Típico, Cerradão, Mata Ciliar e de Galeria; os solos são do tipo latossolo vermelho-amarelo (GeoPalmas, 2015a) e as formas de relevo presentes são: Depressão do Médio Tocantins e Planalto Dissecado do Tocantins (IBGE, 2007).

Taquaruçu é considerado distrito de Palmas e está inserido na APA Serra do Lajeado (Figura 4). Localiza-se entre os paralelos 10°10'33" e

10°25'18" de latitude sul e os meridianos 48°03'57" e 48°23'03" de longitude oeste e tem uma área total de 639 km<sup>2</sup> (SEMARH, 2002).

**Figura 4** - Macrozoneamento e zonas especiais de interesse ambiental e turístico.



Fonte: GeoPalmas (2015b).

Em 2010, a população desse distrito era de 4.739 habitantes (InstitutoPólís, 2015). Limita-se ao Norte com Lajeado e Tocantínia, ao Sul com Porto Nacional e Monte do Carmo, a Leste com Aparecida do Rio Negro, Novo Acordo e Santa Tereza do Tocantins; e a oeste com Porto Nacional e Miracema do Tocantins (Figura 4). E sua ligação a Palmas se faz por meio da TO-030. A distância de Taquaruçu ao centro de Palmas é de 40 km (InstitutoPólís, 2015).

O clima de Taquaruçu também é do tipo úmido subúmido, apresentando moderada deficiência hídrica no inverno (C2wA'a''); apresenta temperatura média de 27°C e precipitação média anual de 1.600 mm; a cobertura natural do solo é de dois tipos: Cerrado Sentido Restrito Denso e Típico e Palmeiral e Mata de Galeria e os solos são do tipo concrecionários (GeoPalmas, 2015a). O distrito é banhado por inúmeros cursos d'água, entre eles estão o ribeirão Taquaruçu Grande, o ribeirão Taquarussuzinho e o ribeirão São João (SEMARH, 2002). Seu relevo é do tipo Planalto Dissecado do Tocantins (IBGE, 2007).

## **4.2 Caracterização dos sítios amostrais**

No centro de Palmas, as coletas de flebotomíneos ocorreram em dois fragmentos de mata de galeria localizadas ao longo do córrego Brejo Comprido e em UDs adjacentes (Figura 5) situadas nas quadras 105 Norte e 105 Sul.

Em Taquaruçu, os flebotomíneos foram coletados em dois fragmentos de mata de galeria localizados ao longo do ribeirão Taquarussuzinho e também em UDs próximas (Figura 6) localizadas na TO 030, na Rua 29A (Quadra 89), na Avenida Sete, na Rua 05 e na Rua 05 B (Quadra 6A) do referido distrito.

Os sítios amostrais de captura dos fragmentos de matas de galeria foram escolhidos a partir de transectos de referência.

**Figura 5** - Mata de Galeria (A) e Unidade Domiciliar (B) em Palmas.



Fonte: o autor.

**Figura 6** - Mata de Galeria (A) e Unidade Domiciliar (B) em Taquaruçu.



Fonte: o autor.

Em cada fragmento de mata de galeria do centro de Palmas (fragmento 01 - próximo ao Capim Dourado (cd) Shopping) e fragmento 02 (próximo ao Ecológico (Eco) Restaurante) e do distrito de Taquaruçu (fragmento 01 (ta) e fragmento 02 (tb) foi traçado um transecto de 1.000 metros e foram escolhidos 20 sítios amostrais em cada um deles (Figuras 7-10). Também foram amostradas 10 casas adjacentes aos fragmentos florestais de cada uma das áreas estudadas, tanto no centro de Palmas quanto em Taquaruçu (Figuras 11-14).

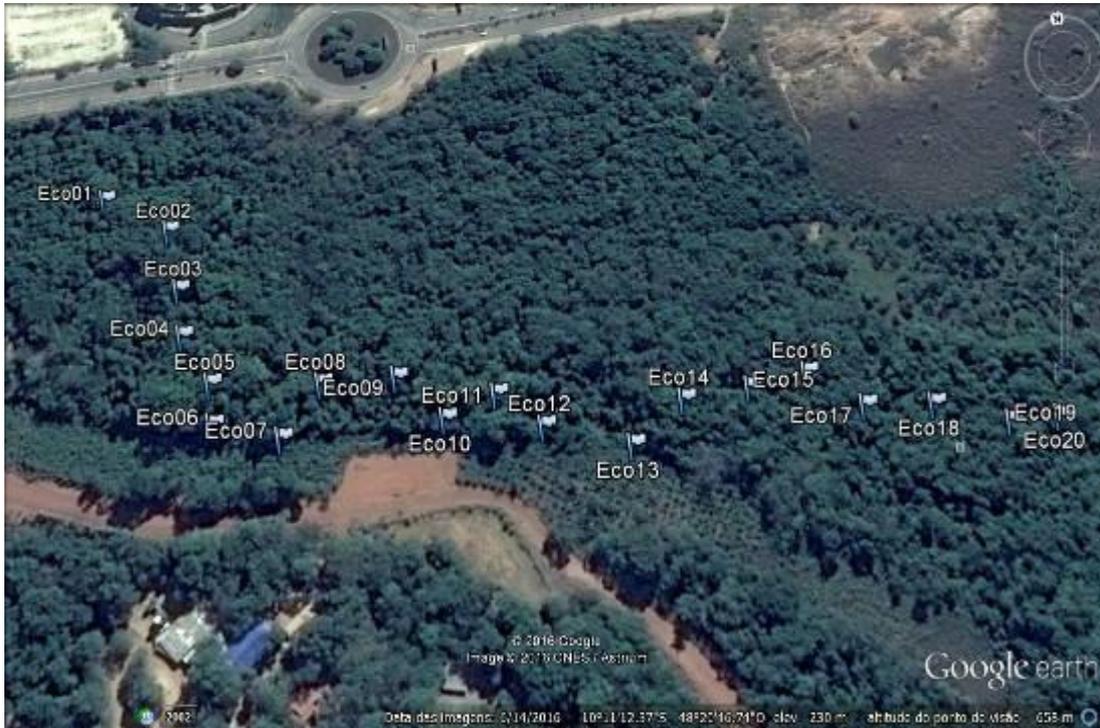
Os sítios amostrais de captura dos fragmentos de matas de galeria escolhidos foram identificados com uma fita zebraada e georreferenciados para facilitar sua localização, havendo uma distância mínima de 50 metros entre eles. Em cada um deles havia ambientes favoráveis à reprodução e ao desenvolvimento dos flebotomíneos, como solo rico em matéria orgânica, raízes expostas da vegetação e folhas caídas, e a proximidade das UDs a esses fragmentos também foi critério para seleção dos sítios.

**Figura 7** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 01 em Palmas/TO.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 06 de 2016.

**Figura 8** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 02 em Palmas/TO.



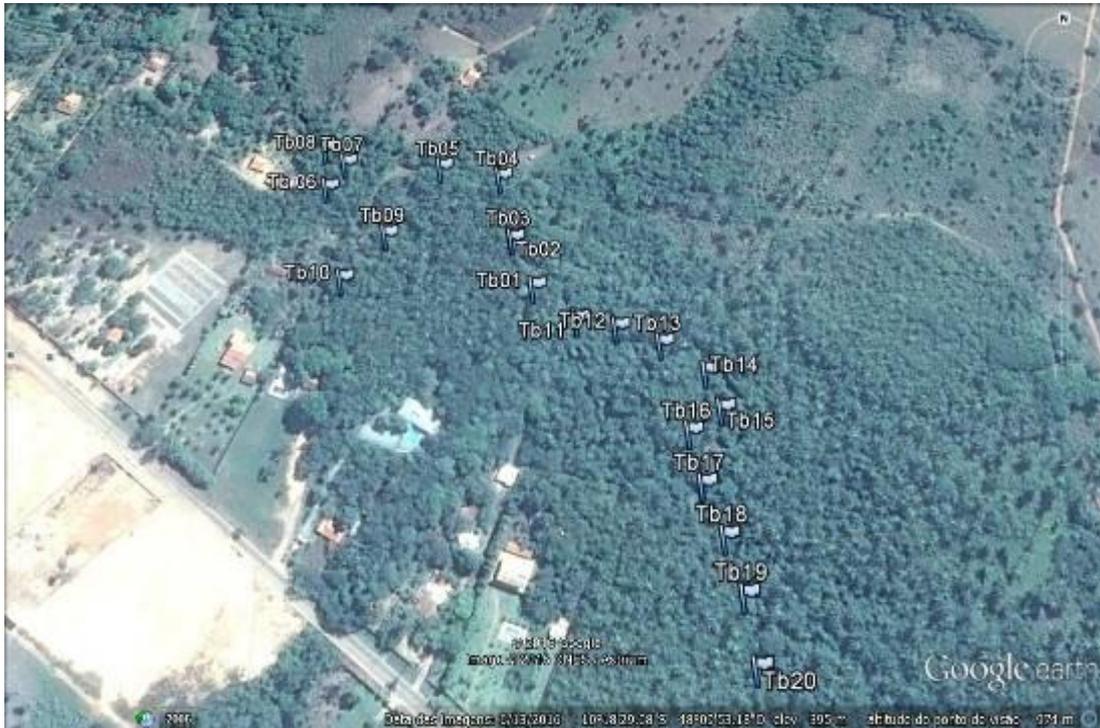
Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 06 de 2016.

**Figura 9** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 01 em Taquaruçu/TO.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 06 de 2016.

**Figura 10** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos no fragmento de mata de galeria 02 em Taquaruçu/TO.



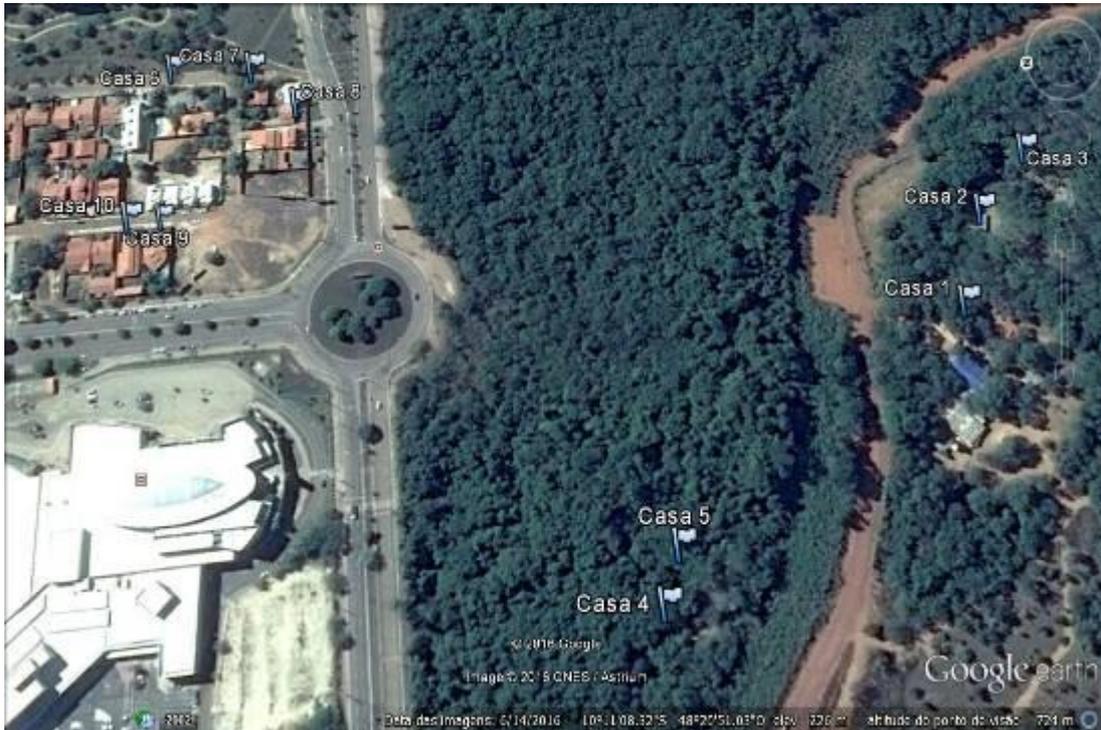
Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 06 de 2016.

**Figura 11** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 01 em Palmas/TO.



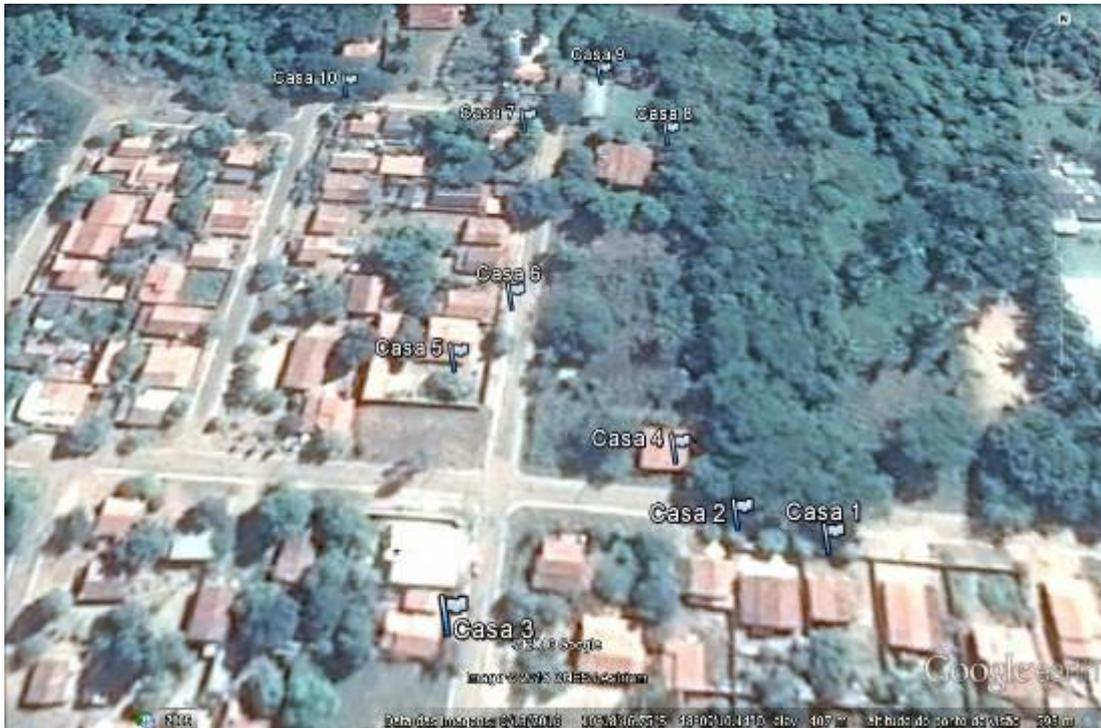
Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 6 de 2016.

**Figura 12** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 02 em Palmas/TO.



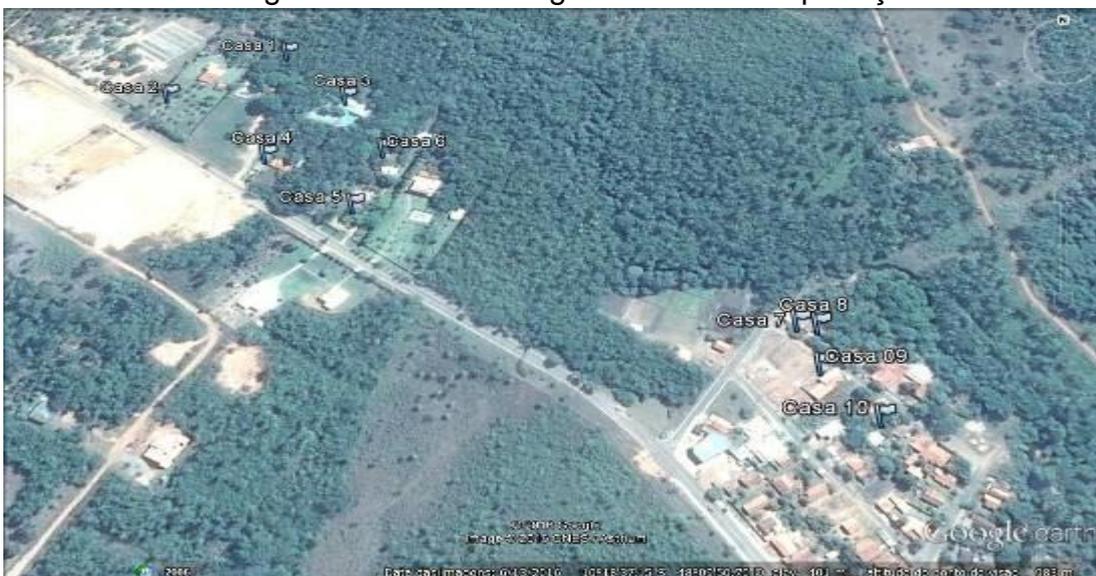
Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 6 de 2016.

**Figura 13** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 01 em Taquaruçu/TO.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 6 de 2016.

**Figura 14** - Sítios amostrais de coleta de flebotomíneos nas casas próximas ao fragmento de mata de galeria 02 em Taquaruçu/TO.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir de imagem de satélite do Google Earth em 6 de 2016.

A seleção das 20 UD's adjacentes aos fragmentos de matas de galeria nas duas áreas do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu (Figuras 11-14) ocorreu a partir da aceitação do (a) responsável pelo domicílio em participar da pesquisa. Na maioria das UD's do centro de Palmas, havia árvores e vasos com plantas, folhas caídas no solo e animais como cães, o que as tornam ambientes propícios para proliferação dos flebotomíneos e seu desenvolvimento. Nas UD's de Taquaruçu, também havia árvores, vasos com plantas e folhas caídas no solo, porém, além de cães, também estavam presentes galinhas, o que também favorece a proliferação e o desenvolvimento dos flebotomíneos.

### **4.3 Coleta e identificação dos flebotomíneos**

As coletas dos flebotomíneos foram realizadas no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu (em duas matas de galeria por localidade e UD's adjacentes) em dois períodos climáticos diferentes (julho e novembro de 2014) e para tal procedimento utilizou-se de armadilhas luminosas

denominadas HP (Pugedo et al., 2005) e armadilhas de Shannon (Shannon, 1939) (Figura 15). As armadilhas HP, alimentadas com pilhas alcalinas Duracell® de 1,5 volts, foram instaladas a uma altura de aproximadamente 1,5 metros e ficaram expostas por 12 horas a partir do crepúsculo vespertino. Enquanto a armadilha de Shannon (com isca luminosa) era fixada a arbustos ou árvores por meio de barbantes durante um período de aproximadamente 3 horas, e as capturas eram feitas com auxílio de uma lanterna e de um capturador de castro, também a partir do crepúsculo vespertino.

**Figura 15** - Tipos de armadilhas HP (à esquerda) e Shannon com isca luminosa (à direita).



Fonte: o autor.

As capturas dos flebotomíneos nos fragmentos de matas de galeria e nas UDS do centro de Palmas eram realizadas consecutivamente, assim como no distrito de Taquaruçu. Uma armadilha HP foi instalada em cada sítio amostral do fragmento de mata de galeria e duas armadilhas HPs foram instaladas em cada UD (uma no intradomicílio e outra no peridomicílio). Em cada sítio amostral de captura com a armadilha HP, foram feitas três repetições de coleta (três dias consecutivos de amostragem). Já a armadilha de Shannon com isca luminosa foi instalada em cada fragmento de mata de galeria ao final do terceiro dia de coleta, e as capturas duraram em torno de três horas por noite (das 18 às 21 horas). Durante as coletas, foram registrados os dados relativos à taxa de umidade e à temperatura da localidade em estudo por meio de um termohigrômetro.

Após cada coleta, os flebotomíneos capturados foram retirados das armadilhas para a triagem e sexagem. Os machos e as fêmeas não ingurgitadas (sem a presença de sangue no tubo digestório) foram sacrificados com éter e acondicionados em eppendorf contendo álcool a 70%, e posteriormente foram montados e identificados. Enquanto as fêmeas ingurgitadas foram sacrificadas de igual modo e conservadas, individualmente, em eppendorf contendo álcool a 70%.

Os flebotomíneos machos foram montados em Bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula; a identificação específica foi de acordo com Galati (2003, 2016b) e para a abreviação dos gêneros foi utilizada a proposta de Marcondes (2007).

Na montagem das lâminas das fêmeas, as mesmas foram dissecadas: a cabeça e a porção final do abdome (três últimos segmentos) foram separados do corpo e foram clarificados segundo Forattini (1973). Posteriormente, essas estruturas foram montadas entre lâmina e lamínula. O restante do corpo (tórax, parte do abdome, asas e pernas) foi destinado para extração de DNA e realização das PCRs, diferentemente das fêmeas ingurgitadas que não foram dissecadas para a realização de tais análises moleculares.

#### **4.4 Extração de DNA de flebotomíneos**

Parte do abdômen das fêmeas não ingurgitadas foi agrupado em “pools” (de 2 a 10 espécimes cada) de acordo com a espécie, local de captura e data da coleta. Cada pool foi transferido para um eppendorf estéril de 1,5 mL com 50 µL de PBS 1X, onde era macerado por meio das pontas de ponteiros individuais, sendo que as mesmas eram queimadas em lamparina e abauladas para facilitar a extração de DNA. O mesmo procedimento foi adotado para cada fêmea ingurgitada, porém, neste caso, todo o corpo era utilizado na extração. A extração de DNA foi realizada usando o Kit Illustra™ Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare, Piscataway, NJ,

EUA). As amostras permaneceram em proteinase K a 37°C durante a noite, e as etapas seguintes foram realizadas de acordo com as normas recomendadas pelo fabricante (ANEXO B). As amostras de DNA foram quantificadas no *NanoVue™ Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Após isto, tais amostras foram acondicionadas a -20°C até a realização das PCRs.

#### 4.5 PCR Cacophany

Para verificar a qualidade do DNA extraído foi feita a detecção do gene *cacophany* da região IVS6 de flebotomíneos a partir de uma PCR, usando os iniciadores específicos dessa região: *primer* forward Llac 5'-GTGGC-CGAACATAATGTTAG-3' e *primer* reverse Llac 5'-CCACGAACAAGT-TCAACATC-3' (Lins et al., 2002). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL: 2,5 µL de tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de solução de dNTPs (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA); 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 U de Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, São Paulo, S.P., Brasil) e 3 µL de DNA das amostras (5 ng/µL).

As reações de amplificação dos fragmentos foram realizadas no termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, Santo Amaro, S.P., Brasil) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamento (57°C por 30 segundos), extensão (72°C por 30 segundos), extensão final (72°C por 10 minutos) e manutenção (4°C por tempo ∞). O controle positivo (DNA de *Phlebotominae*) e a amostra em branco (sem DNA) foram incluídos.

Os fragmentos amplificados foram separados por intermédio de eletroforese em gel de agarose a 1.3%, corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e em tampão TAE (90 mM Tris-acetate, pH 8.0, 25 mM EDTA). Depois da corrida do gel, as bandas foram visualizadas por meio de um Alpha Imager R Mini System (Alpha Innotech, San Leandro, Califórnia, EUA).

#### 4.6 “Nested” SSU rDNA18S PCR

Com o DNA extraído de flebotomíneos, foi feita a PCR com os iniciadores *primer* forward S4 (5'-GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC-3') e *primer* reverse S12 (5'-GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC-3') que detectam a infecção dos flebotomíneos por tripanossomatídeos e que servem para amplificar a região SSU rDNA (Uliana et al., 1994). A primeira reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 µL: 2,5 µL de tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de solução de dNTPs (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA); 0,75 µM de cada iniciador, 1,5 U de Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, São Paulo, S.P., Brasil), 14,5 µL de água (Milli-Q®) e 3 µL de DNA das amostras (10 ng/µL).

As reações foram realizadas no termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, Santo Amaro, S.P., Brasil) e seguiram o seguinte programa: um ciclo inicial de desnaturação (94°C por 3 minutos), seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (58°C por 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto), extensão final (72°C por 7 minutos) e manutenção (4°C por tempo ∞). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese como descrito acima.

Após a diluição do produto da primeira reação de SSU-PCR (fragmento de 520 pb), foi realizada a Nested PCR com o *primer* forward S17: 5'-CCA AGC TGC CCA GTA GAAT-3' e o *primer* reverse S18: 5'-TCG GGC GGA TAA AAC CC-3' (Savani et al., 2009), nas mesmas condições descritas para a primeira reação. O produto da primeira PCR foi diluído em água na proporção 1:10 e 2 µL do mesmo foram utilizados para a realização da nested PCR. Nesta PCR, as reações foram preparadas em um volume final de 25 µL: 2,5 µL de tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de solução de dNTPs (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA); 0,75 µM de cada iniciador, 1,5 U de Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, São Paulo,

S.P., Brasil) e 17,5 µL de água (Milli-Q®). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,3%.

Os controles negativos foram DNA de camundongos não infectados. Os controles positivos utilizados nessas reações foram amostras de DNA dos parasitos extraídas de cultura, sendo elas Lb. (*L. braziliensis*), Li. [*L. infantum* (syn. *L. chagasi* – *Lc.*)] e Tc. (*Trypanosoma cruzi*).

#### **4.7 PCR dirigida à região espaçadora interna do DNA ribossômico (ITS) 1 de *Leishmania***

As amostras que apresentaram amplificação para a PCR SSU rDNA18S foram submetidas à PCR orientada para a região espaçadora interna do gene de RNA ribossomal 1 (ITS-1) de *Leishmania* spp., com fragmento que varia entre 302 e 338 pb, a partir dos *primers*: LITS1 - 5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3' e L5.8S - 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3' (El Tai et al., 2000).

A reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL: 2,5 µL de tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1,0 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de solução de dNTPs (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA); 0,25 µM de cada iniciador, 1,5 U de Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, São Paulo, S.P., Brasil) e 5 µL of DNA (20 ng/ µL).

O ciclo da PCR foi realizado em um termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, Santo Amaro, S.P., Brasil) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamento (58°C por 30 segundos), extensão (72°C por 30 segundos), extensão final (72°C por 5 minutos) e manutenção a 4°C por tempo ∞. Os controles foram os mesmos do item 4.6, com exceção do Tc. (*T. cruzi*).

O produto dessa PCR foi re-amplificado para aumentar a quantidade de produto amplificado. Um total de 2 µL do produto da primeira PCR foi diluído na proporção de 1:10 e com 2 µL dessa diluição foi feita a segunda

PCR, usando os mesmos *primers*: LITS1 e L5.8S, os mesmos reagentes e a padronização de amplificação nas mesmas condições. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese como descrito acima.

#### **4.8 Preparação dos produtos da PCR para sequenciamento**

Os fragmentos amplificados em todas as PCRs foram purificados por meio do kit Illustra™ GFX PCR DNA e do Kit Gel Band Purification (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), segundo orientações do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados usando *NanoVue™ Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e na sequência foi feita a eletroforese em gel de agarose a 1,3%, corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e em tampão TAE (90 mM Tris-acetate, pH 8,0, 25 mM EDTA). Após a corrida no gel, as bandas foram visualizadas usando um Alpha Imager R Mini System (Alpha Innotech, San Leandro, Califórnia, EUA).

Após a purificação, os produtos de PCR obtidos foram diluídos na concentração mínima de 30 ng/μL de H<sub>2</sub>O destilada, e juntos com 1 μL do *primer* S17 na concentração de 3,2 μM, foram encaminhados para o sequenciamento comercial a fim de se identificar as espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos.

#### **4.9 Sequenciamento e análises das sequências**

As reações de sequenciamento para identificação das espécies de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos foram realizadas pelo Centro de Pesquisa de Genomas Humanos e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP). Os produtos de sequenciamento foram analisados pelo software Sequencing Analysis 5.3.1, utilizando o Base Caller KB. Após isto, foi feita a edição das sequências por meio do software Genious (Biomatters, Auckland, New Zealand) e, em seguida, as mesmas foram comparadas com

as sequências de espécies de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos depositadas no GenBank, utilizando-se do algoritmo BLAST<sub>n</sub> (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os parasitos foram identificados considerando 78% a 100% de identidade com as sequências depositadas no GenBank.

#### **4.10 Caracterização ambiental das unidades domiciliares (UDs) do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu, Tocantins**

Para coletar os dados de caracterização ambiental das UD's adjacentes às matas de galeria do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu, foi elaborado um formulário semiestruturado (APÊNDICE A), o qual foi posteriormente utilizado para se fazer o levantamento de dados gerais do domicílio e avaliação de características da unidade domiciliar.

Na caracterização domiciliar, foi feito o levantamento da estrutura do intradomicílio, do peridomicílio e da circunvizinhança das UD's, a exemplo das características domiciliares (tipo de parede, tipo de piso, tipo de teto, quantidade de janelas, eletricidade, lixo, esgoto e aplicação de inseticida) e peridomiciliares (vasos com plantas, hortas, árvores, entulho, matéria orgânica, presença de animais como cães e galinhas, distância de cursos d'água, ruas não pavimentadas, terrenos baldios, proximidade de vegetação natural e pastagens) a fim de se analisar o perfil ambiental de cada UD.

#### **4.11 Análise dos dados**

Para verificar diferenças na proporção de armadilhas positivas entre períodos do ano (julho e novembro), habitats (matas de galeria e UD's) e localidades (Palmas e Taquaruçu), foram realizados testes exatos de Fisher usando o software Graphpad. Diferenças na proporção de "pools" de flebotomíneos positivos para *Leishmania* entre habitats e entre localidades

também foram verificadas pelo teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

Os dados de caracterização ambiental foram tabulados no Excel (2016) para se fazer a análise descritiva das informações referentes à caracterização ambiental das UDs.

## 5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em três seções: Ocorrência de flebotomíneos em matas de galeria e unidades domiciliares no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu no município de Palmas (TO); Ocorrência de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos em flebotomíneos no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu, Tocantins; Caracterização ambiental das unidades domiciliares (UDs) próximas a fragmentos de mata de galeria do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu, Tocantins.

### 5.1 Ocorrência de flebotomíneos em matas de galeria e unidades domiciliares no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu no município de Palmas, Tocantins.

Um total de 1.527 flebotomíneos (738 nas unidades domiciliares e 789 nos fragmentos de matas de galeria) distribuídos em 30 espécies e 11 gêneros. Devido ao dano causado em alguns espécimes, tanto machos quanto fêmeas, estes foram identificados somente em nível de subtribo ou gênero, sendo que gênero, subgênero e identificações de subtribos não foram considerados para o número de espécies registradas. Entre as espécies capturadas, uma delas (*Pa. campograndensis*) foi observada pela primeira vez no Estado do Tocantins. A riqueza de espécies foi maior no distrito de Taquaruçu (n= 24 espécies) que na área central de Palmas (n= 22 espécies) (Tabela 3).

Somando as duas áreas e períodos de coleta, a espécie mais abundante foi *Ny. whitmani* (50,6%), seguida por *Evandromyia carmelinoi* (7,53%), *Bi. flaviscutellata* (7,27%), *Pa. hermanlenti* (6,8%), *Lu. longipalpis* (6,2%) e *Ev. walkeri* (4,5%). As demais espécies representaram 15% do total de flebotomíneos capturados (Tabela 3). Quinze espécies foram comuns em

ambas localidades. Seis espécies ocorreram somente no centro de Palmas e nove espécies foram exclusivas do distrito de Taquaruçu (Tabela 3).

**Tabela 3** - Total de flebotomíneos coletados com HP e Shannon nas duas áreas amostradas, centro e distrito de Taquaruçu, no município de Palmas em julho (mês seco) e novembro (mês chuvoso) de 2014.

Espécies	Centro		Taquaruçu		Total geral
	Seca	Chuva	Seca	Chuva	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	44	3	62	2	111
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	2	0	2
<i>Brumptomyia</i> sp.	1	0	6	2	9
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	19	22	15	59	115
<i>Evandromyia evandroi</i>	1	0	2	11	14
<i>Evandromyia lenti</i>	5	2	1	24	32
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	6	13	19
<i>Evandromyia saulensis</i>	7	1	0	0	8
<i>Evandromyia termitophila</i>	3	2	0	4	9
<i>Evandromyia walkeri</i>	15	35	8	11	69
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	31	54	6	4	95
<i>Micropygomyia longipennis</i>	5	2	2	2	11
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	3	4	0	11	18
<i>Micropygomyia</i> sp.	0	0	1	0	1
<i>Micropygomyia villelai</i>	3	0	2	0	5
<i>Nyssomyia antunesi</i>	0	5	0	0	5
<i>Nyssomyia whitmani</i>	177	216	323	57	773
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	16	4	20
<i>Pintomyia damascenoi</i>	0	0	1	0	1
<i>Pressatia choti</i>	0	0	7	1	8
<i>Pressatia</i> sp.	0	0	2	0	2
<i>Psathyromyia abonnenci</i>	1	0	0	0	1
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0	22	4	26
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	2	0	0	2
<i>Psathyromyia campbelli</i>	1	0	0	0	1
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	3	2	5
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	24	3	78	0	105
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	2	6	0	8
<i>Psathyromyia pradobarrientosi</i>	1	0	4	0	5
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	1	0	0	0	1
<i>Psathyromyia (Psathyromyia)</i> sp.	0	1	13	1	15
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	1	3	4
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	0	0	1	0	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	4	3	13	5	25
Subtribe Lutzomyina	0	1	0	0	1
<b>Total Geral</b>	<b>346</b>	<b>359</b>	<b>603</b>	<b>219</b>	<b>1527</b>

Em ambos os períodos do ano, foi confirmada a presença de espécies vetores tanto nos fragmentos de matas quanto nas UD's do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu. Entretanto, os flebotomíneos foram mais

frequentes nas UD's em novembro (mês chuvoso) e nos fragmentos de matas em julho (mês seco), como mostrado nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** - Flebotomíneos registrados em três ambientes nas duas áreas amostradas, centro e distrito de Taquaruçu, no município de Palmas (TO) em julho (mês seco) de 2014.

Espécies	Centro			Taquaruçu			Total Geral
	Intra	Peri	mata	Intra	Peri	mata	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0	0	44	0	1	61	106
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	0	1	0	1	2
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	1	0	0	6	7
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	8	7	4	0	15	0	34
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	1	0	0	2	3
<i>Evandromyia lenti</i>	1	1	3	0	1	0	6
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	0	0	3	3	6
<i>Evandromyia saulensis</i>	0	0	7	0	0	0	7
<i>Evandromyia termitophila</i>	2	1	0	0	0	0	3
<i>Evandromyia walkeri</i>	0	1	14	0	0	8	23
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	19	10	2	0	5	1	37
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	0	5	1	1	0	7
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	0	0	3	0	0	0	3
<i>Micropygomyia</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
<i>Micropygomyia vilhelai</i>	1	1	1	0	1	1	5
<i>Nyssomyia whitmani</i>	17	13	147	4	30	289	500
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	1	0	15	16
<i>Pintomyia damasceni</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Pressatia choti</i>	0	0	0	0	4	3	7
<i>Pressatia</i> sp.	0	0	0	0	0	2	2
<i>Psathyromyia abbonenci</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0	0	0	1	21	22
<i>Psathyromyia campbelli</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	0	0	0	3	3
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	9	2	13	1	6	71	102
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	0	0	1	0	5	6
<i>Psathyromyia pradobarrientosi</i>	0	0	1	0	0	4	5
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia (Psathyromyia) sp.</i>	0	0	0	2	2	9	13
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	0	2	4	4	5	17
<b>Total Geral</b>	<b>61</b>	<b>37</b>	<b>248</b>	<b>15</b>	<b>74</b>	<b>514</b>	<b>949</b>

**Tabela 5** - Flebotomíneos registrados em três ambientes nas duas áreas amostradas, centro e distrito de Taquaruçu, do município de Palmas (TO) em novembro (mês chuvoso) de 2014.

Espécies	Centro			Taquaruçu			Total Geral
	Intra	Peri	mata	Intra	Peri	mata	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0	1	2	0	1	1	5
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	0	0	2	0	2
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	2	18	2	1	56	2	81
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	0	0	11	0	11
<i>Evandromyia lenti</i>	0	1	1	2	22	0	26
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	0	2	11	0	13
<i>Evandromyia saulensis</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	2	0	0	4	0	6
<i>Evandromyia walkeri</i>	9	22	4	3	6	2	46
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	12	44	0	0	2	0	58
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	0	2	2	0	0	4
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	2	2	0	6	4	1	15
<i>Nyssomyia antunesi</i>	0	4	1	0	0	0	5
<i>Nyssomyia whitmani</i>	4	212	0	0	56	1	273
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	0	4	0	4
<i>Pressatia choti</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Psathyromyia (Psathyromyia) sp.</i>	0	1	0	0	1	0	2
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0	0	0	3	1	4
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	2	0	0	0	0	2
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	1	2	0	0	0	0	3
<i>Psathyromyia lutziana</i>	2	0	0	0	0	0	2
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	0	0	0	3	3
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	2	0	2	3	0	8
Subtribe Lutzomyina	0	0	1	0	0	0	1
<b>Total Geral</b>	<b>33</b>	<b>314</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>186</b>	<b>14</b>	<b>578</b>

No total, 285 das 960 armadilhas HPs instaladas estavam positivas para flebotomíneos, resultando em um sucesso de captura de 29,7%. Foram capturados flebotomíneos em ambos os meses de estudo e nos quatro fragmentos de matas amostradas, utilizando as barracas Shannon (n=6,75% de sucesso de captura).

Considerando a amostragem com as armadilhas HP, houve diferença estatisticamente significativa na proporção de armadilhas positivas para

flebotomíneos entre os meses de captura (julho=44,3%; novembro=15%), entre habitats (UDs=23,3%; Mata=36%) e entre as localidades (distrito de Taquaruçu=33,5%; centro de Palmas=25,8%). O maior sucesso de captura de flebotomíneos foi obtido nos fragmentos de matas no mês de julho (63,3%), resultado muito superior ao obtido nos fragmentos de matas em novembro (8,7%). Nas UD's a proporção de armadilhas positivas entre julho e novembro foi mais similar, 25,4% e 21,2% respectivamente.

Em julho, a abundância relativa de flebotomíneos foi maior nos fragmentos de matas de galeria que nas UD's (85,2% x 24,8% no distrito de Taquaruçu e 71,7% x 28,3% no centro de Palmas). A riqueza de espécies foi maior em julho tanto no distrito de Taquaruçu quanto no centro de Palmas (20 espécies e 14 espécies, respectivamente) (Tabela 4).

As espécies com maior taxa de ocorrência nos fragmentos de matas de galeria do distrito de Taquaruçu no mês seco foram *Ny. whitmani* (47,9%), *Pa. hermanlenti* (11,8%), *Bi. flaviscutellata* (10,1%), *Pa. aragaoi* (3,5%) e *Pi. christenseni* (2,9%). Como mostrado na Tabela 4, as espécies mais frequentes nos fragmentos de matas de galeria do centro de Palmas nesse período foram *Ny. whitmani* (42,5%), *Bi. flaviscutellata* (12,7%), *Ev. walkeri* (4%) e *Pa. hermanlenti* (3,7%).

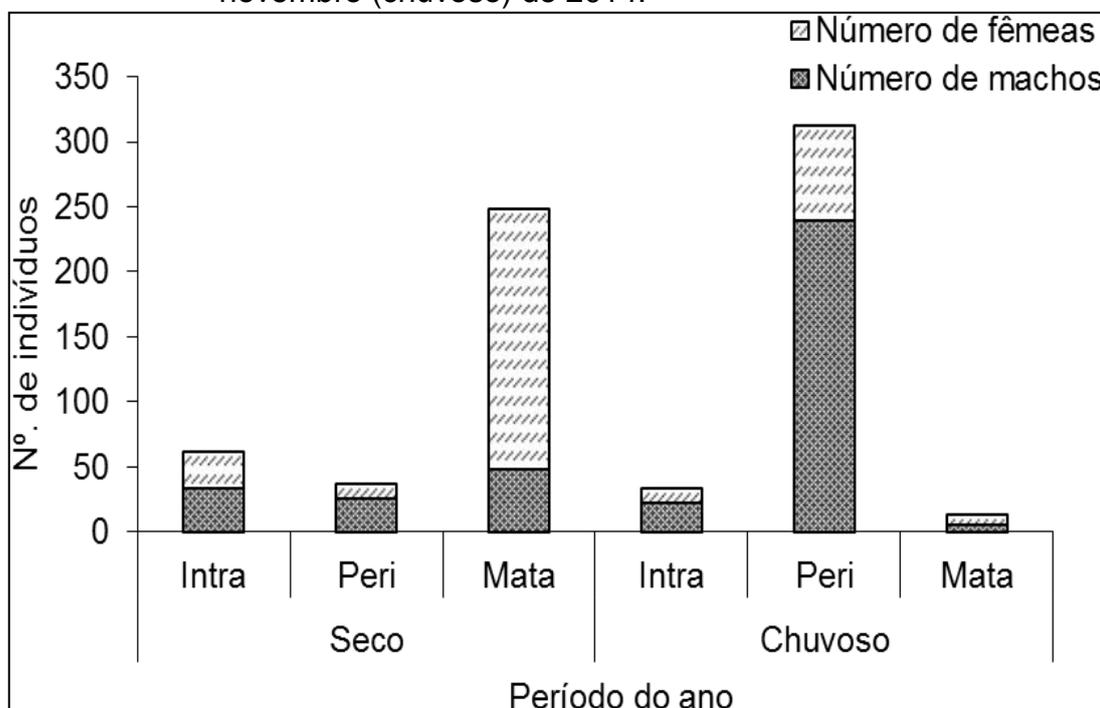
Em novembro, o número e a riqueza de flebotomíneos capturados nos fragmentos de matas de galeria em ambas localidades foram baixos e não foi observada nenhuma espécie em abundância quando se compara ao peridomicílio das mesmas onde a maioria dos flebotomíneos (86,5%) foi encontrada e a riqueza de espécies (n=17) foi a mais elevada. A maioria dos espécimes coletados foi encontrada no peridomicílio do centro de Palmas, e a riqueza de espécies foi a mesma entre os sítios peridomésticos no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu (Tabela 5).

As espécies mais abundantes no peridomicílio do centro de Palmas em novembro foram *Ny. whitmani* (59%), *Lu. longipalpis* (11,9%), *Ev. walkeri* (6,1%) e *Ev. carmelinoi* (5%). Já no peridomicílio do distrito de Taquaruçu, as espécies mais frequentes foram *Ny. whitmani* e *Ev. carmelinoi* (25,6%), *Ev. lenti* (10%), *Ev. sallesi* (5%) e *Ev. evandroi* (4,6%) (Tabela 5).

A razão total entre fêmeas e machos (F/M) foi de 1,61:1. O número de espécimes e espécies de flebotomíneos coletados em julho (949 espécimes e 28 espécies) foi maior que a quantidade de espécimes e espécies de flebotomíneos capturados em novembro (578 espécimes e 22 espécies). Em julho foi capturado um número maior de fêmeas em relação a machos (764 fêmeas e 185 machos, razão = 4.1:1); enquanto que mais machos que fêmeas foram capturados em novembro (180 fêmeas e 398 machos; razão = 0.4:1). No centro de Palmas, uma quantidade maior de machos foi capturada, ao contrário do distrito de Taquaruçu onde as fêmeas predominaram.

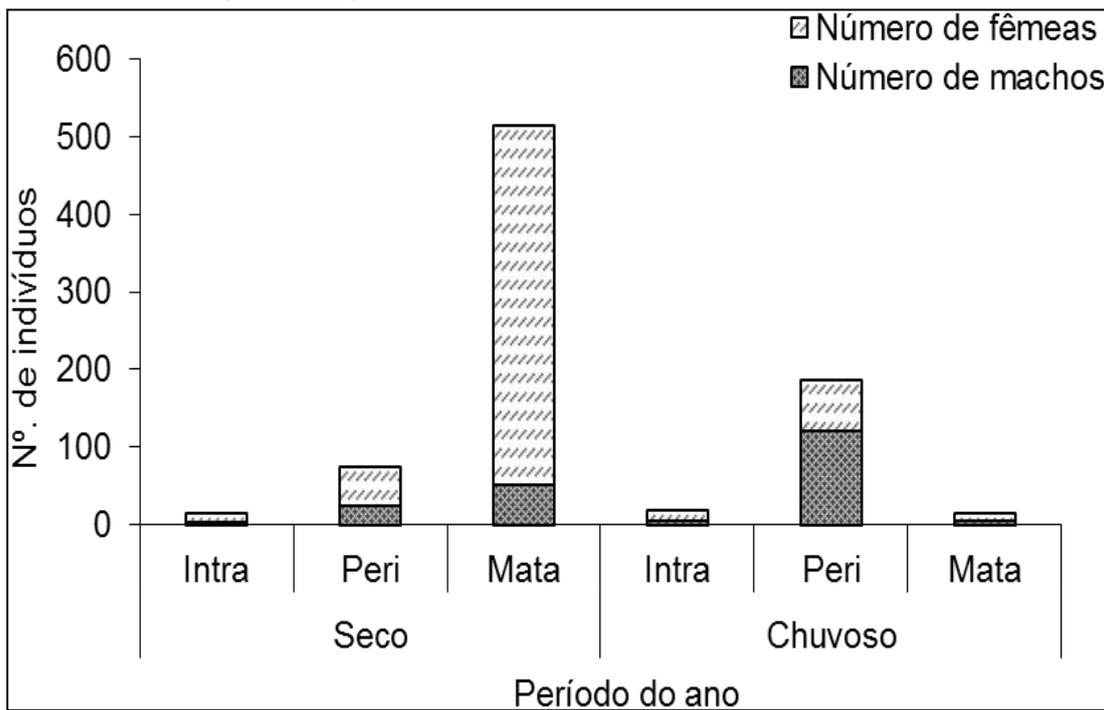
Mais fêmeas foram capturadas nos fragmentos de matas de galeria do centro de Palmas em julho (mês seco), enquanto que mais machos foram capturados no peridomicílio do centro de Palmas em novembro (mês chuvoso) (Figura 16).

**Figura 16** - Abundância de flebotomíneos machos e fêmeas em três ambientes da área central de Palmas em julho (seco) e novembro (chuvoso) de 2014.



Em julho, no distrito de Taquaruçu, também foi observado um maior número de fêmeas nos fragmentos de matas de galeria, diferentemente de novembro, em que foram capturados mais machos no peridomicílio das UDs desse distrito (Figura 17).

**Figura 17** - Abundância de flebotomíneos machos e fêmeas em três ambientes de Taquaruçu em julho (seco) e novembro (chuvoso) de 2014.



## 5.2 Ocorrência de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos em flebotomíneos no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu, Tocantins.

Um total de 752 fêmeas agrupadas em 154 “pools” foram analisadas (Tabela 6 e 7), sendo que foi realizada a detecção do gene cacophony da região IVS6 de flebotomíneos em todos eles. Destes, 15 “pools” exibiram amplificação positiva do gene de SSU (18S) rDNA (Figura 18). E somente um desses “pools” foi positivo na ITS1-PCR. DNA de *Leishmania* spp. foi detectado em “pools” de espécies de flebotomíneos do centro de Palmas e do distrito de Taquaruçu (Tabela 8). Não houve diferenças significativas nas proporções de “pools” positivos de flebotomíneos para *Leishmania* spp. entre tais localidades em julho (Fisher,  $p = 0,74$ ) ou novembro (Fisher,  $p = 1,0$ ). Ao se considerar ambas as localidades: em julho, a proporção de “pools” positivos de flebotomíneos para DNA de *Leishmania* spp. foi de 17,6% nas UD's e 3,7% nos fragmentos de matas e, em novembro, a proporção de “pools” positivos de flebotomíneos para DNA de *Leishmania* spp. foi de 5,8% nas UD's e de 28,5% nos fragmentos de matas. Porém, quando a soma da amostragem em ambos os meses foi considerada, a proporção de “pools” de flebotomíneos positivos para *Leishmania* spp. foi de 14,0% nas UD's e 7,1% nos fragmentos de matas (Fisher,  $p = 0,25$ ).

Em julho, no distrito de Taquaruçu, seis “pools” de *Ny. whitmani* foram encontrados com DNA de tripanossomatídeos: *Leishmania* spp. ( $n = 3$ , mata e UD), *L. amazonensis* ( $n = 2$ , UD) e *Crithidia fasciculata* ( $n = 1$ , mata). Além disso, em um “pool” de *Pi. christenseni* ( $n = 1$ , mata) foi encontrado DNA de *Trypanosoma* sp. (Tabela 8). Nesse mesmo período, foram detectados nesse distrito “pools” de *Lu. longipalpis* ( $n = 1$ , mata) e *Pa. hermanlenti* ( $n = 1$ , UD) com DNA de *L. amazonensis*. Já no centro de Palmas, em julho, foi detectado DNA de *L. infantum* e de *L. amazonensis* em “pools” de *Ny. whitmani* ( $n = 1$ , UD) e de *Lu. longipalpis* ( $n = 1$ , mata), respectivamente (Tabela 8). Em novembro também houve circulação de *L. amazonensis* em Palmas em um “pool” de *Ev. walkeri* (mata) e de *Lu. longipalpis* (UD). E no distrito de

Taquaruçu foi detectada *Leishmania* sp. em *Bi. flaviscutellata* (n = 1, mata) e *L. amazonensis* em *Pi. christenseni* (n= 1, UD) (Tabela 8).

A taxa de infecção mínima de flebotomíneos (número de “pools” positivos/número de fêmeas analisadas x 100) no período chuvoso foi quase duas vezes maior que a do seco. Em julho, no ambiente domiciliar, esta taxa foi aproximadamente 10,4 vezes mais elevada quando se compara à mata. Já no período chuvoso, essa taxa foi quase 11,5 vezes maior na mata quando se compara ao ambiente domiciliar.

**Tabela 6** - Espécimes de flebotomíneos coletados de unidades domiciliares e matas de galeria em Palmas, Tocantins, em julho (mês seco) de 2014 e considerados positivos para infecção com base nos marcadores SSU rDNA e ITS1.

Espécies	Unidades domiciliares				Matas de galeria			
	No.	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR	No.	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	1	1	0	0	74	12	0	0
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	0	0	3	1	0	0
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	15	5	0	0	3	2	0	0
<i>Evandromyia saulensis</i>	0	0	0	0	5	1	0	0
<i>Evandromyia walkeri</i>	0	0	0	0	15	4	0	0
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	8	6	1	0	2	2	1	0
<i>Micropygomyia vellelai</i>	3	3	0	0	0	0	0	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	30	14	4	1	380	42	3	0
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	0	11	2	1	0
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0	0	0	4	1	0	0
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	4	3	1	0	59	9	0	0
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	0	0	2	1	0	0
<i>Sciopemyia sordellii</i>	4	2	0	0	4	2	0	0
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>34</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>562</b>	<b>79</b>	<b>5</b>	<b>0</b>

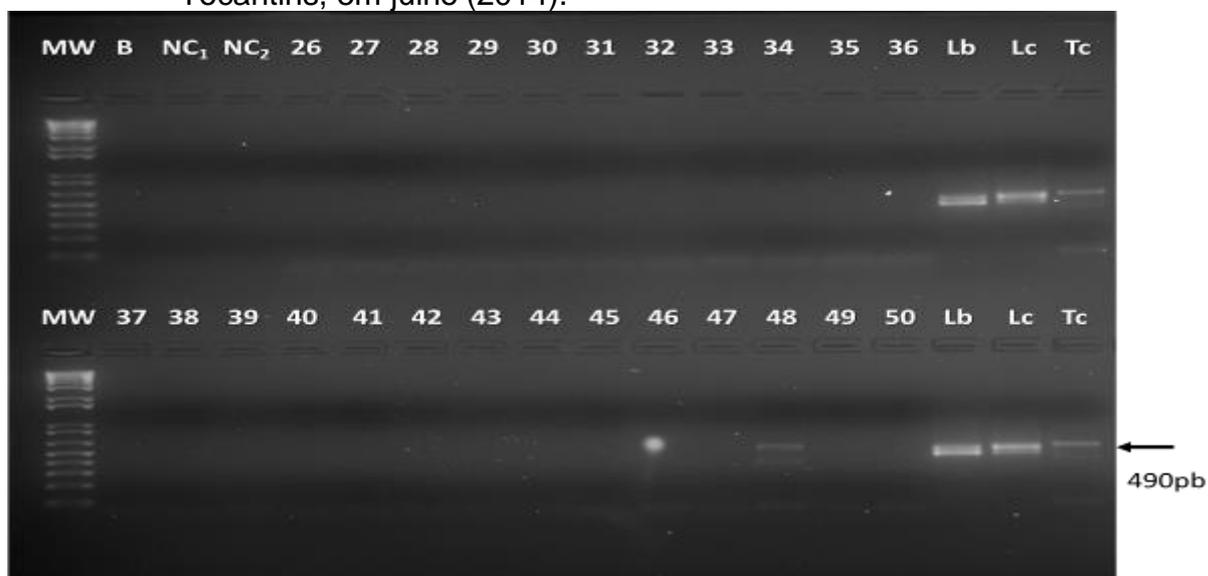
No. = número de espécimes

**Tabela 7** - Espécimes de flebotomíneos coletados de unidades domiciliares e matas de galeria em Palmas, Tocantins, Brasil, em novembro (mês chuvoso) de 2014 e considerados positivos para infecção com base nos marcadores SSU rDNA e ITS1.

Espécies	Unidades domiciliares				Matas de galeria			
	No.	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR	No.	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0	0	0	0	2	2	1	0
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	25	6	0	0	2	1	0	0
<i>Evandromyia evandroi</i>	5	1	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia lenti</i>	5	2	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia sallesi</i>	3	1	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia termitophila</i>	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia walkeri</i>	10	6	0	0	2	1	1	0
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	10	3	1	0	0	0	0	0
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	4	2	0	0	0	0	0	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	48	9	0	0	1	1	0	0
<i>Pintomyia christenseni</i>	3	3	1	0	0	0	0	0
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	0	0	2	1	0	0
<i>Psychodopygus davisi</i>	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>Total</b>	<b>115</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

No. = número de espécimes

**Figura 18** - Gel de agarose a 1,3% corado pelo brometo de etídeo, mostrando os produtos amplificados da reação de PCR com alvo na região S4 e S12 do gene SSU rDNA18S de tripanossomatídeos em amostras de fêmeas capturadas no município de Palmas, Tocantins, em julho (2014).



MM – marcador molecular. Ø: branco. CN<sub>1</sub> - controle negativo. A seta indica a amostra positiva: 48. Amostras negativas: 26-46 e 49-50. Controle positivo: Lb, Lc e Tc.

A taxa de infecção mínima de *Ny. whitmani* por *Leishmania* spp., *L. amazonensis* e *C. fasciculata* no distrito de Taquaruçu foi 7,5%, 5% e 2,5%, respectivamente. Já a taxa de infecção mínima de *Lu. longipalpis* por *L. amazonensis* para esse distrito foi 14,2%. No centro de Palmas, a taxa de infecção mínima de *Ny. whitmani* por *L. infantum* foi 3,8% e de *Lu. longipalpis* por *L. amazonensis* foi 28,6%.

Em julho, a taxa de infecção mínima de *Ny. whitmani* por *L. amazonensis* em UDs do distrito de Taquaruçu e por *L. infantum* em uma UD de Palmas foram 7% e 3%, respectivamente. Num fragmento de mata do distrito de Taquaruçu, a taxa de infecção mínima de *Lu. longipalpis* por *L. amazonensis* foi 50%. Em novembro (mês chuvoso), nenhum espécime de *Ny. whitmani* infectado por *Leishmania* foi encontrado. A taxa de infecção mínima de *Lu. longipalpis* por *L. amazonensis* em UDs do centro de Palmas foi 12,5% em julho e 10% em novembro.

**Tabela 8** - Tripanossomatídeos identificados por sequenciamento dos produtos amplificados de SSU rDNA detectados em espécimes de flebotomíneos do centro de Palmas (TO) e do distrito de Taquaruçu, Tocantins, em julho (mês seco) e novembro (mês chuvoso) de 2014.

No.	Espécie	Localidade	Habitat	Blastn <sup>1</sup>	No. de acesso	Identidade
<b>Mês seco</b>						
11	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	mata	<i>Leishmania sp.</i>	gb JX030135.1*	423/425(99%)
13	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	mata	<i>Leishmania sp.</i>	gb JX030135.1*	419/420(99%)
16	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	mata	<i>Crithidia fasciculata</i>	gb DQ182544.1	475/475(100%)
48	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Intradomicílio	<i>Leishmania sp.</i>	gb JX030135.1*	397/398(99%)
61	<i>Pi. cristenseni</i>	Taquaruçu	mata	<i>Trypanosoma sp</i>	gb JX853185.1*	470/470(100%)
104	<i>Lu. longipalpis</i>	Taquaruçu	mata	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	401/401(100%)
107	<i>Lu. longipalpis</i>	Palmas	Intradomicílio	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	416/421(99%)
114	<i>Ny. whitmani</i>	Palmas	Peridomicílio	<i>L. infantum</i>	XR_001203206.1	425/429(99%)
115	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Peridomicílio	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	427/428(99%)
116	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Intradomicílio	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430(99%)
119	<i>Ps. hermalenti</i>	Taquaruçu	Intradomicílio	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430(99%)
<b>Mês chuvoso</b>						
16	<i>Lu. longipalpis</i>	Palmas	Peridomicílio	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	426/429(99%)
22	<i>Ev. walkeri</i>	Palmas	mata	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430(99%)
46	<i>Pi. christenseni</i>	Taquaruçu	Peridomicílio	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430(99%)
48	<i>Bi. flaviscutellata</i>	Taquaruçu	mata	<i>Leishmania sp.</i>	XR_001203206.1*	135/172(78%)

No. = Número de "pools", <sup>1</sup>Basic Local Alignment Search Tool. \* A sequência não permitiu a identificação das espécies. O número de acesso indicado indica uma das sequências semelhantes à sequência aqui obtida.

## 6 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 Ocorrência de flebotomíneos em matas de galeria e unidades domiciliares no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu no município de Palmas, Tocantins.

O número de espécies registradas neste estudo (30) foi semelhante ao publicado por Machado et al. (2012), que registraram 32 espécies. Além do registro dessa alta diversidade no Tocantins, o presente estudo também contribuiu com o aumento do número de espécies de flebotomíneos registradas para o Estado, o qual passa a ser 70 espécies. Isto também tem ocorrido em estudos realizados em diferentes cidades do Estado (Andrade-Filho et al., 2001, Vilela et al., 2011, 2013). Importantes espécies vetores como *Ny. whitmani*, *Bi. flaviscutellata* e *Lu. longipalpis* estavam presentes em ambas localidades e áreas de estudo, podendo estar envolvidas na transmissão de *Leishmania* spp. em ambos períodos do ano e ser responsáveis pelos casos autóctones de leishmanioses tanto no centro de Palmas quanto no distrito de Taquaruçu.

A riqueza de espécies e a ocorrência de flebotomíneos foram maiores em Taquaruçu, distrito rural, do que no centro de Palmas, corroborando com o trabalho de Cruz et al. (2013). Já Vilela et al. (2011) e Feitosa et al. (2012) também observaram uma alta diversidade em áreas rurais, porém a abundância de flebotomíneos foi maior em ambientes urbanos. A alta diversidade de espécies encontrada nas zonas rurais pode ser devido à presença de fragmentos de matas mais próximos aos domicílios, às estruturas dos abrigos de animais, às plantas presentes no peridomicílio e à maior quantidade de matéria orgânica acumulada no peridomicílio, condições essas que propiciam o estabelecimento do ciclo reprodutivo de espécies de flebotomíneos (Quinnell; Dye, 1994; Vianna et al., 2016; Cruz et al., 2013) e assim a maior ocorrência desses insetos.

Em ambas localidades estudadas, o número de espécies e a ocorrência de espécimes de flebotomíneos foi mais elevada na seca (julho), assim como relatado por Pinheiro et al. (2013) no estado do Rio Grande do Norte e Moraes et al. (2015) no norte do Maranhão. Nesse período, as áreas com maior riqueza de espécies e número de espécimes foram nos fragmentos de matas de galeria. Na seca, foi registrada maior quantidade de matéria orgânica no solo dos fragmentos de matas de galeria (Figura 21 A), como folhas e fezes de animais em decomposição, os quais são microambientes que favorecem a reprodução e colonização (Vianna et al., 2016; Cruz et al., 2013), contribuindo assim para o aumento da diversidade e da abundância dos flebotomíneos.

Em novembro (mês chuvoso), a maioria das espécies e dos espécimes de flebotomíneos capturados em ambas localidades foi encontrada nos locais peridomésticos, assim como encontrado por Figueiredo et al. (2016) em Aquidauana (MS).

O número reduzido de espécimes e a ausência de espécies de flebotomíneos em abundância nos fragmentos de matas de galeria de ambas localidades registrados em novembro podem ser explicados pelo intenso encharcamento do solo (Figura 21 B).

**Figura 21** - Diferenças nas matas de galeria durante os dias secos e chuvosos em Palmas, Tocantins. A: julho (mês seco). B: novembro (mês chuvoso).



Esses dados estão de acordo com Moraes et al. (2015) que capturaram menos flebotomíneos no período chuvoso e, segundo eles, isto ocorreu provavelmente devido ao encharcamento permanente do solo, o qual deve ter contribuído para reduzir o tamanho das populações dos flebotomíneos durante essa estação, dificultando o estabelecimento de criadouros. Enquanto em Belo Horizonte (MG), Saraiva et al. (2011) observaram que os picos de coleta de flebotomíneos registrados antes e depois dos períodos de precipitação intensa foram inversamente correlacionados com os altos índices pluviométricos ocorridos entre outubro de 2006 e março de 2007. Segundo esses autores, os altos níveis de precipitação durante este período provavelmente geraram grande umidade em áreas de reprodução potenciais e podem ter dificultado o desenvolvimento dos flebotomíneos.

Um das espécies mais abundantes do presente estudo foi *Ny. whitmani*, que é o vetor conhecido mais importante de leishmaniose associada à forma cutânea no Brasil devido à sua ampla distribuição geográfica e associação com *L. braziliensis*, *L. shawi* (Rangel et al., 2014; Maroli et al., 2013) e *L. guyanensis* (Maroli et al., 2013). *Nyssomyia whitmani* pode se alimentar de sangue humano, sendo que as espécies *T. laurentius*, *R. rattus*, *N. lasiurus*, *C. apela*, *C. satanas*, *D. albiventris* e *C. didactylus* são reservatórios potenciais de *L. braziliensis* (Lainson, 2010; Roque; Jansen, 2014).

No mês de julho, esse flebotomíneo esteve presente nas UD's e nos fragmentos de matas de galeria de ambas localidades, sendo mais abundante nos fragmentos de matas de galeria. Enquanto que, em novembro, o mesmo foi exclusivo das UD's no centro de Palmas e predominou nas UD's no distrito de Taquaruçu. No entanto, ao considerar ambas as localidades, foi no período seco (mais quente) que *Ny. whitmani* foi capturada em maior quantidade, como encontrado por Pinheiro et al. (2013). Estes achados evidenciam que o mesmo é capaz de se adaptar às mudanças ambientais e a ambientes peridomésticos (Vilela et al., 2011; Rangel et al., 2014). Além disto, a presença dessa espécie no ambiente doméstico e peridoméstico dessas localidades sugere sua participação no ciclo de transmissão de leishmaniose cutânea a

nível doméstico, como observado em outras áreas regiões brasileiras (Carvalho et al., 2010c; Barata et al., 2011).

*Bichromomyia flaviscutellata* também esteve entre as espécies mais capturadas. Tal espécie tem fortes hábitos zoófilos e baixa antropofilia (Rangel et al., 2014), é um importante vetor de *L. amazonensis* no Brasil, parasito que causa a leishmaniose cutânea difusa (mais comum) ou disseminada, e tem as espécies do gênero *Proechimys* como seus reservatórios potenciais (Lainson, 2010; Maroli et al., 2013; Roque; Jansen, 2014). A maior abundância de *Bi. flaviscutellata* foi em julho, onde a mesma foi capturada somente nos fragmentos de matas de galeria adjacentes do centro de Palmas e teve preferência por esse ambiente no distrito de Taquaruçu. Esta observação é preocupante, uma vez que as UD's do presente estudo se localizam em áreas próximas a esses ambientes e, por essa razão, o risco de infecção por leishmaniose cutânea difusa em ambas localidades estudadas pode aumentar. Isto é corroborado com os achados recentes de Andrade et al. (2009), que capturaram *Bi. flaviscutellata* em florestas e residências de Bonito (MS), assim como de Vilela et al. (2011), que registraram essa espécie em áreas periurbanas de Porto Nacional (TO), sugerindo sua adaptação gradual a ambientes humanos e dispersão, respectivamente.

Diferentemente do observado por Barata et al. (2011) e Lara-Silva et al. (2015), *Lu. longipalpis*, principal vetor de *L. infantum* no Brasil (Lainson; Rangel (2005); Galati et al., 2006), foi encontrada em baixa quantidade nos ambientes domésticos em ambos os períodos do ano, tanto no centro de Palmas quanto no distrito de Taquaruçu, provavelmente devido às altas temperatura em julho e à intensidade de chuva em novembro. Em julho, *Lu. longipalpis* foi rara nos fragmentos de matas de galeria em ambas localidades, e em novembro esteve ausente dessas áreas, assim como encontrado por Machado et al. (2012) nesse distrito. Também há possibilidade de que essa espécie esteja sendo substituída por *Ny. whitmani* nesse município. Já foi evidenciado por Carvalho et al. (2010c) e Figueiredo et al. (2016), que a preferência dessa espécie por locais do peridomicílio onde há animais e

intradomicílio, é forte indicativo do seu poder de adaptação ao ambiente antrópico. Pelo fato de que ainda não foi constatada a infecção natural com *L. infantum* em *Lu. longipalpis* no município de Palmas, entre outros fatores, não é possível afirmar qual é o principal vetor de LV em Palmas.

Em julho, outras espécies estiveram presentes entre as mais abundantes nos fragmentos de matas de galeria do distrito de Taquaruçu (*Pa. aragaoi*, *Pa. hermanlenti* e *Pi. christensenii*) e do centro de Palmas (*Ev. walkeri* e *Pa. hermanlenti*). Em novembro, registrou-se a abundância de outras espécies no peridomicílio do distrito de Taquaruçu (*Ev. carmelinoi*, *Ev. evandroi*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*) e do centro de Palmas (*Ev. carmelinoi* e *Ev. walkeri*). As espécies *Ev. sallesi* (Saraiva et al., 2009) e *Ev. walkeri* (Nieves et al., 2014) foram encontradas infectadas naturalmente com *L. infantum* e *Leishmania* (*Viannia*) spp., respectivamente. Enquanto que *Ev. lenti*, juntamente com *Pi. christensenii*, foram encontradas naturalmente infectadas com *L. braziliensis* (Margonari et al., 2010). As demais espécies, até o presente momento, não foram incriminadas como veiculadoras de *Leishmania* spp., mas é possível que *Pi. christensenii*, *Pa. hermanlenti* e em *Ev. walkeri* ajam como potenciais vetores de *L. amazonensis*.

A predominância de fêmeas no mês de julho nos fragmentos de matas de galeria e de machos em novembro no peridomicílio de ambas as localidades, diferiu dos achados de outros autores (Vilela et al., 2011; Pinheiro et al., 2013; Vilela et al., 2013). Essa inversão provavelmente ocorreu devido à disponibilidade de fonte alimentar, a mudanças climáticas ou ao tipo de armadilha usada nas capturas no decorrer no presente estudo. No entanto, seria necessário um estudo de sazonalidade para inferir com detalhes sobre a razão sexual e validar essas hipóteses.

Os resultados indicam que os remanescentes de matas de galeria têm papel importante na manutenção de populações de flebotomíneos em áreas de Cerrado, principalmente durante as secas, quando já há uma diminuição da ocorrência deles em unidades domiciliares. Os principais vetores de agentes de LTA, *Ny. whitmani* e *Bi. flaviscutellata*, estiveram presentes nos fragmentos de matas de galeria adjacentes e UD's das localidades estudadas.

Isto demonstra a crescente adaptação desses flebotomíneos a ambientes modificados pelo homem e peridomésticos e, conseqüentemente, eleva o risco para a infecção por *Leishmania* spp. Diferentemente dessas espécies, *Lu. longipalpis* foi rara nos fragmentos de matas de galeria, sugerindo que os remanescentes florestais seriam habitats mais importantes para os vetores associados à LTA.

## **6.2 Ocorrência de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos em flebotomíneos no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu, Tocantins.**

A PCR tem sido utilizada em muitos estudos para detectar *Leishmania* em espécies de flebotomíneos (Quaresma et al., 2012; Vilela et al., 2013). É mais sensível que a dissecação seguida de exame parasitológico, permitindo a identificação de parasitos em nível de gênero, subgênero e/ou espécie (Pita-Pereira et al., 2011). A técnica de nested PCR utilizando SSU rDNA é mais sensível na detecção de tripanossomatídeos do que de PCR com ITS1 como alvo (El Tai et al., 2000; Schönian et al., 2003), um fator que pode explicar a detecção de um único “pool” positivo utilizando o marcador ITS1.

Ao se considerar ambas localidades, foi possível observar que, em julho, o número de “pools” de flebotomíneos analisados das UD's foi inferior ao dos fragmentos de matas, e mesmo assim a proporção de “pools” positivos de flebotomíneos para *Leishmania* nas UD's foi aproximadamente cinco vezes maior que nos fragmentos de matas (17,6% X 3,7%). Enquanto que em novembro, apesar do número de “pools” de flebotomíneos examinados nos fragmentos de matas ter sido quase cinco vezes menor que nas UD's, a proporção de “pools” positivos de flebotomíneos para *Leishmania* nos fragmentos de matas foi aproximadamente cinco vezes maior que nas UD's (28,5% X 5,8%). Um dos fatores que explica essa inversão é a menor quantidade de flebotomíneos por “pool” associada à quantidade de “pools”

positivos para *Leishmania* nas UD's e nos fragmentos de matas em julho e novembro, respectivamente.

No mês de julho, o DNA de *Leishmania* spp. detectado em *Ny. whitmani*, proveniente de um fragmento de mata e de uma UD do distrito de Taquaruçu, pode ser de *L. braziliensis*, já que *Ny. whitmani* é o vetor mais importante desse parasito no Brasil (Rangel; Lainson, 2009; Vilela et al., 2011), inclusive no Tocantins onde já foi detectado com DNA desse parasito. Nesse mesmo período, em UD's dessa localidade, foi detectado DNA de *L. amazonensis* pela primeira vez em *Ny. whitmani* e *Pa. hermanlenti*; também houve registro inédito de DNA desse parasito na espécie *Pi. christenseni* em novembro, num fragmento de mata do distrito de Taquaruçu. Sabe-se que *Ny. whitmani* pode ser infectada experimentalmente com *L. amazonensis* e pode até ser um vetor da leishmaniose cutânea difusa (Fonteles et al., 2016). A infecção por *Leishmania* sp. detectada em *Bi. flaviscutellata*, no mês de novembro, em um fragmento de mata do distrito de Taquaruçu, pode ter sido causada por *L. amazonensis*, dada a associação conhecida entre estas espécies (Rangel; Lainson, 2009; Lainson, 2010). Em fragmentos de matas desse distrito, no mês de julho, DNA de *Crithidia fasciculata* também foi detectado pela primeira vez em *Ny. whitmani*, assim como DNA de *Trypanosoma* sp. em *Pi. christenseni*.

No mês de julho, em uma UD do centro de Palmas, foi detectado DNA de *L. infantum* em *Ny. whitmani*. A infecção de *Ny. whitmani* por *L. infantum* foi descrita pela primeira vez em Belo Horizonte (MG) (Saraiva et al., 2010), mas as interações biológicas envolvidas nesta infecção precisam ser investigadas para determinar o papel desse vetor na transmissão parasitária (Margonari et al., 2010). Em novembro, num fragmento de mata do centro de Palmas, foi detectada pela primeira vez a presença de *L. amazonensis* em *Ev. walkeri*. Tanto em julho (em uma mata do distrito de Taquaruçu) quanto em novembro (em uma UD do centro de Palmas), foi detectado DNA de *L. amazonensis* em *Lu. longipalpis*. Experimentos têm revelado a habilidade de *Lu. longipalpis* em transmitir *L. amazonensis* a hamsters (Da Silva et al., 1990), e outros estudos também têm detectado *L. amazonensis* em *Lu.*

*longipalpis* (Paiva et al., 2006, Savani et al., 2009), o que demonstra a sua competência vetorial.

Em geral, as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* foram detectadas em flebotomíneos capturados no mês de julho, tendo preferência pelas UDs do centro de Palmas. A taxa de infecção mínima de *Ny. whitmani* por *L. infantum* nas UDs do centro de Palmas foi de 3,8%, sendo esta a mesma encontrada por Saraiva et al. (2010) e bem inferior à registrada por Margonari et al. (2010) – 18,2%. Já as taxas de infecção mínima de *Lu. longipalpis* por *L. amazonensis* foram consideradas altas (14,2% nas matas e 28,6% nas UDs) no município de Palmas quando comparadas a outras observadas em estudos similares realizados no Brasil, a exemplo de Paiva et al. (2006), que observaram *L. amazonensis* em 3,9% dos espécimes de *Lu. longipalpis* e de Savani et al. (2009) que detectaram *L. amazonensis* em 1,25% dos espécimes de *Lu. longipalpis*.

Os primeiros registros de DNA de *L. amazonensis* em *Ny. whitmani*, *Pi. christenseni*, *Pa. hermanlenti* e *Ev. walkeri* no município de Palmas sugerem o possível envolvimento dessas espécies na transmissão de agentes da forma cutânea da doença, onde foram registrados 169 casos de LTA nos últimos anos (dados obtidos em cooperação com a Secretaria Municipal de Saúde). No entanto, a descoberta de DNA de *Leishmania* em espécies de flebotomíneos não é a única condição necessária para considerá-las vetoras. A distribuição das espécies também deve coincidir com a da doença em seres humanos; o inseto também deve ser encontrado infectado em ambientes peridomésticos e domésticos; ele deve alimentar-se regularmente em seres humanos e outros hospedeiros (Killick-Kendrick, 1999), e mais recentemente, como proposto por Ready (2013), a interação entre o vetor e os hospedeiros deve ser analisada por modelos matemáticos.

É possível que *L. infantum* esteja sendo transmitida por *Ny. whitmani* no centro de Palmas e que *L. amazonensis* esteja sendo transmitida por *Ny. whitmani* e por *Lu. longipalpis* no distrito de Taquaruçu. A presença de DNA de *Leishmania* spp. em espécies de flebotomíneos de UDs e fragmentos de matas de galeria no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu sugere que

essas áreas estão potencialmente em risco para a transmissão de *Leishmania*.

Os novos registros de infecções de flebotomíneos por espécies de *Leishmania* e outras espécies de tripanossomatídeos aqui apresentadas proporcionam maior conhecimento das relações parasito-vetor em áreas do cerrado brasileiro, uma melhor compreensão da epidemiologia da LTA em Palmas e também ajudarão as agências governamentais de saúde a definir as melhores estratégias de vigilância entomológica e controle para essa zoonose. É possível que esteja ocorrendo transmissão de LTA por meio de *Ny. whitmani* e de LV a partir de *Lu. longipalpis* no município de Palmas, porém não se descarta a possibilidade de que outras espécies possam estar envolvidas no ciclo de transmissão dessas parasitoses.

## 7 CONCLUSÕES

1. Houve elevada riqueza de espécies de flebotomíneos em Palmas, considerando que ocorrência de quase metade das espécies registradas para o Tocantins foram capturadas nesse estudo.

2. Três reconhecidas espécies vetoras: *Ny. whitmani*, *Lu. longipalpis* e *Bi. flaviscutellata*, e os agentes *Leishmania* sp., *L. infantum* e *L. amazonensis* estiveram presentes em Palmas. *Nyssomyia whitmani* predominou tanto em matas de galeria como nas unidades domiciliares em ambos os períodos, seco e chuvoso. *Lu. longipalpis* encontra-se mais associada ao ambiente domiciliar, com maior frequência no período chuvoso, e *Bi. flaviscutellata* aos fragmentos de mata, sendo mais frequente no período seco.

3. A constatação de DNA de *L. amazonensis* e de *L. infantum* em *Ny. whitmani*, podem apontar para participação deste flebotomíneo na transmissão desses agentes nos ambientes investigados em Palmas, assim como a de *Lu. longipalpis* em relação à *L. amazonensis*. Assinala-se também o possível envolvimento de *Pi. christenseni*, *Pa. hermanlenti* e em *Ev. walkeri* como potenciais vetores de *L. amazonensis* no ciclo zoonótico deste parasito.

4. A taxa de infecção mínima de flebotomíneos no período chuvoso foi quase duas vezes maior que a do seco. E esta taxa foi cerca de 10,4 vezes maior em julho no ambiente domiciliar, quando se compara à mata. Enquanto que no período chuvoso, a mesma foi em torno de 11,5 vezes mais elevada na mata em relação ao ambiente domiciliar. Isto indica variação na taxa de infecção ao longo do ano e em diferentes ambientes.

5. A presença de *L. amazonensis* em *Lu. longipalpis*, com taxas de mínimas de infecção superiores a observadas em outras áreas do País, em ambos os períodos, habitats e localidades, sugere a circulação ativa desse protozoário nesse município.

6. Os fragmentos florestais urbanos de Palmas possuem papel importante na manutenção de populações de flebotomíneos em áreas de savana brasileira, particularmente durante o mês seco, quando a frequência desses dípteros diminuiu nas unidades domiciliares

7. Determinadas UD's amostradas em Palmas (no centro de Palmas e no distrito de Taquaruçu) apresentaram características no peridomicílio para a ocorrência de flebotomíneos, manutenção de suas populações e infecção por *Leishmania* spp. tanto em humanos quanto em animais domésticos (cães, por exemplo) em ambas as localidades, como presença de árvores frutíferas, matéria orgânica e animais como cães e galinhas, as quais contribuem no aumento do risco de leishmanioses nessas localidades.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, MM dos S. Repositório Institucional da Fiocruz. [documento na internet]. 2013 [acesso em 2 ago 2016]. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/7679>
- Aguiar, GM de, Azevedo ACR, Medeiros VM de, Alves JRC, Rendeiro V. Aspects of the ecology of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014;56(2):143-149.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(3):1-40.
- Alcover MM, Ballart C, Martín-Sánchez J, Serra T, Castillejo S, Portús M et al. Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors* 2014;7(421):12 p.
- Alexander B., Carvalho RL de, Mccallum H, Pereira, MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *J Emerg Infect Dis* 2002;8(12):1480-1495.
- Alkan C, Bichaud L, De Lamballerie X, Alten B, Ernest A. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res* 2013;100:54-74.
- Almeida PS de, Andrade AJ de, Sciamarelli A, Raizer J, Menegatti JA, Hermes SCNM et al. Geographic distribution of phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;110(4):551-559.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7(5):1-12.
- Andrade AJ de, Shimabukuro PHF, Galati EAB. On the taxonomic status of *Phlebotomus breviductus* Barretto, 1950 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Zootaxa* 2013;3734(4):477-484.
- Andrade ARO de, Nunes VLB, Galati EAB, Arruda CCP de, Santos MF da CS, Rocca MEG et al. Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, State of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(5):488-493.

Andrade Filho JD, Galati EAB, Andrade WA de, Falcão AL. Description of *Micropygomyia* (*Silvamyia*) *echinatopharynx* sp. nov. (Diptera: Psychodidae) a new species of phlebotominae sand fly from the State of Tocantins, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004a;99(6):609-615.

Andrade Filho JD, Valente MB, Andrade WA de, Brazil RP, Falcão AL. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). Rev Soc Bras Med Trop 2001;34(4):323-329.

Andrade Filho, J. D., Galati EAB, Falcão AL. Biology of the First Generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2004b;99(6):597-601.

Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Euro Surveill 2013;18(30): p. 20540.

Arce C, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Euro Surveill 2013;18(30): p. 20546.

Azevedo PCB, Lopes GN, Fonteles RS, Vasconcelos GC, Moraes JLP, Rebêlo JMM. The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, state of Maranhão, Brazil. Neotrop Entomol 2011;40(2):271-277.

Barata RA, Paz GF, Bastos MC, Andrade RCO; Barros, DCM de, Silva FOL e et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governador Valadares, a transmission area for american tegumentary leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44(2):136-139.

Bigeli JG, Oliveira Jr WP, Teles NM. Diagnosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, State of Tocantins, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2012;45(1):18-23.

Brasil. Ministério da Saúde. Datasus - Leishmaniose Visceral - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Tocantins [documento na internet]. 2015a [acesso em 6 ago 2016]. Disponível em:  
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvto.def>

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana: casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Tocantins [documento na internet]. 2015b [acesso em 6 ago

2016]. Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltato.def>

Brasil. Ministério da Saúde. Publicações SVS - Guia de Vigilância Epidemiológica: Leishmaniose. 7 ed - LV [documento na internet]. 2014a [acesso em 26 jul 2016]. Disponível em:

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/publicacoes-svs>

Brasil. Ministério da Saúde. Publicações SVS - Guia de Vigilância Epidemiológica: Leishmaniose. 7 ed. - LT [documento na internet]. 2014b [acesso em 26 jul 2016]. Disponível em:

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/publicacoes-svs>

Brazil RP, Carneiro VL, Andrade Filho JD, Alves JCM, Falcão AL. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). Neotrop Entomol 1997;26(1):91-193.

Brilhante AF, Sábio PB, Galati EAB. A new species of sand fly, *Psathyromyia elizabethdorvalae* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), from Brazil. J Med Entomol 2016. ahead of print.

Cardoso RM, Araújo NNSL de, Romero GAS, Souza TTCM, Minuzzi TTC, Dietrich AG et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. Parasit Vectors 2015;8(171):8 p.

Carvalho GM de L, Brazil RP, Sanguinette C de C, Andrade Filho JD. Description of a new phlebotomine species, *Martinsmyia reginae* sp. nov. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from a cave in the State of Tocantins Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010a;105(3):336-340.

Carvalho M do SL de, Bredt A, Meneghin ERS, Oliveira C de. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. Epidemiol Serv Saude 2010c;19(3):227-237.

Carvalho MR de, Valença HF, Silva FJ de. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Trop 2010b;116:108-110.

Costa CHN, Werneck GL, Rodrigues Jr L, Santos MV, Araújo IB, Moura LS et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 2005;99(3):229-236.

Cruz CFR, Cruz MFR, Galati EAB. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108(3):303-311.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasit Vectors* 2009;2(Suppl 1):1-8.

Dias ES, Michalsky EM, Nascimento JC do, Ferreira E de C, Lopes JV, Fortes-Dias CL. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. *J Vector Ecol* 2013;28(1):193-196.

Dias ES. Psychodidae. In: *Parasitologia Humana*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2011. p. 377-402.

Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* 2012;5(276):1-12.

Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA et al. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol* 2011;41(5):571-579.

El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Spacer in clinical samples of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(5):575-579.

Feitosa MAC, Juliao GR, Costa MDP, Belem B, Pessoa FAC. Diversity of sand flies in domiciliary environment of Santarém, State of Pará, Brazil: species composition and abundance patterns in rural and urban. *Acta Amazon* 2012;42(2):507-514.

Feliciangeli MD, Delgado O, Suarez B, Bravo A. *Leishmania* and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in West Central Venezuela. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;46:476-479.

Ferreira TS, Minuzzi-Souza TTC, Andrade AJ de, Coelho TO, Rocha D de A, Obara MT et al. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. *Trop Med Int Health* 2015;11(12):1785-1791.

Figueiredo HR de, Santos MF da C, Casaril AE, Infran JO de M, Ribeiro LM, Fernandes CE dos S et al. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of leishmaniasis in Aquidauana municipality, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016;58(87): 12 p.

Fonteles RS, Pereira Filho AA, Moraes JLP, Kuppinger O, Rebêlo JMM. Experimental Infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*, etiological agents of american turgentary leishmaniasis. J Med Entomol 2016;53(1):206-209.

Forattini OP. Entomologia médica. São Paulo: Edgard Blucher; 1973.

Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr F de A, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral de Mato grosso do Sul, Brasil. Rev Saude Publica 1997;31(4):378-390.

Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC et al. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101(2):175-193.

Galati EAB. Apostila de Bioecologia e identificação de Phlebotominae [apostila na internet]. 2016a. V.1 [Acesso em 10 out 2016]. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>

Galati EAB. Apostila de Bioecologia e identificação de Phlebotominae. [apostila na internet]. 2016b. V.2 [Acesso em 10 out 2016] Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.

Galardo AKR, Galardo CD, Santana AA, Mendes JCC, Souza FRA de, Duarte JP et al. Primeira ocorrência de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Estado do Amapá, Brasil. Biota Amazonia 2013;3(2):179-183.

Gavani ASM, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbali M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. Am J Trop Med Hyg 2002;67(5):511-515.

GeoPalmas. Mapas Temáticos. Macrozoneamento [mapas na internet]. 2015a [acesso em 9 ago 2016]. Disponível em: <http://geopalmasweb.wixsite.com/geopalmas>

GeoPalmas. Mapas Temáticos. Meio ambiente [mapas na internet]. 2015b [acesso em 9 ago 2016]. Disponível em: <http://geopalmasweb.wixsite.com/geopalmas>

Glória MRB. Repositório Institucional da Fiocruz [repositório na internet]. 2006 [acesso em 2 ago 2016]. Disponível em: <http://arca.fiocruz.br/handle/icict/4788>

Godoy RE, Santana ALF de, Graser C, Vilela ML. Aspects on the ecology of Phlebotomine sand Flies (Diptera: Psychodidae) from Guaraí, State of Tocantins, Brazil, endemic area for american cutaneous leishmaniasis. J Med Entomol 2017;54(1), pp. 229-235.

Goto H, Lindoso JAL. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am 2012;26:293-307.

Goulart TM, Castro CF de, Machado VE, Silva FB da R, Pinto MC. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). Parasit Vectors 2015;8(423):7p.

Guimarães A, Raimundo JM, Santos HD, Machado RZ, Baldania CD. Serosurvey for canine visceral leishmaniasis in rural and urban areas of the Brazilian Legal Amazon. Braz J Infect Dis 2017;21(2):207-208.

Harhay, MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol 2011;27(9):403-439.

IBGE, Diretoria de Geociências, Coordenação de Cartografia. Brasil em síntese. [documento na internet]. 2013 [acesso em 1 ago 2016]. Disponível em: <http://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio/divisao-politica.html>

IBGE. Biblioteca - catálogo [catálogo da biblioteca na internet]. 2015a [acesso em 20 ago 2016] Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=720>

IBGE. Cidades@ [documento na internet]. 2016a [acesso em 6 ago 2016]. Disponível em: <http://ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?lang=&codmun=172100&search=tocantins|palmas|infograficos:-dados-gerais-do-municipio>

IBGE. Estimativas de População [documento na internet]. 2015b [acesso em 6 ago 2016]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/estimativa\\_dou.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/estimativa_dou.shtm)

IBGE. Mapas temáticos [mapas na internet]. 2007 [acesso em 9 ago 2016]. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/tematicos/geomorfologia>

IBGE. Tocantins - Palmas [documento na internet]. 2016b [acesso em 17 ago 2016]. Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/BGD>

Instituto Pólis. Plano de Ação Palmas Sustentável. [documento na internet]. 2015 [acesso em 8 ago 2016]. Disponível em:  
<http://polis.org.br/publicacoes/plano-de-acao-palmas-sustentavel/>

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol 2006;22(9):439-445.

Kesari S, Bhunia GS, Kumar V, Jeyaram A, Ranjan A, Das P. Study of house-level risk factors associated in the transmission of Indian Kala-azar. Parasit Vectors 2010;3(94):5 p.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sandflies. Clin Dermatol 1999;17(3):279-289.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100(8):811-827.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RSM, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985;79:223-226.

Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev Panamazonica Saude 2010;1(2):13-32.

Lara-Silva F de O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza V de OP, Pessanha JEM, Regina-Silva S et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. Acta Trop 2015;148:128-136.

Lindoso JAL, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CHV. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. HIV AIDS (Auckl) 2016;8:147-156.

Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, Queiroz RG de, Justiniano SCB, Ward RD et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. Insect Mol Biol 2002;11(2):117-122.

Lustosa E de S, Naves HAM, Carvalho MESD, Barbosa W. Contribuição para o conhecimento da fauna flebotomínica do estado de Goiás – 1984-1985. Nota prévia I. Rev Patol Trop 1986;15(1):7-11.

Machado TO, Bragança MAL, Carvalho ML, Andrade Filho JD. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in

different environments in the district of Taquaruçú, State of Tocantins, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012;107(7):955-959.

Marcondes CB, Otranto D, Torres FD. Leishmaniasis. In: C.B. Marcondes, editor. Arthropod Borne Diseases. Cham: Springer Nature; 2017. p. 223-244.

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

Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL et al. Phlebotomine sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. J Med Entomol 2010;47(6):1212-1219.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol 2013;27(2):123-147.

Matteo KC de, Matricardi EAT, Araújo WSA, Santos RP dos, Oliveira FT de, Campolina BP et al. Zoneamento Ecológico-Econômico. Diagnóstico da Dinâmica Social e Econômica do Estado do Tocantins. Inventário Socioeconômico. Palmas: [s.n.]; 2016.

McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. Q J Med 2014;107:7-14.

Menezes JA, Ferreira E de C, Andrade-Filho JD, Sousa AM de, Morais MHG, Rocha AMS et al. An integrated approach using spatial analysis to study the risk factors for leishmaniasis in area of recent transmission. Biomed Res Int 2015:10 p.

Michalsky EM, Guedes K de S, Silva F de OL e, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44(1):58-62.

Missawa NA, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Dias ES. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. Cad Saude Publica 2010;26(12):2414-2419.

Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky EM, Dias ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44(1):76-78.

Moore JS, Kelly TB, Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Wallbanks KR, Molyneux DH. Honeydew sugars in wild caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography. *Med Vet Entomol* 1987;1(4):427-434.

Moraes JLP, Santos CLC dos, Bastos V de JC, Pereira CAN, Moraes LS, Moraes J de LR et al. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em matas ciliares na transição entre a Amazônia úmida e o Nordeste semi-árido do Brasil. *Entomotropica* 2015;30(3):20-29.

Nieves E, Oraá L, Rondón Y, Sánchez M, Sánchez Y, Rojas M et al. Effect of Environmental disturbance on the copulation of sandflies and *Leishmania* transmission in an endemic area of Venezuela. *J Trop Med* 2014;2014: 7 p.

Ocampo CB, Ferro MC, Cadena H, Gongora R, Pérez M, Valderrama-Ardila CH et al. Environmental factors associated with american cutaneous leishmaniasis in a new Andean focus in Colombia. *Trop Med Int Health* 2012;17(10):1309-1317.

Oliveira EF de, Silva EA e, Fernandes CE dos S, Filho ACP, Gamarra RM, Ribeiro AA et al. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107(3):396-401.

Oliveira EF de, Fernandes CE dos S, Silva EA, Brazil RP, Oliveira AG de. Climatic factors and population density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in an urban endemic area of visceral leishmaniasis in midwest Brazil. *J Vector Ecol* 2013;38(2):224-228.

Oliveira IBB, Batista HL, Peluzio JM, Pfrimer IAH, Rodrigues FM, Carmo Filho JR do. Epidemiological and environmental aspects of visceral leishmaniasis in children under 15 years of age between 2007 and 2012 in the City of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47(4):476-82.

Paiva BR de, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop* 2006;99(2-3):252-259.

Paiva BR de, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, Malafronte R dos S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania spp.* em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad Saude Publica* 2007;23(1):87-94.

Palmas. Relatório de frequência dos casos notificados de LV entre os anos de 2011-2015. Palmas-TO: SEMUS, 2015a.

Palmas. Relatório de frequência dos casos notificados de LT entre os anos de 2011-2015. Palmas-TO: SEMUS, 2015b.

Palmas. Relatório do Epi Info do total de animais positivos para LV canina entre os anos de 2011-2015. Palmas-TO: SEMUS, 2015c.

Pessoa FAC, Medeiros JF, Barrett TV. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(5):593-599.

Petts SL, Tang Y, Ward RD. Nectar from the wax plant *Hoya* sp., as a carbohydrate source for *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Ann Trop Med Parasitol 1997;91(4):443-446.

Pimenta PFPP, Freitas VC de, Secundino NFC. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: Silva-Neto MAC, Winter C e Termignoni C, organizadores. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Rio de Janeiro: INCT - EM; 2012. p. 1-45.

Pinheiro MPG, Silva JHT, Cavalcanti KB, Azevedo PRM de, Ximenes MFF de M. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of northeast Brazil. J Vector Ecol 2013;38(2), pp. 307-316.

Pita-Pereira D de, Cardoso MAB, Alves CR. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. Acta Trop 2008;107:67-69.

Pita-Pereira D de, Souza GD, Pereira T de A, Zwetsch A, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of american cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil. Acta Trop 2011;120(3):273-275.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. Rev Soc Bras Med Trop 2005;38(1): pp. 70-72.

Quaresma PF, Carvalho GM de, Ramos MC das NF, Andrade Filho JD. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012;107(4), pp. 480-485.

Quinnell RJ, Courtenay AS. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 2009;67(5):511-515.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2009;136:1915-1934.

Quinnell RJ, Dye C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol* 1994;8 (3):219-224.

Ramos WR, Medeiros JF, Julião GR, Ríos-Velásquez CM, Marialva EF, Desmoulière SJM et al. Anthropic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Acta Trop* 2014;139:44-52.

Rangel EF, Costa SM da, Carvalho BM. Environmental changes and the geographic spreading of american cutaneous leishmaniasis in Brazil. In: Claborn DD, editor. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. s.l.: [s.n.], 2014. p. 1-25.

Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of american cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(7):937-954.

Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 2008;24(12):2948-2952.

Rangel EF, Souza NA de, Wermelinger ED, Babosa AF. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79(3):395-396.

Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* 2013; 58:227-250.

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 2014;6:147-154.

Reithinger R, Mohsen M, Leslie T. Risk Factors for anthroponotic cutaneous leishmaniasis at the household level in Kabul, Afghanistan. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(3): 8 p.

Ribeiro LM, Oshiro ET, Souza DA de, Fernandes MF, Santos KM dos, Mateus NLF et al. Biological aspects of immature stage of *Nyssomyia*

*whitmani* (Antunes and Coutinho) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in laboratory conditions. Rev Bras Entomol 2015;59(2):100-103.

Roque ALR, Jansen AM, 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. Int J Parasitol Parasites Wildl 2014;3:251-262.

Ryan L, Brazil RP. *Leishmania* infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the Island of Sao Luis, Maranhao State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984;79(3):383-384.

Santini MS, Fernández MS, Pérez AA, Sandoval AE, Salomón OD. *Lutzomyia longipalpis* abundance in the city of Posadas, northeastern Argentina: variations at different spatial scales. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012;107(6):767-771.

Santos SO dos, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann M de P, Freitas RA de, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of american visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998;12(3):315-317.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA de, Souza CM de, Freitas CR. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: Characterization of favored locations as determined by spatial analysis. Acta Trop 2011;117(2):137-145.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva S de O, Andrade ASR de, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010;105(8):1033-1039.

Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresma PF. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. J Med Entomol 2009;46(5):1159-1163.

Saraiva L, Leite CG, Carvalho LOA de, Andrade Filho JD, Menezes FC de, Fiúza V de OP. Information system and geographic information system tools in the data analyses of the control program for visceral leishmaniasis from 2006 to 2010 in the sanitary district of Venda Nova, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. J Trop Med 2012(2012):254-361.

Saraiva L. Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro - Minas Gerais – Brasil [documento na internet]. 2015 [acesso em 01 ago 2016]. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13672>

Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 2009;160:18-24.

Schönian G, Nasereddinb A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W et al . PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47(1):349-358.

SEMARH. Área de Proteção Ambiental Serra do Lajeado. Gestão das Unidades de Conservação do Tocantins. [documento na internet]. 2002 [acesso em 6 ago 2016]. Disponível em: <http://gesto.to.gov.br/uc/52/documentos/>

SEPLAN. Atlas do Tocantins [atlas na internet]. 2012 [Acesso em 6 ago 2016]. Disponível em: <http://seplan.to.gov.br/zoneamento/atlas-do-tocantins/>

Shannon RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle Yellow fever studies. *Am J Trop Med Hyg* 1939;19:131-140.

Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008;45:255-272.

Shaw J, Rosa A, Souza A, Cruz A. Transmissão de outros agentes. In: Rangel E, Laison R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 337-351.

Shimabukuro PHF, Andrade AJ, Galati EAB. Checklist of american sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys* 2017;660:67-106.

Shimabukuro PHF, Galati EAB. Checklist de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop* 2011;11(1a):1-20.

Silva ACT da, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Adolfo G. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, State of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health* 2006;11(9):1388-1398.

Soares MRA, Carvalho CC, Silva LA, Lima MSCS, Barral AMP, Rebêlo JMM et al. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saude Publica* 2010;26(12):2409-2413.

- Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, Souza W de. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. PLoS Pathog 2013;9(10):1-4.
- Teixeira LFC. A formação de Palmas. Revista UFG 2009;11(6):91-99.
- Teles NMM, Agostini MAP, Bigeli JG, Noletto RV. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in dogs caught in Palmas, TO, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2012;21(3):278-282.
- Tocantins. Relatório de frequência dos casos notificados de LV entre os anos de 2011-2015. Palmas: SESAU, 2015a.
- Tocantins. Relatório de frequência dos casos notificados de LT entre os anos de 2011-2015. Palmas: SESAU, 2015b.
- Uliana SRB, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. J Eukaryot Microbiol 1994;41(4):324-30.
- Vélez ID, Carrillo LM, López L, Rodríguez E, Robledo SM. An Epidemic Outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg 2012;86(5):807-811.
- Vianna EN, Morais MHF, Almeida AS de; Sabroza PC, Reis IA, Dias ES et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016;111(5):302-310.
- Vilela ML, Azevedo CG, Carvalho BM, Rangel EF. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniasis in impacted area by hydroelectric plant, State of Tocantins, Brazil. PLoS One 2011;6(12):1-7.
- Vilela ML, Pita-Pereira D de, Azevedo CG, Godoy RE, Britto C, Rangel EF. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, State of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of american cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013;108(5):578-585.
- Vilela ML, Azevedo ACR, Godoy RE. Description of a New Phlebotomine Species of the Brazilian Cerrado From Sandstone Caves in Tocantins State, Brazil: *Lutzomyia (Lutzomyia) elizabethrangela* sp. nov. (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 2015;52(4):596-603.

Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. J Vector Ecol 2011;36(Supplement 1):S1–S9.

WHO. Control of Leishmaniases [documento na internet]. 2010 [acesso em 3 ago 2016]. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>

## **APÊNDICE**

APÊNDICE A - Formulário de caracterização ambiental

FORMULÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL  
**Fatores de risco para ocorrência de flebotomíneos em unidades domiciliares e peridomiciliares**

Formulário Nº: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**DADOS GERAIS DO DOMICÍLIO**

Município: \_\_\_\_\_

Localidade: \_\_\_\_\_

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

COD. GPS: \_\_\_\_\_ Coordenadas \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Nº de moradores: \_\_\_\_\_

**CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DOMICILIAR**

**Estrutura do intradomicílio**

• **Tipo de parede**

Adobe ( ) Madeira ( ) Tijolo com reboco ( )

Tijolo sem reboco ( ) Taipa sem reboco ( ) Taipa com reboco ( )

Tijolo com gesso ( ) Outra (especificar): \_\_\_\_\_

• **Tipo de piso**

Terra batida ( ) Cimento ( ) Cerâmica ( )

Tábua ( ) Outro (especificar): \_\_\_\_\_

• **Tipo de Teto**

Laje ( ) Telha cerâmica ( ) Telha amianto ( ) Palha ( )

• **Janelas da casa**

Janelas abertas ao entardecer: Sim ( ) Não ( )

Tela mosquiteiro nas janelas: Sim ( ) Não ( )

• **Localização da casa**

Rural ( ) Urbana ( )

• **Eletricidade na casa**

Possui ( ) Não possui ( )

Se possui, alguma luz fica acessa durante à noite: Sim ( ) Não ( )

- **Coleta de lixo urbana**

3 vezes semanais ( ) 2 vezes semanais ( ) 1 vez semanal ( ) Ausente ( )

Outra (especificar): \_\_\_\_\_

- **Rede de esgoto**

Possui ( ) Não possui ( )

Tipo de esgoto: \_\_\_\_\_

- **Aplicação de inseticida na residência**

Sim ( ) Não ( )

Se sim, Há \_\_\_\_\_ mês (es). Qual? \_\_\_\_\_

### **Estrutura do peridomicílio**

- **Vasos com Plantas**

Presente ( ) Ausente ( )

- **Hortas**

Presente ( ) Ausente ( )

- **Árvores**

Presente ( ) Ausente ( )

Espécies: Mangueira ( ), Goiabeira ( ), Bananeira ( ), Acerola ( ), Outra(s) (especificar): \_\_\_\_\_

- **Entulho**

Materiais de construção (tijolos, cimento, telha, metal...)

Presente ( ) Ausente ( )

Materiais inservíveis (garrafas, plásticos, vidros, papel...)

Presente ( ) Ausente ( )

- **Matéria Orgânica**

Folhas e Frutos caídos

Presente ( ) Ausente ( )

Troncos, cascas e/ou madeira apodrecidos

Presente ( ) Ausente ( )

- **Fezes de Animais**

Presente ( ) Ausente ( )

- **Animais domésticos, de produção e/ou criação**

Não possui ( )

**Nº de Cachorros:** \_\_\_\_\_

Cão (es) dentro de casa: Sim ( ) Não ( )

Cão (es) permanecem no Canil: Sim ( ) Não ( )

**Nº de galinhas:** \_\_\_\_\_

Galinheiro: Presente ( ) Ausente ( )

Animais soltos no peridomicílio: Sim ( ) Não ( )

**Nº de Gatos:** \_\_\_\_\_

Gato(s) dentro de casa: Sim ( ) Não ( )

Permanecem no Gatil: Sim ( ) Não ( )

**Nº de porcos:** \_\_\_\_\_

Chiqueiro: Presente ( ) Ausente ( )

Animais soltos no peridomicílio: Sim ( ) Não ( )

**Curral (gado, cabra ou ovelha)**

Presente ( ) Ausente ( )

Nº de animais \_\_\_\_\_

Animais soltos no peridomicílio: Sim ( ) Não ( )

**Outros animais (especificar):** \_\_\_\_\_

Animais dentro de casa: Sim ( ) Não ( )

Permanecem em local de criação: Sim ( ) Não ( )

### CARACTERIZAÇÃO DA CIRCUNVIZINHANÇA

- **Curso d'água próximo (nascentes, rios, lagos, ribeirões, córregos,)**

Presente ( ) Ausente ( )

- **Ruas não pavimentadas próximas**

Possui ( ) Não possui ( )

Número de ruas não pavimentadas: \_\_\_\_\_

- **Terrenos baldios próximos**

Possui ( ) Não possui ( )

Número de terrenos baldios: \_\_\_\_\_

- **Presença de Vegetação Natural próximas**

Presente ( ) Ausente ( )

Tipo de vegetação: mata de galeria ( ) cerrado ( ) campo ( )

Outra (especificar): \_\_\_\_\_

- **Pastagens próximas**

Presente (  ) Ausente (  )

## **ANEXOS**

ANEXO A - Artigo publicado na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2017

## The role of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations: potential *Leishmania* spp. vectors in the Brazilian savanna

Tâmara Dias Oliveira Machado<sup>1,2</sup>, Thaís Tâmara Castro Minuzzi-Souza<sup>1,3</sup>,  
Tauana de Sousa Ferreira<sup>1</sup>, Luciana Pereira Freire<sup>1</sup>, Renata Velôzo Timbó<sup>1</sup>, Tamires Emanuele Vital<sup>1</sup>,  
Nadjar Nitz<sup>3</sup>, Mariana Neiva Silva<sup>1</sup>, Alcinei de Souza Santos Junior<sup>2</sup>, Nathyla Morgana Cunha Sales<sup>2</sup>,  
Marcos Takashi Obara<sup>4</sup>, Andrey José de Andrade<sup>1,5</sup>, Rodrigo Gurgel-Gonçalves<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Área de Patologia, Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Brasília, DF, Brasil

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Coordenação de Ciências Matemáticas e Naturais, Palmas, TO, Brasil

<sup>3</sup>Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Área de Patologia, Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Brasília, DF, Brasil

<sup>4</sup>Universidade de Brasília, Ceilândia, DF, Brasil

<sup>5</sup>Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Curitiba, PR, Brasil

**BACKGROUND** Knowledge on synanthropic phlebotomines and their natural infection by *Leishmania* is necessary for the identification of potential areas for leishmaniasis occurrence.

**OBJECTIVE** To analyse the occurrence of Phlebotominae in gallery forests and household units (HUs) in the city of Palmas and to determine the rate of natural infection by trypanosomatids.

**METHODS** Gallery forests and adjacent household areas were sampled on July (dry season) and November (rainy season) in 2014. The total sampling effort was 960 HP light traps and eight Shannon traps. Trypanosomatids were detected in Phlebotominae females through the amplification of the SSU rDNA region, and the positive samples were used in ITS1-PCR. Trypanosomatid species were identified using sequencing.

**FINDINGS** A total of 1,527 sand flies representing 30 species were captured in which 949 (28 spp.) and 578 (22 spp.) were registered in July and November, respectively. In July, more specimens were captured in the gallery forests than in the HUs, and *Nyssomyia whitmani* was particularly frequent. In November, most of the specimens were found in the HUs, and again, *Ny. whitmani* was the predominant species. *Lutzomyia longipalpis* was commonly found in domestic areas, while *Bichromomyia flaviscutellata* was most frequent in gallery forests. Molecular analysis of 154 pools of females (752 specimens) identified *Leishmania amazonensis*, *L. infantum*, and *Crithidia fasciculata* in *Ny. whitmani*, as well as *L. amazonensis* in *Lu. longipalpis*, *Trypanosoma* sp. and *L. amazonensis* in *Pintomyia christenseni*, and *L. amazonensis* in both *Psathyromyia hermanlenti* and *Evandromyia walkeri*.

**MAIN CONCLUSIONS** These results show the importance of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations in the dry month, as well as their frequent occurrence in household units in the rainy month. This is the first study to identify *Leishmania*, *Trypanosoma*, and *Crithidia* species in Phlebotominae collected in Palmas, Tocantins, Brazil.

Key words: *Nyssomyia whitmani* - *Lutzomyia longipalpis* - *Leishmania amazonensis* - *Trypanosoma* sp. - *Crithidia fasciculata*

The leishmaniasis are diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) that are transmitted by several phlebotomine species (Diptera: Phlebotominae) comprising an important public health problem worldwide. In endemic areas, phlebotomine species are commonly found in both the sylvatic and domestic environments, and their natural infection rates by *Leishmania* spp. are generally low (Paiva et al. 2006, Pita-Pereira et al. 2011).

The main factors that contribute to the proximity of phlebotomine species to domestic environments are urbanisation, deforestation and host availability (Quinnell

& Dye 1994, Vilela et al. 2011). These anthropogenic changes produce landscapes in which households are close to remaining forest patches where the enzootic cycles of *Leishmania* species are present. Phlebotomine populations can spread from these forests and colonise human environments. Thus, detecting natural infection in Phlebotominae in environments with different degrees of human modification is important for epidemiological studies on leishmaniasis.

Rapid local socioeconomic growth after the creation of the Brazilian state of Tocantins in 1988, associated with human migration, deforestation, and the poor quality or lack of sanitation systems, are all examples of human modifications. Recently, this region has experienced environmental changes resulting from agricultural activities and hydroelectric power plants, both of which are conducive to the spread of certain phlebotomine species to human environments and which have contributed to leishmaniasis outbreaks (Vilela et al. 2011). Approximately 70 sand fly species have been recorded in Tocantins (An-

doi: 10.1590/0074-02760170126

Financial support: Secretaria de Vigilância em Saúde (nº 20/2013), CAPES (grant nº 1276/2011), IFTO.

+ Corresponding author: rgurgel@unb.br

Received 1 April 2017

Accepted 8 May 2017

drade-Filho et al. 2001, Vilela et al. 2011, 2013, Machado et al. 2012, Godoy et al. 2017), some of which (*Nyssomyia whitmani*, *Lutzomyia longipalpis*, *Evandromyia bourrouli*, *Ny. antunesi*, *Micropygomyia vilhelai*, *Psychodopygus complexus*, and *Ps. ayrozai*) have been recorded more frequently in modified environments (Machado et al. 2012, Vilela et al. 2013, Godoy et al. 2017). *Ps. complexus* and *Ps. ayrozai* have been found to be infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the state (Vilela et al. 2013).

The construction of Palmas, the capital of Tocantins, turned large swaths of the Cerrado biome into fragments of forest distributed throughout the city. Certain sand fly species have been able to occupy these modified habitats, which could favor the circulation of *Leishmania* species in domestic environments. High rates of *Leishmania* infection in dogs and children in other cities in Tocantins are evidence of this process (Bigeli et al. 2012, Teles et al. 2012, Oliveira et al. 2014). Between 2011 and 2015, 1,473 new cases of human visceral leishmaniasis (VL) and 2,685 new cases of American cutaneous leishmaniasis (ACL) were confirmed in Tocantins. One hundred and eleven of the VL cases and 169 of the ACL cases were registered in Palmas (data obtained in cooperation with the local Secretariats of Health). These results reflect the importance for more active surveillance, including monitoring of occurrences and of natural phlebotomine infection in cities in this state.

Knowledge on phlebotomine species that are more likely to adapt to human environments and on the levels of natural infection by *Leishmania* is necessary for the identification potential areas for leishmaniasis occurrence. Though sand fly species have been detected in the Taquaruçu district of Palmas (Machado et al. 2012),

there are no records of the phlebotomine fauna in the remaining gallery forests in the city, nor information about their natural infection by *Leishmania* species. Therefore, the present study sought to analyse the occurrence of sand fly species in gallery forests and household units (HUs) in downtown Palmas and the Taquaruçu district specifically in dry and wet months, and also to evaluate their rate of natural infection by *Leishmania* spp. and other trypanosomatids in these areas.

#### MATERIALS AND METHODS

**Study area** - Palmas is located in the central region of the Brazilian state of Tocantins (10°09'48"S, 48°21'04"W, Fig. 1). Palmas has a humid-subhumid climate, with an average annual temperature of 28°C and average annual rainfall of 1,600-1,700 mm. The population is estimated to be 272,726 residents, and the city covers 2,218.943 km<sup>2</sup> (IBGE 2013). Vegetation types range from the savanna known as the Cerrado *sensu strictu*, grasslands, montane savanna, riparian forest, and gallery forest. The district of Taquaruçu (10°10'33"S, 48°03'57"W) is located in a rural area of Palmas (Fig. 1) within the Serra do Lajeado Environmental Protection Area and has an area of 639km<sup>2</sup>. In 2010, the population of this district was 4,739 residents (<http://polis.org.br>). Its climate is the same as that of Palmas, with an average annual temperature of 27°C and average annual rainfall of 1,600 mm. Vegetation includes the Cerrado *sensu strictu*, the savanna known as the Palmeiral, and gallery forests.

**Phlebotominae collection and identification** - Sand flies were collected in downtown Palmas and in the Taquaruçu district from two gallery forests in each area

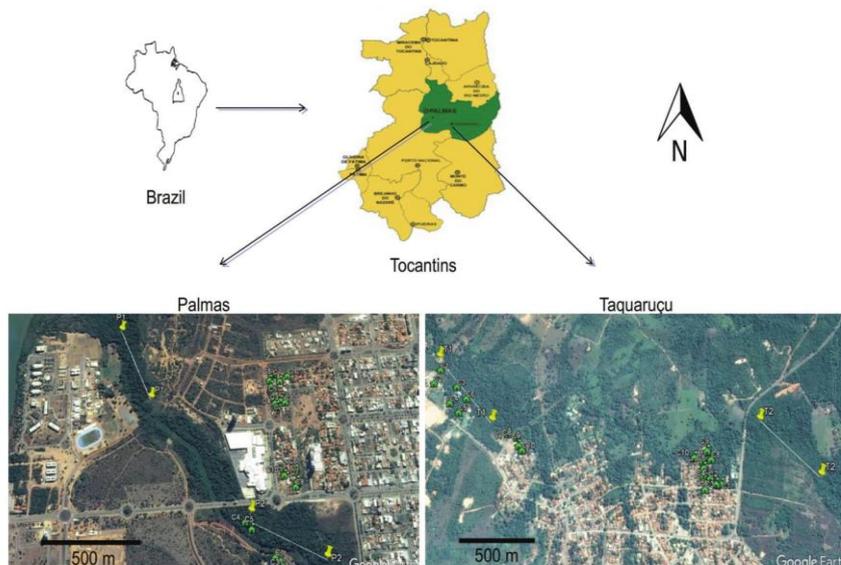


Fig. 1: location of study areas. The yellow pins connected by lines indicate points of reference for sampling trails in the gallery forests, and the green symbols represent the household units (HUs) sampled in downtown Palmas and the Taquaruçu district. Source: Google Earth 2016.

and 10 HUs adjacent to each gallery forest (Fig. 1). HP light traps and Shannon traps were used in the collections. The HP traps were installed at a height of approximately 1.5 m and were exposed for 12 h starting at sunset, and the Shannon traps were left in place for four hours (18:00 - 22:00). Twenty HP traps were placed in each gallery forest in linear transects approximately 500 metres in length. Two HP traps were installed in each household: one in a peridomestic location (such as an animal housing structure), and one inside the household. At each HP trap site, three collections were performed on three consecutive sampling days. One capture with a Shannon trap was performed in each gallery forest. Sampling in these areas was repeated in two months (the dry season in June and the rainy season in November 2014). There were 15 sampling days in each month. Total sample efforts were represented by 960 HP traps (50% of which were installed in the gallery forests) and eight Shannon traps (100% of which were installed in the gallery forests).

After screening, males and females were euthanised and placed in Eppendorf tubes with 70% alcohol. The males were clarified and mounted in Canada balsam between the slide and the coverslip. The females were dissected before being mounted on the slides. The head and final portion of the abdomen (the last three segments) were separated from the body following the same clarification procedure used for the males. The structures were mounted for specific identification. The Phlebotominae were identified following Galati (2003, 2016) and genera abbreviations were used in accordance with Marcondes (2007). Some specimens were identified only at the subtribe, genus or subgenus level due to the condition of the material.

**DNA Extraction and polymerase chain reaction (PCR)** - Parts of the females' abdomens were grouped into pools of up to 10 specimens after species identification, capture site, and date of collection. Each pool was transferred to a sterile, 1.5 mL Eppendorf tube for DNA extraction using the Illustra™ Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare). The samples remained in proteinase K at 37°C overnight, and the following steps were performed according to the manufacturer's instructions. To determine the quality of the DNA extracted, the cacophony gene of the IVS6 region of Phlebotominae was detected using specific primers: Llac5'-GTGGC-CGAACATAATGTTAG-3' and Llac 5'-CCACGAACAAGT-TCAACATC-3' (Lins et al. 2002). The amplification reaction was performed in a final volume of 25 µL containing 1X reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen), 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM dNTPs solution (GE Healthcare), 0.5 µM of each primer, 1.5 U of Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brazil), and 3 µL of DNA (5 ng/µL). The reactions were performed in the MyCycler™ thermal cycler system (Bio-Rad) with the following program: 5 min at 95°C, followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 57°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension for 10 min at 72°C. The positive control (Phlebotominae DNA) and the blank sample (no DNA) were included. The amplified products were separated by electrophoresis in 1.3% agarose gel stained with ethid-

ium bromide at 0.5 µg/mL and in TAE buffer (90 mM Tris-acetate at pH 8.0; 25 mM EDTA) and visualised using an Alpha Imager R Mini System (Alpha Innotech).

To detect Phlebotominae infection by trypanosomatids, PCRs were performed using the S4 (5'-GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC-3') and S12 (5'-GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC-3') primers to amplify the SSU rDNA region (Uliana et al. 1994). The PCR was prepared in a final volume of 25 µL containing 1X reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM dNTPs solution (GE Healthcare), 0.75 µM of each primer, 1.5 U of Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brazil), and 3 µL of DNA (5 ng/µL) from the samples. The reactions were realised in the thermocycler BIO-RAD™ MyCycler and the following conditions were used: 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension in 72°C for 7 min. The amplified products were separated by electrophoresis as described above.

After the dilution of the product of the first SSU-PCR (amplifying a 520-bp fragment), nested PCR was performed using the specific primers S17 (5'-CCA AGC TGC CCA GTA GAAT-3') and S18 (5'-TCG GGC GGA TAA AAC CC-3') (Savani et al. 2009), under the same conditions as those used in the first reaction. The product of the first PCR was diluted in water in the proportion 1:10 and 2 µL were used in the nested PCR. This PCR was prepared in a final volume of 25 µL containing of 1X reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, Invitrogen), 0.2 µM dNTPs solution (GE Healthcare), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 µM of each primer, and 1.5 U Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brazil). PCR products were separated by 1.3% agarose gel electrophoresis as described above. The positive controls used in these reactions were DNA samples from the parasites extracted from laboratory cultures: *L. braziliensis* (Lb), *L. infantum* (Li) or synonym *L. chagasi* (Lc), and *Trypanosoma cruzi* (Tc). The negative controls were DNA from uninfected mice.

The samples that showed positive amplicons in the nested SSU-PCR were tested in PCR using the ITS region of the ribosomal RNA gene (ITS1), specific for *Leishmania* spp., producing a fragment that ranged from 302 to 338-bp in length. The primers used were LITS1 (5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3') and L5.8S (5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3') (El Tai et al. 2000). The amplification reaction was performed in a final volume of 25 µL containing 1X reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM dNTPs solution (GE Healthcare), 0.25 µM of each primer, 1.5 U of Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brazil), and 5 µL of DNA (20 ng/µL). The reactions were performed in the MyCycler™ thermal cycler system (Bio-Rad) with the following program: 95°C for 5 min, 35 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension for 5 min at 72°C. The positive and negative controls were the same used in the SSU-PCR, with the exception of *T. cruzi*. The product of this PCR was reamplified with the same primers, and 2 µL of the product from the first reaction was

used as template. The same conditions were kept for the reamplification. The amplified products were separated by electrophoresis as described above.

**Sequencing** - The fragments amplified in all PCRs were purified using an Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, New York, USA) and sequenced to identify the *Leishmania* species and other trypanosomatids. The sequencing was performed at the Human Genome and Stem-Cell Research Center of the University of São Paulo (USP). The sequences were edited in the Geneious software

(Biomatters, New Zealand) and were then compared to the sequences from *Leishmania* species and other trypanosomatids deposited in GenBank using the basic local alignment search tool (BLAST) algorithm from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The parasites were identified considering 99%-100% of identity with the sequences deposited in GenBank.

**Data analysis** - Fisher's exact tests were performed using the GraphPad software to determine the differences in Phlebotomine species frequency between the habitats (gallery forests versus HUs), months (the dry

TABLE I  
Total number of Phlebotominae specimens collected in the Taquaruçu district and downtown area of Palmas, Tocantins, Brazil, in July (the dry season) and November (the rainy season) of 2014

Species	Downtown Palmas		Taquaruçu		Total
	Dry month	Rainy month	Dry month	Rainy month	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	44	3	62	2	111
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	2	0	2
<i>Brumptomyia</i> sp.	1	0	6	2	9
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	19	22	15	59	115
<i>Evandromyia evandroi</i>	1	0	2	11	14
<i>Evandromyia lenti</i>	5	2	1	24	32
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	6	13	19
<i>Evandromyia saulensis</i>	7	1	0	0	8
<i>Evandromyia termitophila</i>	3	2	0	4	9
<i>Evandromyia walkeri</i>	15	35	8	11	69
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	31	54	6	4	95
<i>Lutzomyia</i> sp.	0	1	0	0	1
<i>Micropygomyia longipennis</i>	5	2	2	2	11
<i>Micropygomyia roretaensis</i>	3	4	0	11	18
<i>Micropygomyia</i> sp.	0	0	1	0	1
<i>Micropygomyia villelai</i>	3	0	2	0	5
<i>Nyssomyia antunesi</i>	0	5	0	0	5
<i>Nyssomyia whitmani</i>	177	216	323	57	773
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	16	4	20
<i>Pintomyia damasceni</i>	0	0	1	0	1
<i>Pressatia choti</i>	0	0	7	1	8
<i>Pressatia</i> sp.	0	0	2	0	2
<i>Psathyromyia abonnenci</i>	1	0	0	0	1
<i>Psathyromyia aragai</i>	0	0	22	4	26
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	2	0	0	2
<i>Psathyromyia campbelli</i>	1	0	0	0	1
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	3	2	5
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	24	3	78	0	105
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	2	6	0	8
<i>Psathyromyia pradobarrientosi</i>	1	0	4	0	5
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	1	0	0	0	1
<i>Psathyromyia</i> ( <i>Psathyromyia</i> ) sp.	0	1	13	1	15
<i>Psychodopygus davisi</i>	0	0	1	3	4
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	0	0	1	0	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	4	3	13	5	25
Total	346	358	603	220	1527

month in July versus the rainy month in November), and locations (Palmas versus Taquaruçu). Differences in the proportions of phlebotomine pools positive for *Leishmania* between habitats and locations were also determined using Fisher's exact test. The differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

**RESULTS**

A total of 1,527 Phlebotominae specimens (738 from the households and 789 from the gallery forests) were captured from the two study areas. The specimens were distributed across 11 genera and 30 species (genus, subgenus and subtribe identifications were not considered for the number of registered species). Species richness

was greater in Taquaruçu ( $n = 24$ ) than in downtown Palmas ( $n = 22$ ). The most frequent species was *Ny. whitmani* (50.6%), followed by *Ev. carmelinoi* (7.53%), *Bichromomyia flaviscutellata* (7.27%), *Psathyromyia hermanlenti* (6.8%), *Lu. longipalpis* (6.2%), and *Ev. walkeri* (4.5%). The other species represented 15% of the total number of sand fly species captured (Table I). Fifteen species were common in both locations. Six species were found only in Palmas, and nine species were detected only in Taquaruçu (Table I). Sand flies were more frequent in the HUS in November (the rainy season) and in the gallery forests in July (the dry season), as shown in Tables II-III.

In total, 285 of the 960 HP traps installed were positive, resulting in 29.7% capture success. Sand flies were

TABLE II  
Phlebotominae specimens recorded in three environments in the city of Palmas, Tocantins, Brazil, in the dry season (July) of 2014

Species	Downtown Palmas			Taquaruçu			Total
	Intra	Peri	Forest	Intra	Peri	Forest	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0	0	44	0	1	61	106
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	0	1	0	1	2
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	1	0	0	6	7
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	8	7	4	0	15	0	34
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	1	0	0	2	3
<i>Evandromyia lenti</i>	1	1	3	0	1	0	6
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	0	0	3	3	6
<i>Evandromyia saulensis</i>	0	0	7	0	0	0	7
<i>Evandromyia termitophila</i>	2	1	0	0	0	0	3
<i>Evandromyia walkeri</i>	0	1	14	0	0	8	23
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	19	10	2	0	5	1	37
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	0	5	1	1	0	7
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	0	0	3	0	0	0	3
<i>Micropygomyia</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
<i>Micropygomyia villelai</i>	1	1	1	0	1	1	5
<i>Nyssomyia whitmani</i>	17	13	147	4	30	289	500
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	1	0	15	16
<i>Pintomyia damascenoi</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Pressatia choti</i>	0	0	0	0	4	3	7
<i>Pressatia</i> sp.	0	0	0	0	0	2	2
<i>Psathyromyia abbonenci</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0	0	0	1	21	22
<i>Psathyromyia campbelli</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	0	0	0	3	3
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	9	2	13	1	6	71	102
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	0	0	1	0	5	6
<i>Psathyromyia pradobarrientosi</i>	0	0	1	0	0	4	5
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia (Psathyromyia)</i> sp.	0	0	0	2	2	9	13
<i>Psychodopygus davisi</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	0	2	4	4	5	17
Total	61	37	248	15	74	514	949

Intra: intradomestic environment; Peri: peridomestic environment.

TABLE III  
Phlebotominae specimens recorded in three environments in the city of Palmas,  
Tocantins, Brazil, in the rainy season (November) of 2014

Species	Downtown Palmas			Taquaruçu			Total
	Intra	Peri	Forest	Intra	Peri	Forest	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0	1	2	0	1	1	5
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	0	0	2	0	2
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	2	18	2	1	56	2	81
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	0	0	11	0	11
<i>Evandromyia lenti</i>	0	1	1	2	22	0	26
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	0	2	11	0	13
<i>Evandromyia saulensis</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	2	0	0	4	0	6
<i>Evandromyia walkeri</i>	9	22	4	3	6	2	46
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	12	44	0	0	2	0	58
<i>Lutzomyia</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	0	2	2	0	0	4
<i>Micropygomyia rorataensis</i>	2	2	0	6	4	1	15
<i>Nyssomyia antunesi</i>	0	4	1	0	0	0	5
<i>Nyssomyia whitmani</i>	4	212	0	0	56	1	273
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	0	4	0	4
<i>Pressatia choti</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Psathyromyia (Psathyromyia)</i> sp.	0	1	0	0	1	0	2
<i>Psathyromyia aragaii</i>	0	0	0	0	3	1	4
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	2	0	0	0	0	2
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	1	2	0	0	0	0	3
<i>Psathyromyia lutziana</i>	2	0	0	0	0	0	2
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	0	0	0	3	3
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	2	0	2	3	0	8
Total	33	314	13	18	186	14	578

Intra: intradomestic environment; Peri: peridomestic environment.

captured in Shannon traps in both months in the four forest sites sampled ( $n = 6$ , 75% capture success). There was a significant difference in the proportion of positive HP traps between the months (July = 44.3%; November = 15%), between the habitats (HUs = 23.3%; forest = 36%), and between the locations (Taquaruçu = 33.5%; Palmas = 25.8%). Fisher's exact test showed significant differences in all comparisons, with  $p < 0.01$ . The highest capture success rate was obtained in the forests in July (63.3%), a result which was much higher than that of the forests in November (8.7%). In the HUs, the proportions of positive traps in July and November were more similar: 25.4% and 21.2%, respectively.

In July, the relative abundance of sand flies was higher in gallery forests than in the HUs (85.2% vs. 24.8% in Taquaruçu and 71.7% vs. 28.3% in downtown Palmas). Species richness was higher in July in both Taquaruçu and downtown Palmas (20 species and 14 species, respectively) (Table II). The species with the highest rate of occurrence in the Taquaruçu gallery forests in this

dry month were *Ny. whitmani* (47.9%), *Pa. hermanlenti* (11.8%), *Bi. flaviscutellata* (10.1%), *Pa. aragaii* (3.5%), and *Pintomyia christenseni* (2.9%). As shown in Table II, the most frequent species in the gallery forests in downtown Palmas were *Ny. whitmani* (42.5%), *Bi. flaviscutellata* (12.7%), *Ev. walkeri* (4%), and *Pa. hermanlenti* (3.7%). Only three *Lu. longipalpis* specimens were found in the gallery forest in downtown Palmas.

In November, the number and richness of Phlebotominae captured in the gallery forests were low. Most of the species collected that month were found in the peridomestic sites in downtown Palmas, and species richness was similar between the peridomestic sites in Palmas and Taquaruçu (Table III). The most frequent species in the peridomestic environment in downtown Palmas in November was *Ny. whitmani* (59%), followed by *Lu. longipalpis* (11.9%), *Ev. walkeri* (6.1%), and *Ev. carmelinoi* (5%). Meanwhile, in the peridomestic environment in Taquaruçu, the most frequent species were *Ny. whitmani*, *Ev. carmelinoi* (25.6%), *Evandromyia len-*

TABLE III  
Phlebotominae specimens recorded in three environments in the city of Palmas,  
Tocantins, Brazil, in the rainy season (November) of 2014

Species	Downtown Palmas			Taquaruçu			Total
	Intra	Peri	Forest	Intra	Peri	Forest	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0	1	2	0	1	1	5
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	0	0	2	0	2
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	2	18	2	1	56	2	81
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	0	0	11	0	11
<i>Evandromyia lenti</i>	0	1	1	2	22	0	26
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	0	2	11	0	13
<i>Evandromyia saulensis</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	2	0	0	4	0	6
<i>Evandromyia walkeri</i>	9	22	4	3	6	2	46
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	12	44	0	0	2	0	58
<i>Lutzomyia</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
<i>Micropygomyia longipennis</i>	0	0	2	2	0	0	4
<i>Micropygomyia roretaensis</i>	2	2	0	6	4	1	15
<i>Nyssomyia antunesi</i>	0	4	1	0	0	0	5
<i>Nyssomyia whitmani</i>	4	212	0	0	56	1	273
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	0	4	0	4
<i>Pressatia choti</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Psathyromyia (Psathyromyia)</i> sp.	0	1	0	0	1	0	2
<i>Psathyromyia aragaii</i>	0	0	0	0	3	1	4
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	2	0	0	0	0	2
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	1	2	0	0	0	0	3
<i>Psathyromyia lutziana</i>	2	0	0	0	0	0	2
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	0	0	0	3	3
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	2	0	2	3	0	8
Total	33	314	13	18	186	14	578

Intra: intradomestic environment; Peri: peridomestic environment.

captured in Shannon traps in both months in the four forest sites sampled ( $n = 6$ , 75% capture success). There was a significant difference in the proportion of positive HP traps between the months (July = 44.3%; November = 15%), between the habitats (HUs = 23.3%; forest = 36%), and between the locations (Taquaruçu = 33.5%; Palmas = 25.8%). Fisher's exact test showed significant differences in all comparisons, with  $p < 0.01$ . The highest capture success rate was obtained in the forests in July (63.3%), a result which was much higher than that of the forests in November (8.7%). In the HUs, the proportions of positive traps in July and November were more similar: 25.4% and 21.2%, respectively.

In July, the relative abundance of sand flies was higher in gallery forests than in the HUs (85.2% vs. 24.8% in Taquaruçu and 71.7% vs. 28.3% in downtown Palmas). Species richness was higher in July in both Taquaruçu and downtown Palmas (20 species and 14 species, respectively) (Table II). The species with the highest rate of occurrence in the Taquaruçu gallery forests in this

dry month were *Ny. whitmani* (47.9%), *Pa. hermanlenti* (11.8%), *Bi. flaviscutellata* (10.1%), *Pa. aragaii* (3.5%), and *Pintomyia christenseni* (2.9%). As shown in Table II, the most frequent species in the gallery forests in downtown Palmas were *Ny. whitmani* (42.5%), *Bi. flaviscutellata* (12.7%), *Ev. walkeri* (4%), and *Pa. hermanlenti* (3.7%). Only three *Lu. longipalpis* specimens were found in the gallery forest in downtown Palmas.

In November, the number and richness of Phlebotominae captured in the gallery forests were low. Most of the species collected that month were found in the peridomestic sites in downtown Palmas, and species richness was similar between the peridomestic sites in Palmas and Taquaruçu (Table III). The most frequent species in the peridomestic environment in downtown Palmas in November was *Ny. whitmani* (59%), followed by *Lu. longipalpis* (11.9%), *Ev. walkeri* (6.1%), and *Ev. carmelinoi* (5%). Meanwhile, in the peridomestic environment in Taquaruçu, the most frequent species were *Ny. whitmani*, *Ev. carmelinoi* (25.6%), *Evandromyia len-*

*ti* (10%), *Evandromyia sallesi* (5%), and *Evandromyia evandroi* (4.6%) (Table III).

The overall ratio of females to males (F:M) was 1.6:1. More females were captured than males in July (764 fe-

males versus 185 males, ratio = 4.1:1), though more males than females were captured in November (180 females versus 398 males, ratio = 0.4:1). More females were captured in the gallery forests in downtown Palmas in July (the dry month), while more males were captured in the peridomestic site in downtown Palmas in the rainy month (Fig. 2). In Taquaruçu in July, there were also more females in the gallery forests, unlike in November, in which more males were captured in the HUs of this district (Fig. 2).

A total of 752 females grouped into 154 pools were analysed (Supplementary data). Of these, 15 pools exhibited positive amplification in the SSU (18S) rDNA gene (e.g. Fig. 3, GenBank accession numbers KY660706-KY660719). Only one of these samples were positive in the ITS1-PCR. *Leishmania* spp. DNA was detected in the sand fly species from both sample locations (Table IV); however, there were no significant differences in the proportions of pools positive for *Leishmania* spp. between these locations in either July (Fisher,  $p = 0.74$ ) or November (Fisher,  $p = 1.0$ ). In July, the proportion of phlebotomine pools positive for *Leishmania* spp. DNA were 17.6% in the HUs and 3.7% in the gallery forests. In November, the proportion of pools positive for *Leishmania* spp. DNA were 5.8% in the HUs and 28.5% in the forests. When the sampling in both months was considered, the proportion of Phlebotominae pools positive for *Leishmania* was 8/57 (14.0%) in the HUs and 6/84 (7.1%) in the forests (Fisher,  $p = 0.25$ ).

In Taquaruçu district in July, six *Ny. whitmani* pools were found to have DNA from the following trypanosomatid species: *Leishmania* spp. ( $n = 3$ ; forests and HUs), *L. amazonensis* ( $n = 2$ ; HU), and *Crithidia fasciculata* ( $n = 1$ ; forest). In addition, one *Pi. christensenii* pool ( $n = 1$ ; forest) was found to have *Trypanosoma* sp. DNA (Table IV). In this month, *Lu. longipalpis* and *Pa. hermanlenti* pools were found to have *L. amazonensis* DNA (Table

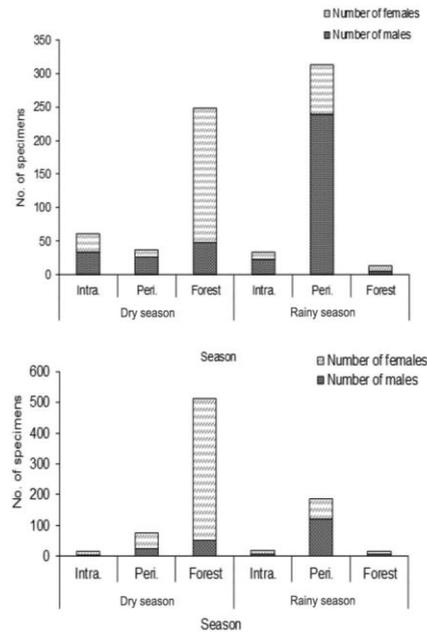


Fig. 2: abundance of male and female Phlebotominae specimens in three environments in Palmas (top) and Taquaruçu (bottom), Brazil, in July (the dry season) and November (the rainy season) of 2014. Intra: intradomestic environment; Peri: peridomestic environment; No: number.

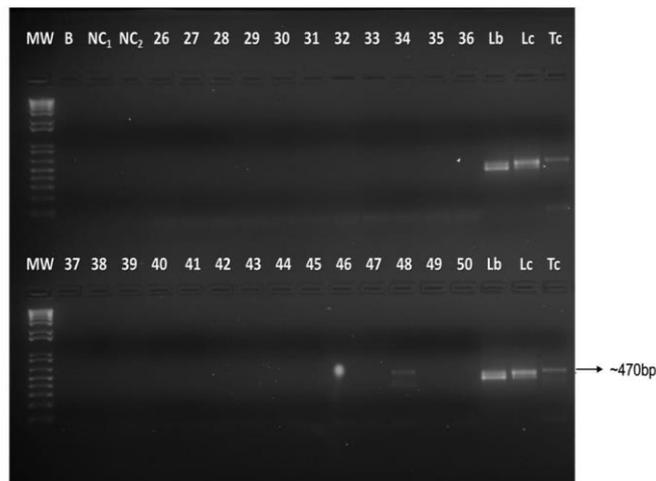


Fig. 3: identification of trypanosomatids in sand fly samples captured in Palmas, Tocantins, Brazil, in July 2014 based on polymerase chain reaction (PCR) directed to the SSU rDNA gene. 26 to 50: sandfly samples. MW: molecular weight marker; positive controls: Tc (*Trypanosoma cruzi*), Lc (*Leishmania infantum*), Lb (*Leishmania braziliensis*). NC: negative control; B: blank.

TABLE IV  
Trypanosomatids identified by sequencing of amplified SSU rDNA products detected in Phlebotominae specimens for the city of Palmas, Tocantins, Brazil, in July (the dry season) and November (the rainy season) of 2014

N°	Species	Location	Habitat	BLASTN	Accession number	Identity
<b>Dry month</b>						
11	<i>Nyssomyia whitmani</i>	Taquaruçu	Forest	<i>Leishmania</i> sp.	gbJX030135.1*	423/425 (99%)
13	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Forest	<i>Leishmania</i> sp.	gbJX030135.1*	419/420 (99%)
16	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Forest	<i>Criethidia fasciculata</i>	gbJDQ182544.1	475/475 (100%)
48	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Intradomicile	<i>Leishmania</i> sp.	gbJX030135.1*	397/398 (99%)
61	<i>Pintomyia christenseni</i>	Taquaruçu	Forest	<i>Trypanosoma</i> sp.	gbJX853185.1*	470/470 (100%)
104	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Taquaruçu	Forest	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	401/401 (100%)
107	<i>Lu. longipalpis</i>	Palmas	Intradomicile	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	416/421 (99%)
114	<i>Ny. whitmani</i>	Palmas	Peridomicile	<i>L. infantum</i>	XR_001203206.1	425/429 (99%)
115	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Peridomicile	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	427/428 (99%)
116	<i>Ny. whitmani</i>	Taquaruçu	Intradomicile	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430 (99%)
119	<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	Taquaruçu	Intradomicile	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430 (99%)
<b>Rainy month</b>						
16	<i>Lu. longipalpis</i>	Palmas	Peridomicile	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	426/429 (99%)
22	<i>Evandromyia walkeri</i>	Palmas	Forest	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430 (99%)
46	<i>Pi. christenseni</i>	Taquaruçu	Peridomicile	<i>L. amazonensis</i>	JX030083.1	429/430 (99%)
48	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	Taquaruçu	Forest	<i>Leishmania</i> sp.	XR_001203206.1/JX030135.1*	135/172 (78%)

BLASTN: basic local alignment search tool; N°: number of pools; \*: the sequence did not allow for species identification. The accession number reported indicates one of the sequences similar to the sequence obtained herein.

IV). In downtown Palmas, *L. infantum* and *L. amazonensis* DNA was detected in *Ny. whitmani* pools and *Lu. longipalpis* pools, respectively (Table IV).

The minimum rates of infection of *Ny. whitmani* (number of positive pools/number of females analysed) by *L. amazonensis* and *L. infantum* in HUs in July (the dry month) were 7%, and 3%, respectively. In November (the rainy month), no *Leishmania*-infected *Ny. whitmani* was detected. The minimum rates of infection of *Lu. longipalpis* by *L. amazonensis* in HUs were 10% in November and 12.5% in July. In November, *Leishmania* sp. was detected in *Bi. flaviscutellata* and *L. amazonensis* was detected in *Ev. walkeri* and *Pi. christenseni* (Table IV).

#### DISCUSSION

The presence of *Leishmania* spp. DNA in six Phlebotominae species from HUs and adjacent gallery forests in downtown Palmas and the Taquaruçu district suggests that the environments are potentially at risk for the *Leishmania* transmission. The results also reveal the role of gallery forests in maintaining *Leishmania* vectors in areas of the Brazilian savanna.

The number of species recorded in this study (30) was similar to the number reported by Machado et al. (2012), who registered 32 species. High Phlebotominae diversity has also been reported in studies performed in different cities in this state (Andrade-Filho et al. 2001, Vilela et al. 2011, 2013). Species such as *Ny. whitmani*, *Bi. flaviscutellata*, and *Lu. longipalpis* are likely to be involved in the transmission of *Leishmania* spp. in Palmas.

Species richness and Phlebotominae occurrence were higher in the rural area (Taquaruçu) than in downtown Palmas. Parallel findings were also reported by Cruz et al. (2013) in Bandeirantes, state of Paraná. Meanwhile, Vilela et al. (2011) also observed high species diversity in rural environments, but the abundance of sand flies was higher in urban environments. These results may be due to the presence of forests close to households and animal housing structures, as well as to the presence accumulated organic matter, all of which provides conditions that are conducive to the establishment of a Phlebotomine reproductive cycle (Quinnell & Dye 1994, Cruz et al. 2013).

Species richness was higher in July (the dry month) than in November (the rainy month) in both locations. Similar findings were reported by Pinheiro et al. (2013) in the state of Rio Grande do Norte and Moraes et al. (2015) in state of Maranhão. In the current study, the soil showed higher amount of organic matter in dry month (see Fig. in Supplementary data). This condition may have contributed to the higher population size in this month and, as a result, to the increase in permanent breeding sites. In the dry month, the preferred habitat among the sand fly specimens was the adjacent gallery forests, where higher numbers of females were captured. In November (the rainy month), most of the specimens captured were found in the peridomestic sites, and there were more males than females. The lower number of phlebotomines in gallery forests was observed in the rainy season when the soil was very soaked (see Fig. in Supplementary data). Probably this environmental condition disturbs the species development in the soil reducing number of breeding sites

and consequently population size. The predominance of females over males in this study differed from the findings of other authors (Vilela et al. 2011, 2013, Cruz et al. 2013, Pinheiro et al. 2013), and this occurred probably due the food source or climatic changes. However, a detailed sex ratio study during a one or two-year period is necessary to test such hypothesis.

PCR has been used in many studies to detect *Leishmania* in Phlebotominae species (Quaresma et al. 2012, Vilela et al. 2013). It is more sensitive than dissection followed by parasitological examination, and it allows for the identification of parasites at the genus, subgenus, and/or species level (Pita-Pereira et al. 2011). The nested PCR technique using SSU rDNA is more sensitive in the detection of trypanosomatids than PCR with ITS1 as a target (El Tai et al. 2000), a factor which would explain the unique positive sample detected using the ITS1 marker. The rates of infection by *Leishmania* in vectors are generally low in nature (Paiva et al. 2006). The average rates remained below 3%, and have rarely reached 10% when evaluated by dissection or PCR (Missawa et al. 2010). Based on this, some of our rates were considered high.

In Taquaruçu, *Leishmania* spp. DNA detected in the *Ny. whitmani* may be from *L. braziliensis*, as *Ny. whitmani* is an important vector of the parasite (Rangel & Lainson 2009). *L. amazonensis* DNA was detected for the first time in *Ny. whitmani*, *Pa. hermanlenti*, and *Pi. christenseni* from this location. It is known that *Ny. whitmani* can be infected experimentally with *L. amazonensis* and may even be a vector of diffuse cutaneous leishmaniasis (Fonteles et al. 2016). Infection by *Leishmania* sp. detected in *Bi. flaviscutellata* from this site may be caused by *L. amazonensis*, given the known association between these species (Rangel & Lainson 2009). *Crithidia fasciculata* DNA was detected for the first time in *Ny. whitmani* from this district, as was DNA of *Trypanosoma* sp. in *Pi. christenseni*. In downtown Palmas, DNA of *L. infantum* was detected in *Ny. whitmani*, and the presence of *L. amazonensis* was detected in *Ev. walkeri* for the first time. Infections of *Ny. whitmani* by *L. infantum* were described in state of Minas Gerais, but the biological interactions involved in this infection need to be investigated to determine the role of this vector in parasite transmission (Margonari et al. 2010). The finding of *L. infantum* DNA in *Lu. longipalpis* at both locations was expected, but *L. amazonensis* DNA was found in this sand fly species. Experiments have revealed the ability of this vector to transmit *L. amazonensis* to hamsters (da Silva et al. 1990), and other studies have detected *L. amazonensis* in *Lu. longipalpis* (Paiva et al. 2006, Savani et al. 2009).

The first records of *L. amazonensis* DNA in *Ny. whitmani*, *Pi. christenseni*, *Pa. hermanlenti*, and *Ev. walkeri* in the city of Palmas suggest the possible involvement of these species in the transmission of the diffuse cutaneous form of the disease in this city, where 169 cases of ACL were reported in recent years (data obtained in cooperation with the Municipal Secretariat of Health). However, the finding of *Leishmania* DNA in sand fly species is not the only condition required to declare it a vector. Species distribution must also coincide with that of the disease in humans; the insect must also be found to be infected in peridomestic and domestic environments; it must feed

regularly on humans and other hosts (Killick-Kendrick 1999), and the interaction between the vector and hosts must be analysed in mathematical models (Ready 2013). However, these reports will allow for a better understanding of the epidemiology of ACL in Palmas, and will also help government health agencies to define the best surveillance and control strategies for this zoonosis.

Though the small number of specimens captured, *Lu. longipalpis* was commonly found in the domestic environments in both downtown Palmas and Taquaruçu. Unlike in Taquaruçu, *Ny. whitmani* was more common in the HUs than in the gallery forests in downtown Palmas, a finding which evidences that this species is able to adapt to environmental changes and to domiciliary environments (Vilela et al. 2011). Furthermore, *Leishmania* spp. DNA was detected in both species in both study areas. It is therefore possible that *L. infantum* and *L. amazonensis* are transmitted by *Ny. whitmani* and that *L. amazonensis* is also transmitted by *Lu. longipalpis* in both locations.

The results indicate that the gallery forests play an important role in maintaining Phlebotomine populations in areas of the Brazilian savanna, particularly during the dry month, when their frequency decreases in household units. *Ny. whitmani*, the main vector of ACL, was frequent in the gallery forests and household units of the study areas, as was *Lu. longipalpis*, a vector of VL. However, *Lu. longipalpis* was rare in the gallery forests, suggesting that the adjacent forests are more important habitats for ACL vectors than VL vectors, and that *L. infantum* cycles are largely independent of these forest environments. The new records of Phlebotominae infections by *Leishmania* species and other trypanosomatid species presented here provide increased knowledge on parasite-vector relations in areas of the Brazilian savanna.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the professors at the Palmas Campus of the IFTO, with special thanks to Octaviano Sidnei Furtado for his partnership in the research; the agents of the Municipal Health Secretariat, Maria do Socorro Cordeiro de Souza and Ademilton Alves Guimarães, for their help with the data on cases of VL and ACL in Palmas, Tocantins; Marcelle Lorrane Silveira Carneiro Brito, the medical researcher on the leishmaniasis technical team of the Tocantins State Department of Health, for releasing the data on visceral leishmaniasis and American cutaneous leishmaniasis in the state; Elisa Neves Vianna and Eunice Aparecida Bianchi Galati for reviewing the final version of the manuscript. Finally, the authors are grateful to the residents of Taquaruçu and Palmas, Tocantins, Brazil, for allowing us into their homes to perform the research.

#### AUTHORS' CONTRIBUTION

RGG, MTO, AJA and TDOM - Study design; RGG, MTO, AJA, TDOM, RVT, LPF, TEV, TTMS, MN, NMCS, ASSJ and TSF - data collection; RGG, MTO, AJA and TDOM - data organisation and analysis; RGG, MTO, AJA, TDOM and NN - paper composition.

#### REFERENCES

- Andrade-Filho JD, Valente MB, de Andrade WA, Brazil RP, Falcão AL. Flebotomíneos do estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34(4): 323-9.
- Bigeli JG, Oliveira Jr WP, Teles NM. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(1): 18-23.
- Cruz CFR, Cruz MFR, Galati EAB. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108(3): 303-11.
- da Silva ALFF, Williams P, Melo MN, Mayrink W. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990; 85(4): 453-8.
- El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(5): 575-9.
- Fonteles RS, Pereira Filho AA, Moraes JL, Kuppinge O, Rebêlo JM. Experimental infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*, etiological agents of American Tugumentary Leishmaniasis. *J Med Entomol.* 2016; 53(1): 206-9.
- Galati EAB. Apostila de bioecologia e identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). 2016. Available from: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>.
- Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: EF Rangel, R Lainson, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.
- Godoy RE, de Santana AL, Graser C, Rangel EF, Vilela ML. Aspects on the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Guaraí, state of Tocantins, Brazil, endemic area for American cutaneous leishmaniasis. *J Med Entomol.* 2017; 54(1): 229-35.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Cidades@*. [updated 2013; cited 2017 fev 27]. Available from: <http://ibge.gov.br/cidadesat/>.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clin Dermatol.* 1999; 17(3): 279-89.
- Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol.* 2002; 11(2): 117-22.
- Machado TO, Bragança MAL, Carvalho ML, Andrade Filho JD. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in different environments in the district of Taquaruçu, state of Tocantins, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(7): 955-9.
- Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol News.* 2007; 118(4): 351-6.
- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol.* 2010; 47(6): 1212-9.
- Missawa NA, Michalsky ÊM, Fortes-Dias CL, Dias ES. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso state, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. *Cad Saude Publica.* 2010; 26(12): 2414-9.
- Moraes JLP, dos Santos CLC, Bastos VJC, Pereira ACN, Moraes LS, Moraes JRL, et al. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em matas ciliares na transição entre a Amazônia úmida e o Nordeste semi-árido do Brasil. *Entomotropica.* 2015; 30(3): 20-9.
- Oliveira IB, Batista HL, Peluzio JM, Pfrimer IA, Rodrigues FM, Carmo Filho JR. Epidemiological and environmental aspects of visceral leishmaniasis in children under 15 years of age between

- 2007 and 2012 in the city of Araguaina, state of Tocantins, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47(4): 476-82.
- Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Trop. 2006; 99(2-3): 252-9.
- Pinheiro MG, Silva JH, Cavalcanti KB, de Azevedo PR, Ximenes MF. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in na agro forestry environment of northeast Brazil. J Vector Ecol. 2013; 38(2): 307-16.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil. Acta Trop. 2011; 120(3): 273-5.
- Quaresma PF, Carvalho GML, Ramos MCNF, Andrade Filho JD. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(4): 480-5.
- Quinnell RJ, Dye C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. Med Vet Entomol. 1994; 8(3): 219-24.
- Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7): 937-54.
- Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu Rev Entomol. 2013; 58: 227-50.
- Savani ESMM, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniases focus in Serra da Bodoquena, Brazil. Vet Parasitol. 2009; 160(1-2): 18-24.
- Teles NM, Agostini MA, Bigeli JG, Noletto RV, Oliveira JD, de Oliveira Jr WP. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in dogs caught in Palmas, TO, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2012; 21(3): 278-82.
- Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. J Eukaryot Microbiol. 1994; 41(4): 324-30.
- Vilela ML, Azevedo CG, Carvalho BM, Rangel EF. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniases in impacted area by hydroelectric plant, state of Tocantins, Brazil. PLoS ONE. 2011; 6(12): 1-7.
- Vilela ML, de Pita-Pereira D, Azevedo CG, Godoy RE, Britto C, Rangel EF. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guarai, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(5): 578-85.

TABLE I  
Phlebotominae specimens collected from household units (HUs) and gallery forests in Palmas, Tocantins, Brazil, in July (the dry season) of 2014 and determined to be positive for infection based on SSU rDNA and ITS1 markers

Species	Household Units				Gallery forests			
	N°*	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR	N°*	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	1	1	0	0	74	12	0	0
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	0	0	3	1	0	0
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	15	5	0	0	3	2	0	0
<i>Evandromyia saulensis</i>	0	0	0	0	5	1	0	0
<i>Evandromyia walkeri</i>	0	0	0	0	15	4	0	0
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	8	6	1	0	2	2	1	0
<i>Micropygomyia villelai</i>	3	3	0	0	0	0	0	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	30	14	4	1	380	42	3	0
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	0	11	2	1	0
<i>Psathyromyia aragaii</i>	0	0	0	0	4	1	0	0
<i>Psathyromyia hermanlenti</i>	4	3	1	0	59	9	0	0
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	0	0	2	1	0	0
<i>Sciopemyia sordellii</i>	4	2	0	0	4	2	0	0
Total	65	34	6	1	562	79	5	0

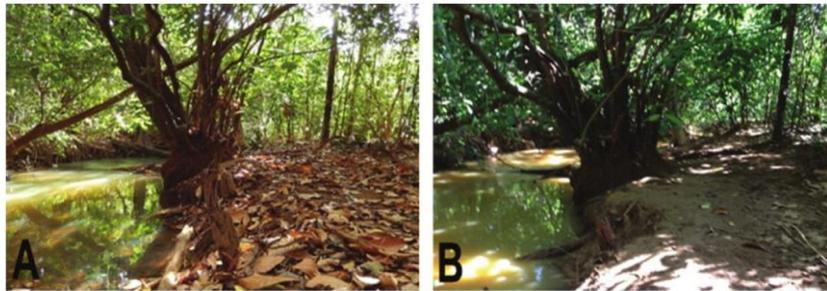
\*: number of specimens.

TABLE II  
Number of Phlebotominae samples collected from household units (HUs) and gallery forests in Palmas, Tocantins, Brazil, in November (the rainy season) of 2014 and determined to be positive for infection based on SSU rDNA and ITS1 markers

Species	Household Units				Gallery forests			
	N°*	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR	N°*	Pools	Nested SSU-PCR	ITS1-PCR
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0	0	0	0	2	2	1	0
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	25	6	0	0	2	1	0	0
<i>Evandromyia evandroi</i>	5	1	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia lenti</i>	5	2	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia sallesi</i>	3	1	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia termitophila</i>	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia walkeri</i>	10	6	0	0	2	1	1	0
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	10	3	1	0	0	0	0	0
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	4	2	0	0	0	0	0	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	48	9	0	0	1	1	0	0
<i>Pintomyia christenseni</i>	3	3	1	0	0	0	0	0
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	0	0	0	2	1	0	0
<i>Psychodopygus davisii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0
Total	115	34	2	0	10	7	2	0

\*: number of specimens.

Supplementary data



Photographs showing difference in the gallery forests during dry and rainy months in Palmas, Tocantins, Brazil. (A) July (dry month) with presence of dry leaves and higher organic matter in the soil. (B) November (rainy month).

## ANEXO B – Protocolo de extração

### Quick Reference Protocol Card

illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit

28-9042-75 (25 purifications)

28-9042-76 (250 purifications)

#### A. Protocol for extraction of genomic DNA from animal tissues

• Ensure 20 mg/ml Proteinase K and RNase A available • Ensure no precipitate present in Lysis buffer type 1. • Ensure ethanol added to Wash buffer type 6 • Ensure Elution buffer type 5 pre-heated to 70°C

🌀:Homogenize ➕:Add ⌚:Spin 🕒:Incubate

##### 1. Homogenization of Animal Tissue

- 🌀 5–50 mg animal tissue into 2 ml microcentrifuge tube
- ➕ 1 ml PBS
- ⌚ 2 minutes 16 000 × g; discard supernatant
- ➕ 50 µl PBS
  - Homogenize (hand-held homogenizer recommended)
- ⌚ 10 seconds 2 000 × g



##### 2. Lysis

- ➕ 50 µl Lysis buffer type 1
- ➕ 10 µl Proteinase K; vortex 15 seconds
- 🕒 1 hour 56°C
  - pre-heat Elution buffer type 5 (200 µl per purification)
- ⌚ 10 seconds 2 000 × g



##### 3. RNA Removal (optional)

- ➕ 5 µl 20 mg/ml RNase A
- 🕒 15 minutes room temperature



##### 4. Purification

- ➕ 500 µl Lysis buffer type 4; vortex 15 seconds
- 🕒 10 minutes room temperature
  - Transfer sample to tissue & cells mini column inside collection tube
- ⌚ 1 minute 11 000 × g; discard flowthrough



##### 5. Wash & Dry

- ➕ 500 µl Lysis buffer type 4
- ⌚ 1 minute 11 000 × g; discard flowthrough
- ➕ 500 µl Wash buffer type 6
- ⌚ 3 minutes 11 000 × g; discard Collection tube



##### 6. Elution

- Transfer column to a new 1.5 ml DNase-free microcentrifuge tube
- ➕ 200 µl pre-warmed Elution buffer type 5
- 🕒 1 minute room temperature
- ⌚ 1 minute 11 000 × g; retain flowthrough
  - Store purified genomic DNA at -20°C

