



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Lívia Maísa Guiraldi

**Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de
cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes
técnicas de diagnóstico**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Botucatu

2020

Lívia Maísa Guiraldi

Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de cativeiro
de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de
diagnóstico

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Guiraldi, Livia Maísa.

Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnóstico / Livia Maísa Guiraldi. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira

Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros

Capes: 40101096

1. Leishmaniose. 2. Primatas não-humanos. 3. Animais de zoológico. 4. Saúde única. 5. Diagnóstico.

Palavras-chave: Diagnóstico; Leishmaniose; Primatas não-humanos; Saúde única; Zoológico.

Dedicatória

Aos meus pais, Sonia e Adroaldo e a minha
irmã, Láisa que são as razões do meu viver! ♥

Agradecimientos

Agradecimento Especial

Agradeço à **Deus** pela oportunidade de realizar este trabalho, pois Teus planos para minha vida são maiores do que eu possa imaginar!

“Sonhos não morrem, apenas adormecem na alma da gente” (Chico Xavier).

Aos meus pais, **Sonia e Adroaldo**! Vocês são os tesouros mais preciosos que tenho em minha vida! Os melhores pais do mundo. Agradeço também, à minha irmã, **Láisa** por todo companheirismo. Toda minha dedicação e trabalho fiz pensando em vocês. Eu os amo e admiro muito. Obrigada por me permitirem realizar este sonho e conquistar tudo que consegui durante essa jornada. A vocês, minha eterna **gratidão** ♡.

À minha avó materna, **Iracema** (vó Cema) que é a estrelinha mais brilhante no céu. Um dia iremos nos reencontrar, mas enquanto isso, olhe por nós e guie sempre nossos passos. Ao meu avô **Albino** (vô Bino), que nunca deixarei de amar. Nunca esquecerei dos cuidados e afetos que tiveram comigo. Com o coração inundado de saudades, mas com as melhores lembranças, obrigada a vocês, minhas estrelinhas ★!

Aos meus avós paternos, **Alice e Renato** por todo amor, carinho e respeito. Somos unidos não só pelos laços familiares, mas também pelo coração! Olhem por nós e permaneçam em nossos pensamentos, obrigada!

Meu primo (ok, é o favorito), **Percinho**! Muito mais do que um primo, é um irmão mais velho com o qual aprendi muito em minha vida. Ao meu tio, **Pércio** que um dia me disse para sempre ficar tranquila pois ele sempre estaria por perto. Pois é tio, você sempre se faz presente em todos os momentos da minha vida, à você minha eterna gratidão!

Ao amor da minha vida, **Wesley J. Santos**, por todo o companheirismo e cumplicidade. Grande parte da realização dessa conquista, devo à você!

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.” (Carl Sagan). **You are my person, you will Always be my person.** ♡

Agradecimentos

Agradeço aos pais do Wesley, **Maristela e Edison** e também à sua irmã, **Sthéfany** por se fazerem presentes e auxiliarem durante esse processo. Obrigada por cuidarem e educarem a pessoa mais especial na minha vida, o Wesley. Gratidão!

À tia **Sirley** e a **Giovana** pela cumplicidade e generosidade de sempre,
grata!

Obrigada a você, **Eliana** por sempre cuidar do meu maior tesouro que é minha família! Você é a amiga que todos mereciam ter por perto, muito obrigada!

À melhor professora que já conheci, **Gislaine** (Gi)! Com você aprendi o amor pela ciência e o interesse em cursar biologia! Me inspiro muito em você. Gi, você faz parte dessa conquista!

A minha melhor amiga de infância para vida toda, **Talita** (Tabi). Quantas vezes você me ouviu e me aconselhou a não desistir. Pois é amiga, essa jornada é bem complicada, mas quem tem uma amiga ao lado, aconselhando e incentivando, não tem do que reclamar! Você é muito especial. Quem diria que aquelas menininhas que sorteavam a próxima brincadeira do dia se tornariam doutoras e amigas fiéis para sempre? Te amo, migs 

Ao meu amigão, **Sebastião** (Tião)! O doutor mais humano que eu conheço. A pessoa dos abraços mais calorosos e aconchegantes. Sempre que preciso, sei que posso contar com você. Meu caro amigo, obrigada!

À querida e amiga, **Bruna Jorgetto**, por toda atenção, carinho e auxílio durante todo esse trabalho. Seu carisma sempre me auxiliando foi fundamental para conclusão desta pesquisa!

Ao **Nelson de Souza Nogueira Filho** por toda consideração e por sempre nos atender da melhor maneira possível!

Ao **Ricardo Andrade Zampieri**, por sempre se disponibilizar em enriquecer este trabalho com seu conhecimento ímpar! Obrigada por toda a ajuda.

A musa das biomédicas, **Tatiane** (Thaty, ou professora loirinha)! Como eu gosto de você! Obrigada pelas risadas e todos os momentos que passamos juntas. Agradeço também aos seus irmãos, **Renato** (Rêee), **Larissa** (Lari) e **Francisco** (Kiko), admiro muito essa família linda.

A mocinha equatoriana, colombiana e libanesa mais brasileira que conheço, **Nur**! Obrigada por estar junto a mim nessa caminhada que foi meu doutorado. Seus olhinhos sempre gentis e seus docinhos deliciosos me incentivaram a chegar até aqui. Queria te guardar em um potinho, de tanta fofura! Muito obrigada querida Nur, te adoro!

Agradeço de coração à essa menina moça que tive o prazer em ter ao meu lado, **Isabella** (Isa, Aisas, Bella, Zapabella)! Dividir um projeto de pesquisa com você foi a melhor escolha dessa jornada. Você não só me auxiliou no desenvolvimento deste trabalho cientificamente, como também esteve sempre comigo com seu bom humor e felicidade contagiante. Com você tive as melhores “briguinhas” das quais só se tem com verdadeiros amigos que são como irmãos. Te admiro muito!

À minha querida amiga, **Suzane** (Su)! Ahh Su, se as pessoas no mundo tivessem metade de sua bondade, com certeza o mundo seria muito melhor. Palavras não são suficientes para agradecer-lá por toda a ajuda que você me proporcionou. Tenho certeza que seu futuro será brilhante! Te agradeço de todo coração por você ser exatamente quem és e por ser tão especial!

À minha companheirinha de sempre, **Emilly** (Imelai para os íntimos rsrs)! Obrigada por estar presente me auxiliando durante todo este período. Você é uma

peessoa muito guerreira, estudiosa, responsável e dedicada. Tenho muito orgulho de tê-la como amiga, a você minha eterna gratidão!

Agradeço à **Diana** por todos os momentos de conversas e sorrisos compartilhados. Desejo muitas realizações durante sua jornada!

À mais novata do Lasab, mas tão especial quanto todos, **Thainá**! A moça mais fotogênica que conheço (rsrsrs). Embora não tivemos tanto tempo de convivência, pude perceber o quão inteligente e responsável você é! Obrigada por dividir essa história comigo!

Ao **Pedro e a Laysla**, que mesmo não sendo do Lasab, é como se pertencessem a ele (rsrs)! Agradeço a vocês por compartilharem essa viagem comigo. Ao Pedro, mais conhecido por desvendar os mistérios mais rapidamente do que as próprias pessoas que formularam o mistério e a Laysla (quem chamou a Laysla para os rolês?), que se tornou especial em minha vida. Obrigada também pelos melhores rolês sossegados com pão caseiro e cafezinho, além dos melhores “papos cabeças” que tenho com vocês!

Quero agradecer “as meninas” **Maria Fernanda e Mirian** que nunca deixaram de ser lasabianas! Vocês são demais. Devo a vocês o que aprendi na prática de um laboratório e como desenvolver um projeto de pesquisa. Aliás, ainda estou aguardando o lançamento do livro da vida de vocês, pois desconheço quem tenha melhores histórias e experiências de vida como vocês! Com todo meu carinho, obrigada!

A peruana que conhece o Brasil melhor do que muitos brasileiros, **Gabriela**! Obrigada pelas melhores conversas! Te estimo muito.

Ao **Marcelo e a Amanda** que tive o prazer de compartilhar momentos inesquecíveis. Obrigada por tudo!

A mulher que faz as melhores RIFIs do universo, **Daniela** (Dani)! Muito obrigada por todos os momentos de sinceridade e aprendizagem.

À toda equipe da **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Apta de Bauru** pelos dias de companheirismo e convivência. As melhores festinhas de aniversários e com as melhores risadas pude compartilhar com vocês, muito obrigada!

Obrigada a toda equipe do Instituto **Adolfo Lutz de Bauru** por sempre me receber de portas-abertas. É sempre muito gratificante fazer parte do time da “creche da Virgínia”. Vocês todos são sensacionais!

À minha querida gêmea do sorriso mais lindo, **Débora** (Dérbis)! O que dizer dessa pessoinha especial? Você sempre me ouviu nos piores e melhores momentos de ser uma pós-graduanda. Me deu os melhores conselhos para a vida! Te amo, guerreira!

A mais internacional de todas, **Bárbara** (Bah)! Que alegria ter você durante esse percurso. Bah, você é linda e extraordinária! O seu brilho e entusiasmo não podiam ficar restritos apenas no Brasil, por isso você foi voar para outros lugares e enriquecer sua bagagem de experiências. Obrigada até mesmo pelos fins de semana me ajudando no laboratório!

À **Aghata** (Gah) por nossas conversas (científicas ou não). Você foi imprescindível no desenvolvimento dessa pesquisa. Sorte a minha ter você nessa caminhada. A você, agradeço!

Muito obrigada à **Laís Yamada** (pseudo-nipônica)! Quanto carisma vejo em você. Sempre disposta a me auxiliar. Você é uma excelente amiga, desejo que alcance todos os seus sonhos!

Agradeço também, a **Laís** (Acre rsrsrs) que esteve presente na minha caminhada. Te admiro como pessoa e como profissional! Você é a pessoa mais

dedicada que conheço. Obrigada por compartilhar vários momentos comigo, inclusive congressos. Você é a melhor guia turística que Campinas já teve! Obrigada.

À querida **Natássia** (Naty)! Você é uma pessoa extremamente guerreira. Obrigada por todas as conversas e momentos que compartilhamos.

A mocinha do nome mais bonito, **Lorena**! Sim, foi isso que eu te disse assim que nos conhecemos “você tem um nome muito bonito”, mas eu mal sabia que a detentora deste nome era tão bonita quanto ele. Obrigada!

Meu muito obrigada a você, **Alessandra**! Você é uma pessoa muito dedicada e atenciosa! Sempre se desdobrando para dar conta de tudo, te admiro!

A mais novata da “creche”, **Amanda**! Você esbanja simpatia. Sua fé é contagiante. Desejo o melhor em sua vida. Obrigada por estar presente!

Meu imenso agradecimento aos amigos da **faculdade (Unesp/Bauru)**! Nos tornamos uma família unida. Sou muito grata a vocês. Todos do nosso “grupinho” são especiais para mim! Amo imensamente cada um: **Nathália** (branquelinha); **Maíce** (pipoquinha); **Stéphanie** (Thé); **Gabriela** (dark) e **Danilo** (Dan). Uma pessoinha que eu não poderia deixar de fazer um agradecimento sincero e especial (eu nem fui cobrada para isso rs), à minha querida companheira, **Aneli** (japa)! Lembro-me o quanto chorei quando você se mudou de Bauru, mas eu sabia que mesmo à quilômetros de distância, nossa amizade sempre existiria. Obrigada por ser exatamente como és, uma pessoa doce e educada. Sempre dando dicas preciosas na minha metodologia e graças as suas dicas, consegui concluir este trabalho. Muito obrigada!

À todos os membros da **banca examinadora**, titulares e suplentes, os quais foram escolhidos à dedo para este momento especial em minha vida! Agradeço por compartilharem todo o conhecimento de vocês, visando o avanço da ciência!

Obrigada ao suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho, da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**. E aos funcionários dos **Zoológicos** e **Centro de Conservação** pelas coletas e envio das amostras, muitíssimo obrigada.

Sou grata aos **primatas não-humanos** amostrados neste trabalho. O avanço científico depende muito de vocês. Cabe a nós, cientistas, compreender e estudar as heranças da evolução sob o ponto de vista micro e macroscópico. Obrigada por serem nossos irmãos não tão distantes assim, fico feliz em pertencer a mesma ordem que vocês e não ser superior, pois somos todos Primatas!

Agradeço a toda equipe do CENP e Zoológicos pela disponibilidade na execução desta pesquisa.

Agradeço a minha co-orientadora, **Maria Izabel** (Bel)! Que alegria compartilhar tantos momentos com você. Ahhh Bel se você soubesse o quanto te admiro como mulher, como pessoa e profissional. Você é simplesmente sensacional. Sou muito agradecida por te-la em minha vida, querida!

À minha co-orientadora, **Virgínia**! Quantos ensinamentos você me proporciona. Quando eu crescer, quero ser igual a você! Você é aquela pessoa que encanta só por existir! Quantas vezes você nos salvou e permitiu que continuássemos com nossas pesquisas quando a falta de material nos aterrorizava. À você meu agradecimento aos ensinamentos científicos e ao companheirismo durante todo este tempo!

Não sei nem por onde começar a agradecer a uma pessoa essencial durante o desenvolvimento não apenas dessa pesquisa, mas desde a minha iniciação científica em 2012. A você, minha escolha certa de orientação, **Simone**! Não consigo expressar o quanto devo do conhecimento que adquiri durante esses oito anos de experiência juntas! Se há oito anos eu soubesse onde chegaria, diria para aquela garotinha no auge dos seus 20 anos, que a escolha da orientadora estava certíssima. No começo cheguei cheia de dúvidas e hoje saio com a certeza de que fiz a escolha certa, que você Simone, se tornou especial, amiga e companheira.

Obrigada, obrigada e obrigada!





"Não posso dar a nenhum cientista de qualquer idade melhor conselho do que este: a intensidade da convicção de que uma hipótese é verdadeira não tem nenhuma relação com se é ou não verdadeira"

(Peter Medawar)



Resumo

Resumo

GUIRALDI, LM. **Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnóstico.** 2020. 284f. Tese (Doutorado). – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

Leishmanioses são zoonoses ocasionadas por protozoários da Família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*, tendo como vetor diferentes espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Além dos humanos, animais domésticos e silvestres de vida livre e de cativeiro, podem naturalmente se infectar pelo protozoário, podendo atuar como reservatórios, incluindo os primatas não humanos (PNH). Neste trabalho o objetivo foi a pesquisa de *Leishmania* spp. em 189 PNH cativos, provenientes de quatro zoológicos e um centro de conservação das cinco regiões brasileiras, por meio do diagnóstico direto em esfregaço por extensão sanguínea; Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para pesquisa de anticorpos contra o parasito; Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para amplificação do DNA do protozoário nas amostras de sangue e células conjuntivais; caracterização molecular com o uso de alvos gênicos direcionado ao citocromo de *Leishmania* spp. com posterior sequenciamento genético para identificação da espécie envolvida na infecção e a discriminação de espécies de *Leishmania* por análises de dissociação de DNA em alta resolução (HRM). Foram observadas formas amastigotas por diagnóstico direto de quatro primatas. Oito PNH foram reagentes à técnica sorológica de RIFI. A detecção molecular nas amostras de sangue mostrou positividade em 22 PNH e a detecção nas amostras de suabes conjuntivais também foi possível em 22 PNH (sendo cinco deles positivos tanto no sangue como no suabe), em todos os locais amostrados, exceto da região Sul. Para pesquisa de família Trypanosomatidae, recomenda-se o uso de *primers* direcionados a região V7 e V8 do rRNA que amplificou o DNA em 16 PNH. O DNA de *L. infantum* foi amplificado em seis animais, bem como a amplificação do DNA de *L. braziliensis* em nove PNH. Para caracterização molecular, recomenda-se o uso de *primers* direcionados às sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (CoxII) de *Leishmania* spp., permitindo a identificação de *L. infantum* em 13 delas. Este é o primeiro trabalho que obteve êxito na utilização da técnica de HRM na discriminação de espécies de *Leishmania* em amostras de PNH,

revelando 11 animais com *L. infantum*, e cinco positivos para *L. braziliensis*. Considerando os resultados de todas as técnicas propostas (parasitológico; sorológico e molecular (cPCR de sangue e células conjuntivais), as análises pontuais dos casos positivos revelaram que na região Norte do país foi a que apresentou maior porcentagem de PNH positivos para *Leishmania* spp. (60%), seguida das regiões Sudeste (35,41%), Centro-Oeste (30,5%) e Nordeste (29,62%). A região Sul não apresentou nenhum animal positivo. Os resultados desse estudo evidenciam a infecção natural por parasitos *Leishmania* spp. em animais silvestres e apesar do papel dos PNH na epidemiologia das leishmanioses deva ser melhor esclarecido, os resultados sugerem a participação dos PNH na manutenção do ciclo de transmissão em áreas onde a doença é endêmica. Estes animais devem ser levados em consideração para o estabelecimento de medidas de vigilância e controle da doença no contexto *One Health* visando a participação dos animais (domésticos e silvestres), do homem e do meio ambiente para o entendimento dos processos de saúde e doença contribuindo para o bem-estar comum.

Palavras-chave: diagnóstico; leishmanioses; primatas não humanos; saúde única; zoológico.

Abstract

Abstract

GUIRALDI, LM. **Research of *Leishmania* spp. in captive primates from five Brazilian regions by different diagnostic techniques**. 2020. 284f. Thesis (Doctor). – Medical School Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, 2020.

Leishmaniasis are zoonoses caused by protozoa of the Family Trypanosomatidae and of the genus *Leishmania*, having different vector species of sandflies belonging to the genus *Lutzomyia* in the Americas and *Phlebotomus* in the Old World. Besides humans, domestic and free ranging or captive wild mammals can naturally become infected by *Leishmania* spp., and can act as reservoirs, including non-human primates (NHP). The work aimed the research of *Leishmania* spp. in 189 captive PNH, from four zoos and one conservation center from five Brazilian regions, by direct microscopy research in blood smears; Immunofluorescent Antibody Test (IFAT), to search for antibodies against the parasite; Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) for the amplification of protozoan DNA from blood samples and conjunctival cells; molecular characterization with the use of gene targets directed to the cytochrome of *Leishmania* spp. with subsequent genetic sequencing to identify the species involved in the infection and the identification of *Leishmania* species by High resolution melt (HRM) analyzes. Through the first technique, it was observed amastigotes forms in four primates. Eight PNH were reagents by the IFAT serological technique. Molecular detection in blood samples was positive in 22 NHP and detection in conjunctival swab samples was also possible in 22 NHP (five of which were positive both in blood and swab), in all sampled locations, except in the southern region. For Trypanosomatidae family research, it is recommended to use primers directed to the V7 and V8 regions of the rRNA that amplified the DNA in 16 NHP. The DNA of *L. infantum* was amplified in six animals, as well as the amplification of the DNA of nine primates for *L. braziliensis*. For molecular characterization, it is recommended the use of primers directed to sequences of the oxidase subunit II (coxII) cytochrome gene of *Leishmania* spp., allowing the identification of *L. infantum* in 13 of them. This is the first research that has been successful in using the HRM technique to discrimination *Leishmania* species in NHP samples, revealing in 11 animals with *L. infantum* and five animals positive for *L. braziliensis*. Considering the results of all the proposed techniques (parasitological; serological and molecular – cPCR and conjunctival cells), the punctual analyzes of positive cases revealed that the Northern region of the country was the one with the

highest percentage of NHP positive for *Leishmania* spp. (60%), followed by the Southeast (35.41%), Midwest (30.5%) and Northeast (29.62%) regions. The South region did not present any positive animals. The results of this study evidences the natural infection by *Leishmania* spp. parasites in wild animals e and despite the role of NHP in the epidemiology of leishmaniasis should be better clarified, the results obtained suggests the participation of NHP in maintaining the transmission cycle in areas where the disease is endemic. These animals must be taken into consideration for the establishment of disease surveillance and control measures in the context of *One Health* to complete the participation of animals (domestic and wild), man and the environment for the understanding of health and disease processes, contributing for the common welfare.

Keywords: diagnosis; leishmaniasis; non-human primates; One Health; zoo.

Lists

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μL – Microlitro
- μm – Micrometro
- APTA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
- B.O.D - Demanda Bioquímica de Oxigênio
- BA – Salvador
- BHI - *Brain Heart Infusion*
- BLASTn - *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*
- BPI - Biotecnologia Pesquisa e Inovação
- Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CENP - Centro Nacional de Primatas do Pará
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLIOC FIOCRUZ - Coleção de Leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
- CoXII - Citocromo da subunidade II da oxidase
- cPCR/PCR - Reação em Cadeia da Polimerase convencional
- CT - *Cycle Threshold*/Limiar do Ciclo
- CytB – Citocromo B
- CytC – Citocromo C
- DAT – Teste de Aglutinação Direta
- DF – Distrito Federal
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*/ Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- FITC - Isotiocianato de Fluoresceína
- FJZB - Fundação Jardim Zoológico de Brasília
- g – Grama
- HRM - *High Resolution Melting*
- ICMBio - Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade
- ID – Identificação

- IEC - Instituto Evandro Chagas
- IgG - Imunoglobulina G
- KCl - Cloreto de potássio
- kDNA - DNA do Minicírculo do Cinetoplasto
- LASAB - Laboratório de Sanidade Animal de Bauru
- LIT - *Liver Infusion Tryptose*
- LTDA – Limitada
- M – Mol
- MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
- Mg – Miligrama
- mL – Mililitro
- Mm – Milímetro
- mM – Milimolar
- MMA - Ministério do Meio Ambiente
- Na₂ - Óxido de sódio
- Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NNN - Novy, MacNeal, Nicolle
- °C - Grau Celsius
- PA – Pará
- Pb – Par de base
- PBS - *Phosphate-Buffered Saline*
- pH - Potencial Hidrogeniônico
- PNH – Primatas Não Humanos
- PR – Paraná
- qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- QSP – Quantidade Suficiente Para
- RCF – *Relative Centrifugal Force*
- RPM – Rotação por Minuto
- RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
- RJ – Rio de Janeiro
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RPM – Rotação por Minuto

- SAA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento
- SDS – *Sodium Dodecyl Sulfat*
- SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
- SP – São Paulo
- SST - Solução Salina Tamponada
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TBE - Tris-borato-EDTA
- T_m - Temperatura de *melting*/dissociação
- Tris – Tris (hidroximetil) aminometano
- UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- USA - *United States of America*
- USP - Universidade de São Paulo
- UV – Ultravioleta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo das leishmanioses passando pelo inseto vetor e hospedeiro vertebrado. Fonte: arquivo pessoal.	39
Figura 2: Tríade na visão <i>One Health</i> , em que existe uma conexão entre o ser humano, animais e meio ambiente compartilhado. Fonte: arquivo pessoal.	48
Figura 3: Organograma experimental com todas as etapas da pesquisa. Fonte: arquivo pessoal.....	66
Figura 4: Locais de colheita de amostras dos PNH. Foram amostrados animais de um centro de conservação e de quatro zoológicos representando as cinco regiões brasileiras. Fonte: arquivo pessoal.	67
Figura 5: Colheita de material biológico. Em A, punção venosa a partir da veia femoral. Em B, fricção de suabe na conjuntiva inferior para obtenção de células. Fonte: arquivo pessoal.	75
Figura 6: Representação do espaço de transcrição interno (ITS) da região ribossomal. A demarcação no esquema, representa a região ITS-2. Fonte: modificado de el Tai et al., 2000.....	80
Figura 7: Repetição do <i>mini-exon</i> de <i>Leishmania</i> spp.. Cada repetição contém um <i>exon</i> altamente conservado (39 pb), uma região de <i>ínteron</i> transcrita moderadamente variável (55 a 101 pb) e uma sequência espaçadora não transcrita e altamente variável (51 a 341 pb). A localização dos <i>primers</i> Fme e Rme é indicada pelas setas. Fonte: modificado de Marfurt et al., 2003.	80
Figura 8: Mapa com a localização e tamanho dos fragmentos de DNA dos <i>amplicons</i> 1 e 2 utilizados neste trabalho. A numeração indica o posicionamento dos fragmentos com relação à sequência completa do gene HSP70. Fonte: arquivo pessoal embasado e modificado a partir de Zampieri, 2019.	88
Figura 9: Lâmina de extensão sanguínea do primata PA03 da espécie <i>Ateles marginatus</i> (macaco-aranha-de-cara-branca) do plantel do Centro de Conservação de Primatas no Pará com formas sugestivas de amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. Em A e B ninhos de amastigotas. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal).	92
Figura 10: Lâmina de extensão sanguínea com formas sugestivas de amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. Em A, primata do zoológico de Salvador – BA14. Em B, primata do zoológico de Sorocaba – SP42. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal).	93
Figura 11: Lâmina de extensão sanguínea do primata do zoológico de Sorocaba – animal SP28. Em A, pode-se visualizar formas sugestivas de amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. Em B (animal SP28), aglomerado de formas suspeitas de amastigotas. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal).	93
Figura 12: Demonstração das amostras positivas no estudo para as diferentes regiões alvo empregadas. Fonte: arquivo pessoal.	99
Figura 13: Representação dos oito PNH reagentes à técnica sorológica de RIFI e comparação com os resultados da PCR das amostras de sangue. Desses oito, dois foram reagentes e positivos tanto na RIFI como na PCR; três foram reagentes apenas na RIFI, mas não na PCR e em três animais foi realizado apenas a RIFI por apresentarem somente amostras de soro. Fonte: arquivo pessoal.	101
Figura 14: Esquema das 22 amostras de células conjuntivais dos PNH que amplificaram fragmentos de DNA com o uso de todos os <i>primers</i> empregados na pesquisa.	106

Figura 15: Comparação dos resultados positivos das amostras de sangue e células conjuntivais na PCR para pesquisa de Família Trypanosomatidae.	110
Figura 16: Esquemas de todas as amostras de sangue dos PNH que amplificaram com os <i>primers</i> direcionados aos citocromos de <i>Leishmania</i> spp.. Fonte: arquivo pessoal.....	117
Figura 17: Todas as 21 amostras amplificadas com o <i>primer</i> direcionado às sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (<i>maxicircle</i> -kDNA). Dessas, 18 amplificaram a partir do sangue e cinco pelo suabe da conjuntiva inferior. Duas amostras amplificaram tanto pelo sangue como pelo suabe. No total, 18 amostras foram sequenciadas, 15 a partir do sangue e três pelo suabe das células da conjuntiva. Fonte: arquivo pessoal.	122
Figura 18: <i>Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method</i> . A história evolutiva foi inferida usando o método <i>Maximum Likelihood</i> e <i>Tamura 3-parameter model</i> (Tamura, 1992). A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada ao lado dos ramos. A (s) árvore (s) inicial (is) para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando o método <i>Maximum Parsimony</i> . Esta análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas (<i>complete deletion option</i>). As análises evolutivas foram realizadas pelo Mega X (Kumar et al., 2018).	125
Figura 19: Amostra DF 53, primata do zoológico de Brasília da espécie <i>Saguinus bicolor</i> (Sauim-de-coleira); não foi possível detectar DNA de <i>Leishmania</i> nessa amostra utilizando essa metodologia. Fonte: arquivo pessoal.	126
Figura 20: Curvas de dissociação apresentada entre as espécies de <i>Leishmania</i> utilizadas como controles positivos da reação. Em amarelo, curva de <i>melting</i> da espécie <i>L. infantum</i> ; em vermelho de <i>L. amazonensis</i> e em azul curva de <i>L. braziliensis</i> . Os valores de temperatura pré- <i>melting</i> foram definidos entre 82,7°C e 83,0 °C e os valores pós- <i>melting</i> entre 88,5°C e 88,8°C (sempre respeitando até 3°C de diferença). Os valores de temperatura pré- <i>melting</i> e pós- <i>melting</i> foram ajustados a fim de se excluir a máximo os ruídos que poderiam resultar em interpretações equivocadas. A figura ilustra as curvas de dissociação referentes ao <i>Amplicon</i> 1. Fonte: arquivo pessoal.	127
Figura 21: Valores de CT (<i>Cycle Threshold</i>) das amostras e dos controles no <i>amplicon</i> 1. Fonte: arquivo pessoal.	128
Figura 22: Gráfico de dispersão representativo dos valores individuais de Tm das cepas padrão de <i>Leishmania</i> e das amostras. Notar que as Tms das amostras ficaram próxima da Tm exibida pela cepa de <i>L. infantum</i> . Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o <i>software</i> GraphPad PRISM v. 6.02.....	129
Figura 23: Gráfico de dispersão representativo dos valores individuais de Tm das cepas padrão de <i>Leishmania</i> e das amostras. Notar que as Tms das amostras ficaram próxima da Tm exibida pela cepa de <i>L. infantum</i> . Cada espécie foi testada em duplicata. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o <i>software</i> GraphPad PRISM v. 6.02.	129
Figura 24: Gráfico de dispersão representativo dos valores individuais de Tm das cepas padrão de <i>Leishmania</i> e das amostras. Notar que as Tms das amostras ficaram próxima da Tm exibida pela cepa de <i>L. infantum</i> . Cada espécie foi testada em duplicata. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o <i>software</i> GraphPad PRISM v. 6.02.	130
Figura 25: Gráfico de dispersão com média e desvio padrão dos valores de Tm. Cada espécie foi testada em duplicado em três experiências independentes utilizando 50 ng de DNA para cada espécie de referência. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o <i>software</i> GraphPad PRISM v. 6.02.....	130

Figura 26: Amostra BA39 do zoológico de Salvador, primata da espécie *Alouatta caraya* (Bugio-preto) apresentou sinal de fluorescência com valor mais alto quando comparados com o de *L. infantum*, porém a análise do valor de Tm (da amostra e da cepa controle de *L. infantum*) apresentaram valores bem próximos (Tm BA39 85,7°C e Tm *L. infantum* 85,6°C). Fonte: arquivo pessoal..... 131

Figura 27: Curvas de dissociação resultante da reação em cadeia da polimerase em tempo real seguida de análise de dissociação de alta resolução (HRM) com *primers* direcionados ao gene HSP70 de *Leishmania* spp. e analisadas pelo *Software* v.3.0.1 (Life Technologies, USA). A seta roxa indica a curva de dissociação referente à amostra BA37, um primata do zoológico de Salvador da espécie *Sapajus flavius* (macaco-prego-dourado) com valor de Tm de 85,4°C. A seta em amarelo indica a curva de dissociação da cepa controle de *L. infantum*, com valor de Tm de 85,3 no *amplicon* 1. Observar que as curvas se alinham e os valores de Tm estão muito próximos. Fonte: arquivo pessoal..... 132

Figura 28: Curvas de dissociação resultante da reação em cadeia da polimerase em tempo real seguida de análise de dissociação de alta resolução (HRM) com *primers* direcionados ao gene HSP70 de *Leishmania* spp. e analisadas pelo *Software* v.3.0.1 (Life Technologies, USA). As setas indicam as curvas de dissociação referentes à amostra BA37, um primata do zoológico de Salvador da espécie *Sapajus flavius* (macaco-prego-dourado) com valor de Tm de 85,4°C e da cepa controle de *L. braziliensis* com Tm de 85,5°C no *amplicon* 2. Porém, a análise do CT apresenta uma amplificação tardia no *amplicon* 2, indicado tratar-se de *L. infantum*. Fonte: arquivo pessoal. 133

Figura 29: Curvas de dissociação da amostra SP01, primata do zoológico de Sorocaba, da espécie *Alouatta caraya* (bugio-preto) e da cepa controle de *L. braziliensis* no *amplicon* 2. Fonte: arquivo pessoal. 134

Figura 30: Curvas de dissociação da amostra SP03, primata do zoológico de Sorocaba, da espécie *Alouatta caraya* (bugio-preto) e da cepa controle de *L. braziliensis* no *amplicon* 2. Fonte: arquivo pessoal. 134

Figura 31: Amostras PA02; PA03; PA05; SP47 e DF 56 foram classificadas como “Variantes” por não apresentarem Tm compatíveis com as cepas utilizadas como controles positivos da reação (*L. infantum*; *L. amazonensis* e *L. braziliensis*). Portanto, não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* nessas amostras. Fonte: arquivo pessoal. 135

Figura 32: Fluxo metodológico com análise combinatória de perfis de dissociação dos três *amplicons* de HSP70. Fonte: arquivo pessoal adaptado de Zampieri (2019). 160

Figura 33: Registros fotográficos do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoológico Salvador). Em A, ilha dos primatas da espécie *Sapajus xanthosternus* (macaco-prego-de-peito-amarelo). O local é aberto e não contém grades, permitindo a livre circulação de insetos vetores. Em B, representante da espécie *Sapajus xanthosternus*. Em C, representantes da espécie *Ateles marginatus* (macaco-aranha-de-testa-branca) e em D, exemplar da espécie *Ateles paniscus* (macaco-aranha-de-cara-vermelha) que fizeram parte deste estudo. Fonte: arquivo pessoal. 272

Figura 34: Registros fotográficos do Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zoológico Sorocaba). Em A, registros da ambientalização da ilha dos primatas. Em B e C, recintos protegidos com telas que não permitiam a circulação de insetos vetores. Como a visita foi realizada em abril de 2018, haviam muitos casos de febre amarela no estado de São Paulo, embora dificultasse a visualização dos primatas destes recintos, eles estavam bem protegidos contra a infecção. Em D primata da espécie *Ateles marginatus* (macaco-aranha-de-testa-branca) e em E, primata da espécie *Brachyteles arachnoides* (muriqui-do-sul). Fonte: arquivo pessoal. 273

Figura 35: Registros fotográficos do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba (Zoológico Curitiba). Em A e D, exemplares que fizeram parte da pesquisa da espécie *Ateles chamek* (macaco-aranha-de-cara-preta). Em B, contenção física do primata *Callithrix penicillata* (sagui-de-tufo-preto) e em C, coleta de

material biológico (sangue) da veia femural do primata *Sapajus apella* (macaco-prego). Fonte: arquivo pessoal. 274

Figura 36: Registros fotográficos do Jardim Zoológico de Brasília (Zoológico Brasília). Em A, ilha dos primatas. Em B, exemplar da ilha dos primatas da espécie *Sapajus libidinosus* (macaco-prego-amarelo). Em C, primata da espécie *Aotus nigriceps* (macaco-da-noite). Em D, coleta de sangue da veia braquial de um *Alouatta caraya* (bugio-preto). E em E, primata da espécie *Alouatta seniculus* (bugio-vermelho). Fonte: arquivo pessoal. 275

Figura 37: Lâmina de extensão sanguínea do primata PA09 com formas sugestivas de *Plasmodium* spp. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal). 276

Figura 38: Mamíferos silvestres que não fazem parte do plantel dos primatas do zoológico de Brasília e que vivem na mata ao entorno se alimentando. Fonte: arquivo pessoal. 281

Figura 39: Ilha dos primatas do zoológico de Salvador. A imagem A demonstra que o recinto é aberto e arborizado, permitindo a circulação de insetos vetores. Em B, nota-se a presença de aves, como exemplo de patos, que defecam nesse ambiente, tornando-o rico em matéria orgânica, favorável ao desenvolvimento de flebotomíneos. Fonte: arquivo pessoal. 282

Figura 40: Ilha dos Primatas dos quatro zoológicos visitados. Em A, ilha pertencente ao zoológico de Salvador. Em B, do zoológico de Brasília. Em C, espaço no zoológico de Sorocaba. Em D e E, ilha do zoológico de Curitiba. Fonte: arquivo pessoal. 283

Figura 41: Recintos com grades de aço dos quatro zoológicos do estudo. Em A, zoológico de Brasília. Em B, recinto do zoológico de Curitiba. Em C, zoológico de Salvador. Em D, zoológico de Sorocaba. Fonte: arquivo pessoal. 284

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gêneros e número de animais amostrados no presente estudo por localidade.	69
Tabela 2: Espécies de primatas amostrados do Zoológico de Salvador	71
Tabela 3: Espécies de primatas amostrados do Zoológico de Sorocaba.....	72
Tabela 4: Espécies de primatas amostrados no Zoológico de Curitiba.....	72
Tabela 5: Espécies de primatas amostrados no zoológico de Brasília.....	73
Tabela 6: Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> empregados na análise molecular, tamanho dos fragmentos amplificados (pb) e a temperatura (T°C) de anelamento de cada <i>primer</i>	83
Tabela 7: <i>Amplicons</i> utilizados na técnica de HRM	86
Tabela 8: Total de amostras biológicas (Sangue; soro; lâmina sanguínea e suabe conjuntival) de cada local amostrado.	90
Tabela 9: Número de lâminas e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.	91
Tabela 10: Primatas, por localidade, com presença de lâminas de extensão sanguínea sugestivas de <i>Leishmania</i> spp.	91
Tabela 11: Porcentagem de animais positivos ao teste parasitológico de lâmina de extensão sanguínea.	92
Tabela 12: Número de amostras de soro e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.	94
Tabela 13: Amostras reagentes à RIFI com conjugado IgG de cabra anti-humano.....	94
Tabela 14: Porcentagem de animais reagentes à RIFI de cada local do estudo.	95
Tabela 15: Número de amostras de sangue e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.....	96
Tabela 16: Animais, por localidade, com amostras de sangue amplificadas com <i>primers</i> SSU561F/SSU561R para pesquisa de Família Trypanosomatidae. Partes destacadas na tabela indicam os PNH com lâminas compatíveis com formas amastigotas do parasito neste estudo.	96
Tabela 17: Animais, por localidade, com amostras de sangue amplificadas com <i>primers</i> LCS1 e LCS3 para pesquisa de <i>Leishmania infantum</i>	97
Tabela 18: Animais, por localidade, com amostras de sangue amplificadas com <i>primers</i> B1 e B2 para pesquisa de <i>Leishmania braziliensis</i>	98
Tabela 19: Todas as amostras de sangue amplificadas na cPCR.	98
Tabela 20: Porcentagem de positividade na cPCR das amostras de sangue de cada local estudado.	100
Tabela 21: Animais positivos em todas as técnicas utilizadas neste estudo. Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal foi positivo em mais de uma técnica utilizada.	100

Tabela 22: Número de amostras de células conjuntivais/suabes e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.	102
Tabela 23: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com <i>primers</i> L5.8SR/LITSV para pesquisa de Família Trypanosomatidae.	102
Tabela 24: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com <i>primers</i> SSU561F/SSU561R para pesquisa de Família Trypanosomatidae.	103
Tabela 25: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com <i>primers</i> FME/RME para pesquisa de gênero <i>Leishmania</i> spp.	103
Tabela 26: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com <i>primers</i> LCS1/LCS3 para pesquisa de <i>Leishmania infantum</i>	104
Tabela 27: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com <i>primers</i> B1/B2 para pesquisa de <i>Leishmania braziliensis</i>	104
Tabela 28: Todas as amostras de células conjuntivais amplificadas na cPCR. Partes destacadas na tabela indicam os primatas que também foram positivos na cPCR com amostras de sangue.	105
Tabela 29: Porcentagem de positividade na cPCR das amostras de células conjuntivais (suabes) de cada local estudado.	107
Tabela 30: Todos os primatas positivos nesta pesquisa ao teste molecular de cPCR das amostras de sangue e células conjuntivais (suabes). Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal amplificou com ambos os materiais biológicos (sangue e suabe).	107
Tabela 31: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR para Família Trypanosomatidae. Partes destacadas indicam quando o mesmo animal apresentou amostras de sangue e suabe positivas.	109
Tabela 32: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR para <i>L. infantum</i> . Partes destacadas indicam quando o mesmo animal apresentou amostras de sangue e suabe positivas. .	111
Tabela 33: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR para <i>L. braziliensis</i>	111
Tabela 34: Animais positivos em todas as técnicas utilizadas neste estudo. Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal foi positivo em mais de uma técnica utilizada.	112
Tabela 35: Porcentagem de positividade dos 189 PNH amostrados com as técnicas parasitológica; sorológica e molecular (sangue e células conjuntivais) em cada local estudado.	114
Tabela 36: Amostras de sangue amplificadas com o uso dos <i>primers</i> CytBF1 e CytBR2.	115
Tabela 37: Amostras de sangue amplificadas com o uso dos <i>primers</i> CytOxIIF1/CytOxIIR2.	115
Tabela 38: Amostras de sangue amplificadas com <i>primers</i> direcionados aos citocromos de <i>Leishmania</i> spp.	116
Tabela 39: Amostras de células conjuntivais amplificadas com o uso dos <i>primers</i> CytCF3/CytCR2.	118
Tabela 40: Amostras de células conjuntivais amplificadas com o uso dos <i>primers</i> CytOxIIF1/CytOxIIR2.	118

Tabela 41: Amostras de células conjuntivais amplificadas com <i>primers</i> direcionados aos citocromos de <i>Leishmania</i> spp. Parte destacada indica quando a amostra de um mesmo animal amplificou com mais de um <i>primer</i> empregado.	119
Tabela 42: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas para citocromo da subunidade II da oxidase (coxII). Partes destacadas indicam quando o animal apresentou tanto sangue como células conjuntivais positivos.	120
Tabela 43: Todas as amostras (sangue e células conjuntivais) amplificadas com o uso do <i>primer</i> CytOxIIF1/CytOxIIR2. Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal amplificou tanto no sangue como no suabe.	121
Tabela 44: Amostras de sangue sequenciadas pelo método de <i>Sanger</i> com os <i>primers</i> CytOxIIF1/CytOxIIR2 que amplificam sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (<i>maxicircle</i> -kDNA) de <i>Leishmania</i> spp. com identidade dos produtos confirmada como <i>Leishmania infantum</i>	123
Tabela 45: Valores do índice de <i>Silhouette Score</i> de todas as amostras testadas na técnica de HRM.	126
Tabela 46: Valores de média e desvio padrão das amostras nos três experimentos independentes. A média e o desvio padrão referem-se aos experimentos em duplicata das amostras. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o <i>software</i> GraphPad PRISM v. 6.02.	131

Sumário

Sumário

1 Introdução	38
1.1 Leishmaniose Visceral (LV)	40
1.2 Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Mucocutânea	44
1.3 <i>One Health</i> (Saúde Única) nas leishmanioses	47
1.4 Métodos de Diagnóstico	50
1.5 Leishmanioses em Primatas Não Humanos (PNH)	53
1.6 Leishmanioses nos locais do estudo	57
2 Objetivo	63
2.1 Objetivo geral	63
2.2 Objetivos específicos.....	63
3 Material e Métodos	65
3.1 Considerações éticas, autorizações, declarações e apoio financeiro	65
3.2 Local da realização dos exames	66
3.3 Organograma experimental	66
3.4 Locais Amostrados - Centro de Conservação (CENP) e Zoológicos (Zoo) da Pesquisa	67
3.4.1 Centro de Conservação	67
3.4.2 Zoológicos	68
3.4.2.1 Parque Zoobotânico Getúlio Vargas	68
3.4.2.2 Parque Municipal Quinzinho de Barros.....	68
3.4.2.3 Jardim Zoológico Municipal de Curitiba	68
3.4.2.4 Jardim Zoológico de Brasília	69
3.5 Animais do estudo	69
3.5.1 Animais do Centro Nacional de Primatas (CENP - Pará).	71
3.5.2 Animais do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoológico Salvador)	71
3.5.3 Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zoológico Sorocaba)	71
3.5.4 Animais do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba (Zoológico Curitiba)	72
3.5.5 Animais do Jardim Zoológico de Brasília (Zoológico Brasília)	72
3.6 Colheita de sangue e secreção conjuntival.....	73
3.7 Exame parasitológico	75
3.7.1 Lâminas de extensão sanguínea	75
3.8 Exame Sorológico	75
3.8.1. Antígenos de <i>Leishmania</i> (L.) <i>infantum</i> ; <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> e <i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i>	75
3.8.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	76

3.9 Análises Moleculares.....	76
3.9.1 Extração do DNA para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. a partir de amostras de sangue.....	77
3.9.2 Extração do DNA para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. a partir de amostras de suabe conjuntival.....	77
3.9.3 Quantificação do DNA.....	77
3.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR).....	77
3.9.4.1 Avaliação da integridade do DNA extraído e inibição da PCR	78
3.9.4.2 cPCR de sangue total e células conjuntivais	79
3.9.5 Eletroforese em gel de agarose	81
3.9.6 Caracterização molecular (das amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR) com o uso de alvos gênicos direcionado ao Citocromo de <i>Leishmania</i> spp.....	82
3.9.7 Sequenciamento - Método de Sanger.....	83
3.9.8 Inferências filogenéticas.....	84
3.9.9 Discriminação de espécies de <i>Leishmania</i> por Análises de Dissociação de DNA em Alta Resolução (HRM)	85
4 Resultados	90
4.1 Animais do estudo.....	90
4.2 Exame parasitológico	90
4.2.1 Lâminas de extensão sanguínea	90
4.3 Exame Sorológico	94
4.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	94
4.4 Análises Moleculares.....	95
4.4.1 Quantificação do DNA.....	95
4.4.2 Avaliação da integridade do DNA extraído e inibição da PCR.....	95
4.4.3 cPCR de sangue total	96
4.4.3.1 cPCR para amplificação do gênero <i>Leishmania</i> spp:	97
4.4.3.2 cPCR espécie-específica para detecção de <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> :	97
4.4.4 cPCR de Células Conjuntivais (a partir de suabes).....	102
4.4.4.1 cPCR para amplificação do gênero <i>Leishmania</i> spp:	103
4.4.4.2 cPCR espécie-específica para detecção de <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> :	104
4.4.4.1 Comparação dos resultados moleculares das amostras de sangue e células conjuntivais.....	107
4.4.4.2 Comparação dos resultados: parasitológico, sorológico e molecular (sangue e suabe)	112
4.4.5 Caracterização molecular com o uso de alvos gênicos direcionado ao Citocromo de <i>Leishmania</i> spp.....	114
4.4.5.1 Caracterização molecular das amostras de sangue positivas na cPCR	114

4.4.5.2 Caracterização molecular das amostras de células conjuntivais (suabes) positivas na cPCR	117
4.4.5.2 Comparação dos resultados da caracterização molecular das amostras de sangue e células conjuntivais.....	119
4.4.6 Sequenciamento - Método de <i>Sanger</i>	121
4.4.7 Inferências filogenéticas.....	124
4.4.8 Discriminação de espécies de <i>Leishmania</i> por Análises de Dissociação de DNA em Alta Resolução (HRM)	125
5 Discussão.....	138
5.1 Diagnóstico parasitológico.....	138
5.2 Diagnóstico sorológico	142
5.3 Diagnósticos moleculares.....	145
5.3.1 Diagnóstico por cPCR.....	145
5.3.1.1 cPCR do sangue	146
5.3.1.2 cPCR de suabe conjuntival	147
5.3.2 Caracterização molecular	152
5.3.3 Diagnóstico por HRM.....	157
5.3.4 Positividade geral entre as técnicas parasitológica, sorológica e molecular (sangue e suabe conjuntival) em todos os locais pesquisados	161
5.4 Medidas de vigilância e controle das leishmanioses sob o contexto <i>One Health</i>	168
5.5 Considerações finais	169
6 Principais dificuldades encontradas e limitações do trabalho.....	169
7 Conclusões.....	172
Referências	175
Manuscrito.....	216
Anexos	239
Apêndices.....	262

Introdução

1 Introdução

A ordem Kinetoplastida inclui protozoários flagelados que apresentam cinetoplasto, uma estrutura que contém DNA extracelular condensado (De Souza et al., 2017). Dentro dessa ordem, destaca-se a Família Trypanosomatidae, a qual inclui diversos agentes etiológicos responsáveis por ocasionar doenças em humanos e outros animais (Stevens et al., 2001; Paiz et al., 2015). A família Trypanosomatidae é um grupo bastante diversificado que engloba diversas espécies de protozoários pertencentes a diferentes gêneros. Dentre os membros dessa família, ressaltam-se os pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, os quais apresentam ciclo de vida complexo envolvendo hospedeiros vertebrados e insetos vetores (Tirlens e Hellemond, 1998).

As leishmanioses são doenças negligenciadas e consideradas um sério problema em Saúde Pública. Endêmica em 102 países (PAHO, 2019a), cuja estimativa é de 700.000 a 1 milhão o número de novos casos a cada ano, destes 20.000 a 30.000 mortes ocorrem por ano, sendo classificada em nono lugar dentre as doenças infecciosas (WHO, 2018a). De acordo com a espécie e a relação do protozoário com o hospedeiro, pode apresentar diferentes doenças (Gontijo e Carvalho, 2003). Dentre elas, destacam-se a leishmaniose visceral (LV), leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose cutânea ou também conhecida por leishmaniose tegumentar (WHO, 2020).

A transmissão do parasito ocorre por diferentes espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero: *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo (De Assis et al., 2014). A infecção ocorre quando a fêmea do mosquito conhecido popularmente como mosquito-palha (ou birigui/cangalha) ao realizar o repasto sanguíneo, transmitem as formas infectantes do parasito (promastigotas) ao organismo vertebrado.

Nos flebotomíneos, o hábito de hematofagia é exclusivo das fêmeas, uma vez que são elas que necessitam de sangue para a maturação de seus ovos. Assim, quando se alimentam, a fêmea do mosquito ingere células do sistema mononuclear fagocitário (como exemplo dos neutrófilos, monócitos, células dendríticas derivadas de monócitos e macrófagos) infectadas com formas amastigotas (Kaye e Scott, 2011). No trato digestório do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas e há

uma colonização dessas formas. Estas formas flagelares, após rápida multiplicação e estágios de diferenciação morfológicas, se convertem em promastigotas metacíclicas infectantes e ao realizar o repasto sanguíneo em outros vertebrados, as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas dos insetos vetores. Uma vez no organismo do mamífero, tais formas são fagocitadas pelos fagócitos e em seu interior perdem seus flagelos residindo na forma de amastigotas quando então são encontrados nos tecidos (Gushi, 2008) (Figura 1). O período de incubação das leishmanioses em humanos varia de dez dias a vinte e quatro meses, tendo uma incubação média entre dois e seis meses (Brasil, 2006).

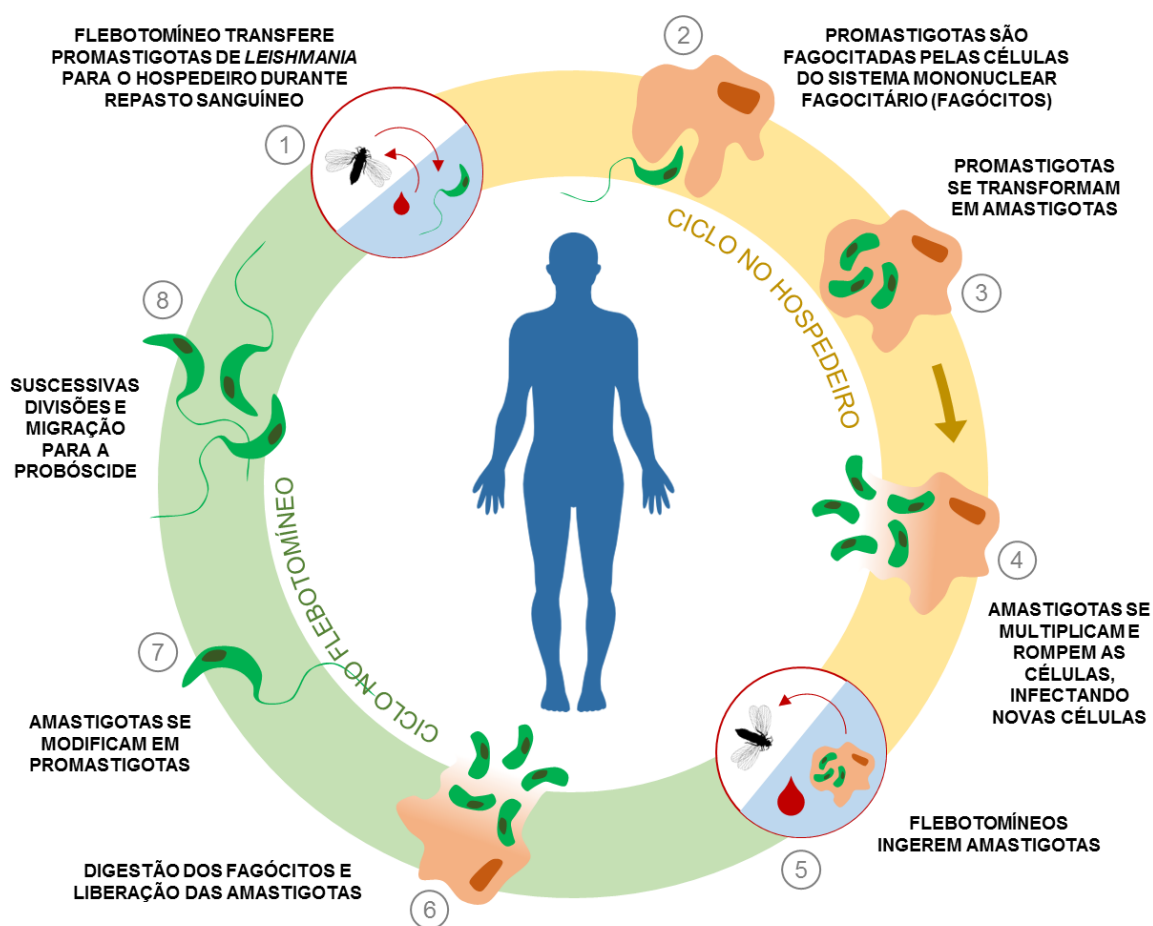


Figura 1: Ciclo das leishmanioses passando pelo inseto vetor e hospedeiro vertebrado. Fonte: arquivo pessoal.

Atualmente, devido às alterações climáticas, migração da população e pela dificuldade na eliminação da infecção em animais que agem como reservatório do parasito, as leishmanioses ganharam destaque entre as doenças emergentes (Longoni et al., 2011; Salem et al., 2020). O desmatamento e as adaptações

comportamentais dos vetores e reservatórios têm contribuído para a expansão da doença no Brasil, com destaque ao elevado número de animais infectados, no ambiente urbano e silvestre (Ferreira et al., 2015a; Castro et al., 2020). Diversas espécies de vetores flebotomíneos têm se adaptado a diferentes habitats, deixando de existir apenas no ambiente silvestre e sendo encontradas também próximas às habitações humanas (Rosário et al., 2017; Uzcátegui et al., 2020).

1.1 Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é uma zoonose caracterizada por ser uma doença crônica e considerada a mais grave. Endêmica em 98 países, tendo uma alta incidência principalmente nos países em desenvolvimento e em especial nas regiões tropicais e subtropicais. Noventa por cento dos casos mundiais estão concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil, onde 200 milhões de pessoas apresentam riscos de contrair a doença anualmente (WHO, 2018b). Atualmente, a estimativa de LV é de 50 mil a 90 mil novos casos todos os anos em todo o mundo (WHO, 2019).

O Brasil apresenta 97% de todos os casos de LV que acontecem nas Américas (PAHO, 2019b) e o perfil epidemiológico tem sofrido alterações ao longo de tempo devido à crescente urbanização e uma ocupação desordenada levando a condições de vida precária, que contribuiu para que novos casos da doença sejam notificados (Oliveira et al., 2016; Reis et al., 2017). Alguns fatores ambientais, como luminosidade, umidade e médias de temperatura anual têm contribuído para o avanço na transmissão e sua expansão geográfica (Marcondes e Rossi, 2013).

No país, a LV é ocasionada pela espécie *Leishmania (L.) infantum*. Apesar dos cães domésticos (*Canis familiaris*) serem considerados os principais reservatórios urbanos, outras espécies de animais também podem se infectar (Fernandes et al., 2013). Dentre os mamíferos que se infectam naturalmente pela *Leishmania*, incluem os domésticos (Gramiccia, 2011; Arbeláez et al., 2020) e silvestres (Alcover et al., 2020), de vida livre (Arias e Naiff, 1981; Brandão-Filho et al., 2003; Quintal et al., 2011) e de cativeiro (Santiago et al., 2007;). Além dos cães (Barros et al., 2019; Carvalho et al., 2019; Herrera et al., 2019), trabalhos na literatura têm encontrado outros animais domésticos que apresentam infecção natural pelo protozoário *L. infantum*, como gatos

(Alves-Martin, 2017; Headley et al., 2019; Sousa et al., 2019); bovinos e equinos (Paixão-Marques et al., 2019; Escobar et al., 2020).

Animais silvestres também se infectam de forma natural por *L. infantum*, sendo que no ciclo silvestre os principais reservatórios são canídeos, cachorro-domato (*Cerdocyon thous*) e gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*), podendo participar na rede de transmissão para outros animais, incluindo humanos (Brasil 2006; WHO, 2010; Kuhls et al., 2011). O trabalho de Paiz e colaboradores, (2015) demonstrou evidência sorológica de infecção natural por *L. infantum* também nas espécies de mamíferos silvestres: *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufos-brancos), *Lepus europaeus* (lebre-comum), *Sphiggurus villosus* (ouriço-cacheiro), *Nasua nasua* (quati-de-cauda-anelada), *Eira barbara* (Irara) e *Galictis cuja* (furão-pequeno).

A infecção por *L. infantum* também já foi relatada nas espécies de carnívoros silvestres: *Meles meles* (texugo-europeu), *Vulpes vulpes* (raposa-vermelha), *Felis silvestres* (gato-selvagem), *Mustela putorius* (furão) e *Canis lupus* (lobo-cinzento) (Del Río et al., 2014) além dos roedores silvestres das espécies *Apodemus sylvaticus* (rato-do-campo), *Rattus rattus* (rato-preto) e *Mus musculus* (camundongo) que também se infectam naturalmente pelo parasito (Navea-Pérez et al., 2015).

No estado do Pará, localizado na região Norte do Brasil, também foi identificada a infecção por *L. infantum* em amostra de medula óssea de um Tamanduá-Mirim (*Tamandua tetradactyla*) no quintal de uma residência localizada em uma região endêmica para a doença na bacia amazônica (Araújo et al., 2013). Os trabalhos citados anteriormente reforçam a participação de diferentes espécies de animais silvestres como hospedeitos e reservatórios do protozoário.

Durante muitos anos, poucos relatos da doença foram registrados no Brasil, e os casos que ocorriam estavam restritos aos ambientes rurais. Neste período, casos da doença em humanos estavam relacionados com uma suposta transmissão a partir de marsupiais e outros mamíferos silvestres que atuam como reservatórios do parasito. Porém, a partir dos anos 80, o Brasil apresentou uma urbanização da doença que teve uma disseminação territorial atingindo principalmente as cidades de médio e grande porte das regiões nordeste, sudeste e centro-oeste (Conti et al., 2016; Luz et al., 2019).

Com o passar do tempo, a definição de reservatório tem sofrido alterações, tornando-se necessário um amplo estudo de zoonoses, sendo que há um grande problema em Saúde Pública envolvendo a doença, especialmente devido à complexidade de sua epidemiologia, já que na natureza o parasito pode ser mantido por várias espécies de mamíferos. Torna-se necessário o esclarecimento de uma rede de transmissão, incluindo hospedeiros mamíferos não-humanos, para que se tenha um controle efetivo. Embora na literatura há relatos de uma variedade de espécies de mamíferos infectadas com o protozoário, apenas uma minoria delas é capaz de manter o parasito e ter um papel na sua transmissão. Dessa forma, a transmissão de *Leishmania* spp. na natureza ainda representa uma incógnita, pois um reservatório representa um sistema ecológico que pode ser uma ou um complexo de espécies responsáveis por manter o parasito, o qual pode ser transmitido durante um período de tempo (Roque e Jansen, 2014).

No Brasil, a LV tem sido relatada em todas as regiões e com diferentes taxas de prevalência, tendo se adaptado às áreas urbanas e peri-urbanas (Cerbino Neto et al., 2009). Casos autóctones já foram registrados em alguns estados do Brasil (exceto Rondônia, Acre e Amazonas) (Brasil, 2019a), em especial no Nordeste, região que concentra mais de 90% de casos de leishmaniose em humanos. Há também, casos em outras regiões, como Norte, Sudeste e Centro-Oeste (Abreu et al., 2015; Pinheiro et al., 2020).

No Nordeste, os humanos compartilham o mesmo ambiente que os animais que servem de reservatórios, e também com os vetores de leishmanias, o que contribui para a expansão da doença (Pimentel et al., 2015). A LV é considerada endêmica nessa região brasileira (Sousa et al., 2018) e a região é responsável por 44,5% dos casos que ocorrem em todo o país (Brasil, 2018a), sendo que entre os anos de 2007 e 2017 foram registrados 41.263 casos (SINAN, 2019).

Dados de 2001 a 2017 mostram que no Brasil foram registrados 53.715 casos humanos, sendo as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil foram as áreas mais afetadas e que apresentaram maior risco de transmissão (Azevedo et al., 2019).

Entre os anos de 2018 e 2019, foram registrados no país 5.995 casos de LV (sendo 3466 registros em 2018 e 2529 em 2019). As regiões mais afetadas foram o Nordeste, o Norte e a região Sudeste (Secretaria da saúde, 2020).

As manifestações clínicas da LV em humanos e em cães são semelhantes e se caracterizam por febre irregular, anemia, perda de peso e caquexia nos estágios finais. Em cães, são evidentes descamações da epiderme que ficam localizadas principalmente na região periocular e/ou auricular ou difusa por todo corpo, despigmentação cutânea, alopecia, pelame seco, hiperqueratose e lignificação observadas nas áreas de proeminência óssea, miocardite, distúrbios de locomoção, hemorragias espontâneas, onicogribose, lesões oculares, disfunções urinárias, hepáticas e neurológicas (Marcondes et al., 2006), despigmentação do focinho, blefarite e ceratoconjuntivite (Da Silva et al., 2017).

Um elevado número de cães infectados pode não apresentar sinais clínicos compatíveis com a doença, mesmo após um longo período de incubação. Estes animais são considerados assintomáticos, mas ainda assim podem atuar como reservatórios do parasito e com probabilidade de transmitir a doença, caso haja vetores no mesmo ambiente (Felipe et al., 2011).

Já as alterações clínicas em animais silvestres (incluindo PNH), manifestam-se com emagrecimento, membranas mucosas pálidas, hepatomegalia, linfadenopatia, edema nos pulmões, hemorragias na pele, no pulmão, no coração e no intestino (Beck et al., 2008, Luppi et al., 2008, Malta et al., 2010).

Nos últimos anos, muitos esforços foram realizados para controlar a disseminação da doença, porém em algumas áreas (em especial a região nordeste) os casos de LV aumentaram e em outros locais onde a doença não ocorria (principalmente a região sul), passaram a apresentar registros de novos casos (Sales et al., 2019). Essa disseminação pode ter ocorrido devido à degradação ambiental que tem se tornado constante, o que forçou os vetores a se adaptarem ao ambiente modificado, passando a ser encontrado próximo das residências, aumentando o risco de transmissão nessas áreas (Antonini et al., 2017).

1.2 Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Mucocutânea

A Leishmaniose Tegumentar (LT) envolve a leishmaniose cutânea e a mucosa ou mucocutânea) e ocorre tanto nos países do Novo Mundo, como do Velho Mundo (Reithinger et al., 2007). Tem como agente causador no ambiente urbano no Velho Mundo principalmente a espécie *Leishmania tropica*, enquanto em ambientes mais secos e de áreas desérticas, a principal espécie é *Leishmania major*. A transmissão da LT no Velho Mundo é realizada por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*. Já a LT que ocorre na América Latina, é ocasionada por protozoários de dois subgêneros: *Leishmania*, incluindo *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis*; e o subgênero *Viannia*, como por exemplo *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (Markle e Makhoul, 2004). No Brasil, a espécie *L. braziliensis* é a principal responsável por ocasionar a leishmaniose mucocutânea, em que há o comprometimento das mucosas do indivíduo (WHO, 2018c).

A forma mais comum da doença é a LT e 95% dos casos ocorrem nas Américas, na Bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e também na Ásia Central. No ano de 2018, a maioria dos casos se concentraram nos países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, República Árabe da Síria e Tunísia. A estimativa dos casos de LT é de 600.000 a 1 milhão de casos anualmente em todo mundo. Já em relação aos casos de leishmaniose mucocutânea, 90% deles ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e no Peru (Brasil, 2017).

A leishmaniose mucocutânea ocorre em aproximadamente 20 países americanos, e é considerada endêmica em 18 deles (PAHO, 2017), incluindo o Brasil onde a estimativa de casos é de 72.800 a 119.600 anualmente (Alvar et al., 2012). No ano de 2016, foram confirmados 687.780 casos humanos da doença no país (MS, 2016). Embora casos de LT e leishmaniose mucocutânea estejam diminuindo no país, a doença ainda causa impactos na saúde pública (Bezerra et al., 2018). Tais impactos são resultados dos surtos epidêmicos que ocorrem em todas as regiões do país (Coelho-Neto et al., 2012; Rocha et al., 2015; Cardoso et al., 2019; Sales et al., 2019; Uzcátegui et al., 2020).

No Brasil, já foram descritas sete espécies de *Leishmania* responsáveis pela LT, sendo seis delas pertencentes ao subgênero *Viannia* e apenas uma do subgênero *Leishmania*. As três espécies de maior ocorrência são: *Leishmania* (L.)

amazonensis, que tem uma maior distribuição na floresta amazônica, em especial nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e no sudoeste do Maranhão, mas a sua ocorrência também já foi registrada nas regiões nordeste, sudeste e centro-oeste com casos na Bahia, Minas Gerais, São Paulo e em Goiás respectivamente. Outra espécie de grande ocorrência no país, é *Leishmania* (V.) *guyanensis* que tem uma representação um pouco mais limitada à região norte da Bacia Amazônica, com casos no Amapá, Roraima, Amazonas e Pará. A terceira espécie é *Leishmania* (V.) *braziliensis*, com uma ampla distribuição no país, ocorrendo desde o sul do Pará ao Nordeste do país, com casos descritos nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco, se estendendo também para regiões do Centro-Oeste, com casos em Mato Grosso do Sul e no Sudeste brasileiro, encontrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Brasil, 2017).

Trabalhos apontam também a participação das espécies *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *naiffi*, *Leishmania* (V.) *lindenberg* e *Leishmania* (V.) *shawi* principalmente na região Norte (Figueira et al., 2017; Lainson, 2010; Basano e Camargo, 2004; CVE, sem data).

De acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Brasil, 2017), dependendo da espécie do parasito envolvido na infecção, tem-se diferentes manifestações clínicas: forma cutânea ocasionada pelas espécies: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, *L. lindenberg*, *L. shawi* e *L. naiffi*; forma cutânea disseminada tendo como principal agente *L. braziliensis*; a forma cutânea difusa tendo como agente causal *L. amazonensis* e a forma mucosa (ou mucocutânea) ocasionada por *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

A LTA tem como vetores diferentes espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo que na América do Sul, as principais espécies responsáveis pela transmissão do parasito são *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia migonei* (Peterson e Shaw, 2003).

Na literatura há registros da infecção por tripanosomatídeos tanto em animais domésticos (Carneiro et al., 2020) como também animais silvestres (Lima et al., 2012; Tenório et al. 2014), inclusive no Brasil. Os animais domésticos podem ser considerados importantes durante estudos epidemiológicos, podendo representar um papel na disseminação do agente em locais peridomociliares, principalmente onde o

número de vetores é abundante (Aguilar et al., 1989). Casos da doença já foram descritos em equínos (Aguilar et al., 1989), cães e gatos de áreas tropicais e subtropicais, apontando que estes animais desenvolvem sintomas da doença com pápulas ou nódulos únicos, que podem evoluir para lesões ulcerativas. O estudo de Paniz e colaboradores (2019) sugere um potencial papel na transmissão zoonótica e revela a necessidade de uma melhor caracterização dos reservatórios e vetores enzoóticos uma vez que animais domésticos podem contribuir nos casos da doença no ser humano em áreas domésticas e peridomésticas.

No ciclo silvestre, os animais comumente infectados são os pertencentes à superordem Xenarthra, à subclasse Metatheria, às ordens Carnivora, Didelphimorphia e também os da ordem dos Primatas. Não se pode descartar um ciclo enzoótico selvagem e o papel do homem como fonte de infecção (Furtado et al., 1994).

No ambiente silvestre, *L. braziliensis* é mantida por roedores e marsupiais (Sales et al., 2019), além de outros vários pequenos mamíferos selvagens terrestres (Brandão-Filho et al., 2003). Já os principais reservatórios silvestres de *L. guyanensis* são: preguiça-real (*Choloepus didactylus*); tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá-comum (*Didelphis marsupialis*) (Dedet et al. 1989). Os resultados do trabalho de Medkour e colaboradores (2019) identificaram também PNH da espécie *Alouatta seniculus* como potenciais reservatórios dessa espécie de parasito. O trabalho sugere que o ciclo silvestre da LTA ocorre no nível do dossel das florestas, onde encontram-se os principais reservatórios e vetores do protozoário.

Os reservatórios silvestres, como exemplo dos gambás-comum (*D. marsupialis*), apresentam uma especial importância principalmente em regiões de mata que sofreram alteração pela ação do homem (Lainson e Shaw, 1998), uma vez que esses animais se alimentam dos resíduos alimentares domésticos em florestas próximas das habitações humanas (Barret e Senra, 1989), podendo trazer a infecção do ambiente florestal (silvestre) para o ambiente humano, servindo de fonte de infecção para os flobotomíneos ali presentes (Andrade, 1997), permitindo um elo entre o ciclo silvestre e peridomicílio (Guerra et al., 2006).

No país, além das espécies vetoras *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* trabalhos estão relatando a presença do vetor *Nyssomyia intermedia* infectados por *L. braziliensis*, revelando a participação dessa espécie no ciclo de

transmissão urbano e periurbano da leishmaniose. Estes trabalhos revelaram a presença dessa espécie vetorial nos estados do Rio de Janeiro (Souza et al., 2019), Paraná (Santos et al., 2009), Minas Gerais (Costa et al., 2019) e Pernambuco (Sales et al., 2019).

As manifestações clínicas da LT diferem de acordo com a espécie do parasito e sua relação com o hospedeiro, podendo ser assintomática ou apresentar úlceras na pele ou mucosas. Essas úlceras podem curar-se espontaneamente ou evoluir para quadros clínicos mais graves, podendo haver comprometimento da vida do hospedeiro (David e Craft, 2009). As manifestações clínicas da leishmaniose mucocutânea são destruições parcial ou total das membranas mucosas, sendo as regiões mais afetadas no nariz, boca e garganta (WHO, 2018c).

1.3 *One Health* (Saúde Única) nas leishmanioses

Na visão *One Health*, existe uma tríade de conexão entre: o ser humano, animais e meio ambiente compartilhado (Figura 2) e para sua compreensão, é preciso o estudo de uma rede integrada entre várias disciplinas do conhecimento, visando a saúde pública e o bem-estar comum. A saúde única fornece uma compreensão global das disciplinas anteriormente distintas, como a medicina humana, a medicina veterinária, ciência ambiental e a conservação da vida silvestre (Palatnik-de-Sousa e Day, 2011). O conceito *One Health* propõe um melhor entendimento dos processos de saúde e doença, com um conhecimento mais amplo na detecção, prevenção e controle das infecções e os problemas relacionados à interface humano-animal-ambiente, contribuindo para um equilíbrio sustentável (Cunningham et al., 2017; Destoumieux-Garzón et al., 2018; Schneider et al., 2019).

Além do *One Health*, o conceito *EcoHealth* também deve ser lembrado. O contexto *One Health* é mais fundamentado entre a transmissão da doença entre humano-animal e um pouco menos focado no papel do meio ambiente na relação da saúde humana e animal. Diferentemente do *One Health*, o *EcoHealth* tem em seus fundamentos que o bem-estar humano depende do meio ambiente (Lebel, 2003) e se preocupa principalmente entre os humanos e o ecossistema (Charron, 2012).

Embora existam diferenças teóricas importantes entre os objetivos das abordagens *One Health* e *EcoHealth*, a convergência entre ambas é que para tratar

de forma eficaz as doenças, deve-se levar em consideração ambos os contextos (*One Health* e *EcoHealth*) que envolvem as questões complexas da saúde humana, dos animais e o ecossistema como um todo (Harisson et al., 2019).

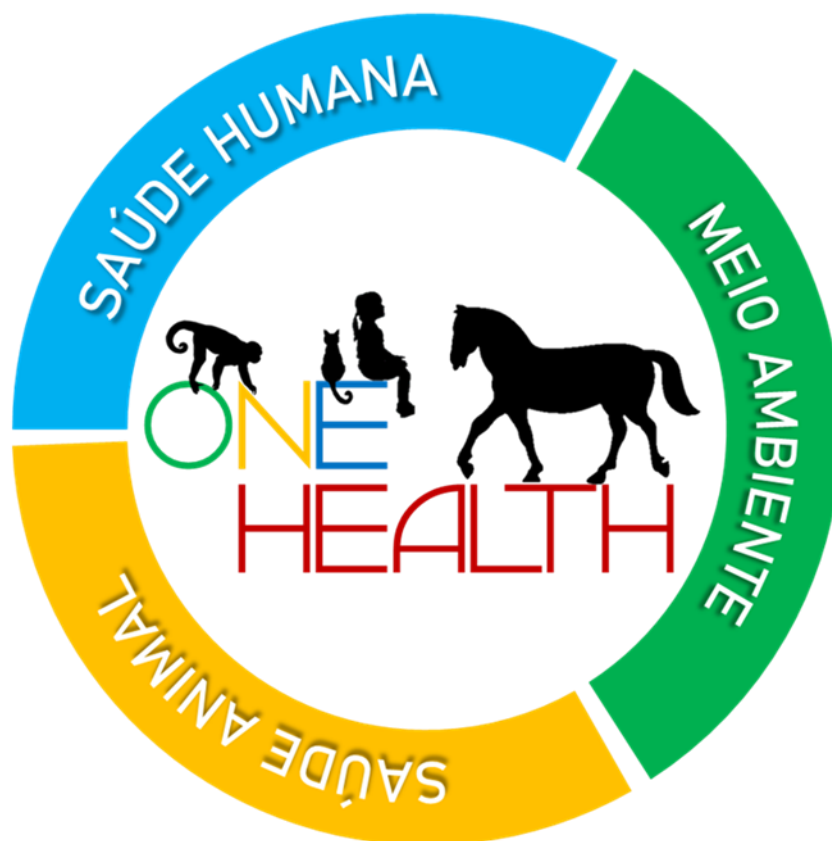


Figura 2: Tríade na visão *One Health*, em que existe uma conexão entre o ser humano, animais e meio ambiente compartilhado. Fonte: arquivo pessoal.

Estudos apontam que 70% das doenças infecciosas que ameaçam a saúde pública apresentam uma interação entre humanos e outros animais (Chomel et al, 2007; Schneider et al., 2011) sendo que os patógenos, na maioria das vezes, estão envolvidos em infecções zoonóticas, que são infecções naturalmente transmitidas entre animais vertebrados e seres humanos (Taylor et al., 2001).

A maioria das doenças zoonóticas emergentes (novas doenças ou que foram recentemente identificadas com um repentino aparecimento de casos), são doenças infecciosas que infectavam apenas animais, exceto o homem, mas que passaram a infectar humanos também. São originárias da vida silvestre e devido ao

desequilíbrio ecológico e avanços frequentes do meio urbano frente às áreas rurais culminaram na infecção humana por esses agentes (Jones et al., 2008).

As mudanças climáticas e a fragmentação de habitats resultam na perda da biodiversidade, além da degradação de ambientes naturais, ameaçando todo um ecossistema responsável por manter a vida. Tais mudanças podem ser responsáveis pelo aparecimento de zoonoses infecciosas com resultados negativos à saúde humana-animal e para o meio ambiente (Sleeman et al., 2019). Deve se destacar a atenção na vigilância de doenças que acometem a fauna silvestre, a fim de se detectar doenças infecciosas emergentes e uma maior integração entre a saúde da fauna silvestre, e seus impactos para os seres humanos (Woods et al., 2019).

A crescente e rápida urbanização, implicou em uma maior proximidade entre o ser humano, os animais de companhia (exemplo do cão) e animais silvestres (como exemplo dos roedores). A compreensão de uma saúde única nas leishmanioses é de extrema importância, já que humanos e animais podem ser infectados por protozoários de *Leishmania* spp. e compartilham o mesmo ambiente, fazendo-se necessário uma vigilância e monitoramento da doença em humanos e outros animais. Para que haja o controle das leishmanioses, é preciso uma colaboração entre diversos profissionais, como exemplo de médicos, médicos veterinários, biólogos (ecologistas e ambientalistas) e agentes da lei propondo-se medidas sob abordagens *One Health* com esforços combinados entre vigilância e controle da doença (Kardjadj e Ben-Mahdi, 2019).

Nas leishmanioses, o conceito de saúde única abrange a população humana, os animais domésticos e silvestres e os impactos que as mudanças ambientais (constituindo a saúde ambiental) exercem sobre essas populações. A vigilância das leishmanioses deve ser realizada por meio do controle da doença antroponótica (ser humano é o único reservatório, suscetível e hospedeiro) e zoonótica. Programas de combate à doença devem abranger a vigilância de insetos vetores, o mapeamento geoespacial da distribuição desses vetores e a transmissão do protozoário parasito de animal para animal e também de animal para humano, a fim de se evitar a disseminação de casos da doença em regiões endêmicas e não endêmicas (Palatnik-de-Sousa e Day, 2011).

Sabe-se que mudanças ambientais, como exemplo do aquecimento global, desmatamento e crescimento urbano (citadas anteriormente) tem um efeito na sobrevivência da vida selvagem, podendo resultar no aparecimento de agentes infecciosos, como no caso das leishmanias, e meios alternativos para os vetores dessas infecções. A medida que se tem uma maior aproximação dos humanos e animais domésticos para o ambiente de vida silvestre, tem-se um aumento no risco de transmissão do parasito para outras espécies (Taylor et al., 2001).

As leishmanioses envolvem uma interação completa da tríade *One Health*, já que apresentam importância médica humana e veterinária, envolvendo a interação do patógeno, vetores artrópodes, a influência do ambiente sob estes vetores, reservatórios sendo animais domésticos de companhia e animais silvestres, além do homem que está suscetível à doença. As abordagens de saúde única se encaixam, e para se ter o controle da infecção, é necessária uma comunicação interdisciplinar entre a comunidade como um todo, microbiologistas, parasitologistas, imunologistas, entomologistas, ecologistas, agentes de saúde pública, médicos e veterinários, além de outros (Palatnik-de-Sousa e Day, 2011). Portanto, é necessário haver um equilíbrio entre a saúde humana, dos animais domésticos e da fauna silvestre, além do ambiente.

1.4 Métodos de Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses inclui desde o histórico de caso, manifestações clínicas compatíveis com a doença e análises específicas realizadas laboratorialmente (Gramiccia, 2011). O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser efetuado por técnicas imunológicas, que identifica a resposta imune do indivíduo que apresenta *Leishmania*; parasitológicas, para identificação do agente; sorológicas, que objetivam a identificação de anticorpos contra o parasito e moleculares, amplificando fragmentos específicos do DNA do protozoário (Ferrer, et al., 1995).

Dentre os testes imunológicos, a Reação Intradérmica de Montenegro é utilizada na detecção de uma resposta primária em humanos com suspeita de LT. Considerado um marcador de resposta imune celular, o teste avalia a resposta de hipersensibilidade que é mensurada pela presença de inflamação, eritema ou

erupções cutâneas após a injeção de uma solução salina contendo antígeno (Brasil, 2010).

A técnica parasitológica para pesquisa de *Leishmania* leva em consideração o dimorfismo do protozoário, que tem por característica a presença do DNA mitocondrial circular (cinetoplasto). As duas formas do parasito podem ser observadas, a amastigota, que apresenta-se arredondada ou ovalada, tendo um diâmetro em torno de 2,5 a 6,8µm e pode ser visualizada no interior das células fagocitárias do hospedeiro mamífero e a forma promastigota, que é extracelular e que possui mobilidade. Essa segunda forma pode medir entre 15 a 30µm de comprimento e apresenta, em sua porção anterior, um longo flagelo, sendo encontrada no trato digestivo dos vetores. Os ensaios parasitológicos permitem identificar o agente, porém a identificação fica restrita apenas a nível de gênero (Gramiccia, 2011).

Neste tipo de diagnóstico, pode ser empregado o exame microscópico citológico, com a observação do agente na forma amastigota em biópsia de vários tecidos (Chulay e Bryceson, 1983; Alves-Martin, 2017; Narvajás et al., 2019); por meio de extensão sanguínea, podendo ser observadas as formas amastigotas no interior de células fagocitárias ou das formas livres, quando há sua liberação pelo rompimento das células (Giudice e Passantino, 2011); ou ainda a partir de raspagens da pele lesionada. Além desses, existe também a cultura *in vitro*, que permite identificar leishmanias na forma de promastigotas. Essas culturas são realizadas em diferentes meios (como exemplo, NNN; LIT; Schneider e 199) que são eficazes no isolamento do parasito. A desvantagem desse ensaio é o longo período de incubação, que pode ser de até 30 dias, porém é o único procedimento que permite isolar as formas infectantes do protozoário (Gradoni e Gramiccia, 2008; Paixão-Marques et al., 2019).

Outro diagnóstico parasitológico é o xenodiagnóstico, que consiste na alimentação dos vetores (realizada no laboratório) nos indivíduos com suspeita da doença. Os flebotomíneos são então analisados após a digestão sanguínea, para procura de formas promastigotas no intestino dos insetos (Mondal et al., 2019).

Os métodos sorológicos comumente utilizados são: a reação de imunofluorescência indireta (RIFI); o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); os testes rápidos imunocromatográficos (DPP® e LSH Ab ECO Teste®) e de aglutinação direta (DAT). A técnica de RIFI é realizada por meio de diluições séricas

em lâminas revestidas com formas promastigotas de *Leishmania* como antígeno. A ligação do anticorpo e o título do anticorpo são revelados pelo uso de anticorpos conjugados com fluoresceína. Embora a técnica seja considerada subjetiva, este é o método recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal. Porém, é reconhecido que em áreas onde a leishmaniose e a doença de Chagas são endêmicas, pode haver reação cruzada entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. pelo teste de RIFI (Luciano et al., 2009).

Para o diagnóstico molecular, a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é capaz de detectar o DNA parasitário, podendo ser utilizada em amostras de humanos e animais (Ikonomopoulos et al., 2003), também sendo aplicada para espécies domésticas e silvestres. A combinação de técnicas sorológicas e moleculares auxiliam na identificação de animais positivos principalmente em regiões endêmicas (Gramiccia e Gradoni, 2005).

Testes moleculares como a PCR são considerados altamente sensíveis e específicos, possuindo a capacidade de detectar fragmentos do DNA do parasito, não necessitando estar íntegro na amostra biológica (Lucheis et al., 2005). A associação de PCR com o sequenciamento genético auxilia na identificação da espécie do patógeno presente nas amostras (Hijawi et al., 2019).

Além da PCR, existem algumas técnicas que se baseiam na eletroforese de enzimas, anticorpos monoclonais e PCR multiplex, por exemplo. Porém, para a realização de eletroforese de enzimas, faz-se necessário procedimentos como cultivo e também o isolamento do parasito, o que em alguns casos não é possível. Além disso, o uso dos anticorpos monoclonais limita-se pela frequência de reações cruzadas que podem ocorrer com outros organismos (Lima Jr. et al., 2009).

Um dos materiais biológicos utilizados na realização da PCR é o sangue. Geralmente, para a colheita de sangue em primatas, há a necessidade da utilização de anestésicos para a contenção, fato que torna o procedimento além de trabalhoso, invasivo ao animal. Dessa maneira, surge a necessidade de testes em amostras biológicas cuja colheita não gere grande estresse ao animal, tais como o uso de PCR de suabe conjuntival, que fornece resultados confiáveis por meio de uma técnica rápida e pouco invasiva (Benassi et al., 2017). A técnica de PCR a partir de células conjuntivais mostrou ser sensível no diagnóstico de cães doentes, com uma

sensibilidade de 92% (Strauss-Ayali et al., 2004) e também foi sensível na detecção de *Leishmania* spp. em cães assintomáticos em uma região endêmica, com 90% (Leite et al., 2010) e não endêmica, com uma sensibilidade de 78,4% (Geisweid et al., 2013).

Além da PCR convencional, existe também a a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), que é considerada uma valiosa ferramenta na detecção e quantificação do DNA alvo e apresenta como vantagem a sua automatização, rapidez e alta sensibilidade. Trabalhos na literatura estão utilizando essa técnica na quantificação e identificação de espécies de *Leishmania* (Galluzzi et al., 2018; Diotallevi et al., 2020).

A técnica de qPCR associada à análise de perfis de dissociação em alta resolução (HRM, sigla para *High Resolution Melting*), vem sendo utilizada na detecção e identificação das espécies de *Leishmania*. Este método consiste na detecção de diferenças na composição de nucleotídeos de um produto específico da qPCR, de acordo com diferenças termodinâmicas nos perfis da curva de dissociação dos amplicons (Zampieri, 2019). Atualmente existem reagentes e *softwares* de alta precisão que permitem uma alta sensibilidade na identificação das espécies e alguns trabalhos na literatura utilizam a técnica de HRM na detecção de protozoários do gênero *Leishmania* (Hernandez et al., 2014; Hosseini-Safa et al., 2018; Asfaram et al., 2019; Recalde et al., 2019; Ahuja et al., 2020).

1.5 Leishmanioses em Primatas Não Humanos (PNH)

A ordem dos primatas apresenta duas subordens: Strepsirrhini e Haplorrhini. A primeira inclui cerca de 91 espécies, sendo a maioria referente aos lêmures. Já a segunda subordem distingue-se da primeira devido à estrutura do nariz, que apresenta uma membrana ao redor das narinas. É nesta subordem que se encontram todos os símios, que são os primatas do novo mundo (ou neotropicais) e do velho mundo (incluído aqui, os humanos) (Goodman et al., 1998).

O clado Platyrrhini compreende todos os primatas neotropicais e são todos oriundos das Américas. Neste grupo existem diversas famílias como por exemplo: Cebidae; Atelidae e Pitheciidae. Um outro ramo da árvore filogenética é o clado dos Catarrhini, que reúnem os primatas do velho mundo, ou seja, aqueles que tiveram sua

origem nos continentes Africano, Asiático e Europeu. Este clado reúne diversas famílias, como exemplo dos grandes primatas (gorilas, orangotangos, chimpanzés e humanos) (Goodman et al., 1998).

No ambiente silvestre, a infecção natural por protozoários do gênero *Leishmania* é comum. Muitas infecções que acometem os humanos, também podem vir a acometer outros primatas, principalmente os Neotropicais (Roviroso-Hernández et al., 2013).

O ciclo enzootico das leishmanioses envolve diversas espécies de mamíferos silvestres, incluindo os PNH, em especial, os pertencentes à família Cebidae, como o macaco da espécie *Sapajus apella* na região Amazônica, o qual está relacionado à *Leishmania (Viannia) shawi*, responsável pela leishmaniose tegumentar (Carneiro et al., 2011).

Em Camarões na África, um estudo envolvendo gorilas (*Gorilla gorilla*) identificou *Leishmania major* em amostras fecais destes animais, mostrando que os gorilas selvagens carregam parasitos patogênicos de *Leishmania*. Este trabalho identificou que dos 91 gorilas, 12 deles apresentaram *L. major* em amostras pouco comum de serem estudadas, como no caso das amostras fecais (Hamad et al., 2015).

No Brasil, no município de Maringá, estado do Paraná, região endêmica para Leishmaniose Tegumentar, 65 mamíferos silvestres foram capturados no Parque do Ingá. Neste estudo foram analisadas amostras de soro de quatro macacos-prego da espécie *Sapajus apella*. Os resultados do teste sorológico de aglutinação direta (DAT) revelaram título maior ou igual a 10 para 100% das amostras de macacos-prego com anticorpos contra *Leishmania* spp. (VOLTARELLI et al., 2009).

Os resultados de um estudo realizado com 81 amostras de sangue de animais silvestres, de vida livre e de cativeiro, incluindo primatas, no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, demonstraram positividade para *Leishmania (L.) infantum* na técnica molecular de PCR em três primatas *Alouatta guariba* (bugio marrom) revelando uma necessidade de controle da doença, principalmente em áreas endêmicas, com a finalidade de conservação da fauna silvestre que também é mantida em cativeiro (Lombardi et al., 2014).

Outro trabalho desenvolvido na região de Belo Horizonte (MG), dentre os 41 primatas mantidos em cativeiro em um zoológico, um primata da espécie *Callicebus nigrifrons* foi positivo para *Leishmania chagasi* na PCR e imunohistoquímica, tendo desenvolvido doença fatal. Além deste, outros 17 primatas, incluindo seis *C. nigrifrons*, um *Alouatta guariba*, três *Sapajus xanthosternos*, um *Leontopithecus crysomelas*, um *Aotus nigriceps*, dois *Pithecia irrorata* e três exemplares da espécie *Saguinus imperator* foram positivos para *Leishmania* spp. na PCR, porém nenhum deles apresentou sinais clínicos da doença (Malta et al., 2010).

No município de Bauru, no Estado de São Paulo área endêmica para leishmaniose, um primata da espécie *Ateles paniscus* apresentou membranas mucosas pálidas e perda de peso e na técnica de PCR observou-se padrão idêntico para *Leishmania amazonensis* (Lima et al., 2012). No mesmo local, 37 primatas dos gêneros *Alouatta*; *Ateles*; *Sapajus*; *Lagothrix*; *Erythrocebus*; *Mandrillus* e *Papio*, foram positivos na PCR para família Trypanosomatidae, e resultados do sequenciamento genético retornaram similaridade com o gênero *Trypanosoma* spp., além de um animal da espécie *Erythrocebus patas* se apresentar reagente na técnica de RIFI para *Leishmania braziliensis* com título 160 (Guiraldi, 2016).

Estes estudos apontam que os PNH podem ser incluídos nas definições de hospedeiro ou reservatório naturais de *Leishmania*, demonstrando que o ciclo silvestre das leishmanioses ainda é um enigma, o qual pode ser mantido por uma única espécie de reservatório ou um complexo de espécies responsáveis por manter o parasito nesses ambientes (Roque e Jansen, 2014). É fato que PNH se infectem naturalmente, podendo ou não apresentar sintomas compatíveis com a doença, como no caso do trabalho de Malta e colaboradores (2010) em que o primata da espécie *Callicebus nigrifrons* (Guigó) desenvolveu a infecção letal, apresentando sinais e sintomas semelhantes aos que cães e humanos infectados apresentam. Dessa maneira, os PNH devem ser considerados em estudos epidemiológicos uma vez que há relatos de infecção natural nestes animais e o potencial de transmissão precisa ser melhor esclarecido (Santos e Oliveira, 2019).

O Quadro 1 apresenta trabalhos publicados que detectam a infecção natural por *Leishmania* em PNH, sejam neotrópicos ou do velho mundo, tanto de vida livre como de cativeiro. A busca dos artigos científicos foi realizada utilizando três bases de dados: PubMed, Science Direct and Google Scholar sem determinar

períodos pré-definidos. A busca ocorreu até agosto de 2020 e os trabalhos encontrados podem ser visualizados.

Quadro 1: Infecção natural por *Leishmania* em primatas não humanos, revisão de literatura.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Espécie de PNH	País	Método de diagnóstico	Referências
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Alouatta guariba</i>	Brasil	PCR de sangue	Lombardi et al., 2014
	<i>Pongo pygmaeus</i>	Espanha	Lâminas de extensão e PCR de sangue e aspirado de medula e RIFI	Miró et al., 2018
	<i>Callithrix penicillata/</i> <i>Callithrix jacchus</i>	Brasil	DAT e PCR em amostra de pele	Paiz et al., 2019
	<i>Gorilla gorilla</i>	Brasil	Lâminas de extensão de aspirado do linfonodo e PCR de sangue	Tinoco et al., 2018
	<i>Pan troglodytes/</i> <i>Leontopithecus rosalia/</i> <i>Sapajus apella/</i> <i>Miopithecus talapoin</i>	Brasil	Xenodiagnóstico e qPCR dos flebotomíneos	Oliveira et al., 2019
	<i>Alouatta seniculus</i>	Guiana Francesa	qPCR e imunocromatografia de sangue	Medkour et al., 2019
	<i>Alouatta caraya</i>	Argentina	PCR-RFLP de tecido da orelha	Martínez et al., 2020
<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Callicebus nigrifrons</i>	Brasil	PCR e Imuno-histoquímica	Malta et al., 2010
<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Alouatta pigra/Alouatta palliata</i>	México	ELISA; RIFI e Western blot	Rovirosa-Hernández et al., 2013
<i>Leishmania shawi</i>	<i>Sapajus apella/</i> <i>Chiropotes satanas</i>	Brasil	Inoculação intradérmica/ Lâminas de lesões cutâneas e hemocultura	Lainson et al., 1988 e 1989
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Aotus trivirgatus/</i> <i>Saguinus geoffroyi</i>	Panamá	Lâminas de amostras de pele e cultura de amostras de pele, sangue, fígado e baço	Herrer et al., 1973
	<i>Aotus trivirgatus</i>	Panamá	Parasitológico (sem descrição)	Herrer e Christensen, 1976
	<i>Aotus azarae</i>	Argentina	PCR-RFLP em amostras de sangue	Arcadi et al., 2013
	<i>Erythrocebus patas</i>	Brasil	RIFI	Guiraldi, 2016
	<i>Alouatta caraya</i>	Argentina	PCR-RFLP de tecido da orelha	Martínez et al., 2020
<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Ateles paniscus</i>	Brasil	PCR-RFLP em amostras de sangue	Lima et al., 2012

	<i>Alouatta caraya</i>	Argentina	PCR-RFLP de tecido da orelha	Martínez et al., 2020
<i>Leishmania guyanensis</i>	<i>Alouatta seniculus</i>	Guiana Francesa	qPCR e imunocromatografia de sangue	Medkour et al., 2019
<i>Leishmania major</i>	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Quênia	Aspirado de pele, fígado e baço	Binhazim et al. 1987
	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Quênia	Sem descrição	Desjeux, 1991
	<i>Chlorocebus aethiops/ Papio cynocephalus/ Cercopithecus mitis</i>	Quênia	ELISA, Western blot e ensaio de proliferação de linfócitos	Gicheru et al., 2009
	<i>Gorilla gorilla</i>	Camarões	PCR e hibridação fluorescente in situ em amostras fecais	Hamad et al., 2015
<i>Leishmania spp.</i>	<i>Sapajus apella</i>	Brasil	DAT	Voltarelli et al., 2009
	<i>Callicebus nigrifrons/ Alouatta guariba/ Sapajus xanthosternos / Leontopithecus chrysomelas/ Aotus nigriceps/ Pithecia irrorata/ Saguinus imperator</i>	Brasil	PCR de sangue e Imuno-histoquímica	Malta et al., 2010
	<i>Sapajus flavius</i>	Brasil	ELISA	Bueno et al., 2017
	<i>Sapajus cay</i>	Brasil	PCR de sangue	Porfirio et al., 2018
	<i>Callithrix sp</i>	Brasil	PCR de sangue	Trüb et al., 2018
	<i>Callithrix penicillata/ Callithrix jacchus</i>	Brasil	DAT e PCR de pele	Paiz et al., 2019
	<i>Leontopithecus chrysomelas/ Aotus nigriceps/ Lagothrix cana/ Chiropotes satanas</i>	Brasil	qPCR de sangue	Reis et al., 2019

Testes moleculares: PCR: Reação em Cadeia da Polimerase convencional; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; PCR-RFLP: Reação em Cadeia da Polimerase associada ao polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição; Western blot.

Testes parasitológicos: Lâminas de extensão; xenodiagnóstico.

Testes sorológicos: RIFI: Reação de Imunofluorescência Direta; DAT: Teste de Aglutinação Direta; Imuno-histoquímica; ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.

Teste citogenético: hibridação fluorescente in situ.

1.6 Leishmanioses nos locais do estudo

Mesmo com uma grande diversidade de espécies animais, o Brasil possui mais de 100 zoológicos que abrigam diferentes espécies representantes da fauna brasileira, mas também, espécies exóticas. Embora 40% dos zoológicos do Brasil

localizam-se no estado de São Paulo, todas as regiões brasileiras possuem zoológicos e/ou centros de conservação ou pesquisa de referência em manejo e cuidados, além de atrações para o público visitante e preocupação com pesquisa e ensino (Wildwelfare, 2019).

Representando a região Norte do País, os animais amostrados são os pertencentes ao plantel do Centro Nacional de Pimatas (CENP), no município de Ananindeua, no estado do Pará. O estado do Pará possui altos índices de leishmaniose em humanos, sendo o estado da região Norte com maior número de casos humanos de leishmaniose visceral e tegumentar considerado o terceiro estado brasileiro com maiores números de casos de LV, onde foram registrados desde o ano de 1990 até 2013, 4538 casos de LV (Brasil, 2015a) e aproximadamente 100 mil casos de LTA (Brasil, 2015b). No ano de 2018, o estado registrou 583 casos de LV e 3.246 de LT. Já no ano de 2019, o número de relatos de LV foi de 179 e de LT de aproximadamente 1.806 casos (IEC, 2019). O CENP, possui diversos animais em cativeiro que permitem serem observados e estudados a longo prazo, visto que estão inseridos em ambiente propício onde podem ser fonte de alimento para vetores de parasitos durante repasto sanguíneo.

O trabalho de Lainson (2010) mostrou a presença de várias espécies de *Leishmania* na região Amazônica, onde está inserido o Pará, e a importância dessa zoonose que tem como origem um ciclo silvestre de mamíferos que atuam como hospedeiros de parasitos e de flebotomíneos vetores. Como resultado do intenso desmatamento que ocorreu nessa região do país, os flebotomíneos se adaptaram a viver nos ambientes domiciliares e peridomiciliares, passando a infectar animais domésticos, como o cão e também animais de produção, como equinos.

No estado do Pará, já houve registros de *L. (V.) shawi* em primatas das espécies *Sapajus apella* (macaco-prego) e *Chiropotes satanas* (Cuxiú-preto), além da presença do vetor das espécies *Lu. whitmani* (Lainson et al., 1989); *Lu. longipalpis*, *Lutzomyia gomez* (Santos et al., 2019) e *Nyssomyia antunesi* (Uzcátegui et al., 2020).

Representando a região Nordeste, os PNH são do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, na cidade de Salvador, na Bahia. A região nordeste brasileira é rica em biomas, com destaque para a Caatinga, por ser uma região seca e a Mata Atlântica, por ser úmida e chuvosa, que se distribui por diversos estados, incluindo o estado da

Bahia, onde foram registrados entre os anos de 2012 e 2014 uma média de 3281,7 casos de LTA em humanos (SUVISA, 2015a) e uma rápida expansão da LV, a qual está presente em 180 municípios do estado (SUVISA, 2015b). A LV é considerada endêmica na Bahia e atualmente está presente em 174 municípios (SINAN, 2018).

O Parque Zoobotânico Getúlio Vargas está localizado na região litorânea do estado, e está inserido em uma grande área de vegetação de Mata Atlântica, habitat natural para diversos vetores, incluindo flebotomíneos (Vexenate et al., 1986; Rodgers et al., 2019). Alguns levantamentos entomológicos de flebotomíneos já foram realizados nessa região do país (Guimarães et al., 2012; Costa et al., 2013; Miranda et al., 2015; Agra et al., 2016). Flebotomíneos da espécie *Lu. whitmani* têm sido o principal vetor de *L. braziliensis*, responsável pela maior parte dos casos de LTA enquanto *Lu. longipalpis* foi incriminado por ser a principal espécie transmissora de *L. infantum* (Andrade-Filho et al., 2017; Silva et al., 2017; Pessoa-E-Silva et al., 2019). E ambos os casos de LV e LTA ocorrem em locais de vegetação de Mata Atlântica, onde o estado da Bahia está inserido.

Na região sudeste, os PNH amostrados são oriundos do Parque Municipal Quinzinho de Barros, em Sorocaba, São Paulo. O predomínio do bioma Cerrado permite uma grande adaptação de flebotomíneos de diversas espécies, ocasionando uma maior população de vetores no ambiente peridomiciliar (Costa et al., 2019). Nas últimas décadas, o Brasil apresentou mudanças na epidemiologia das leishmanioses, pois casos que estavam restritos à região nordeste começaram a se espalhar rapidamente atingindo estados da região sudeste (Conti et al., 2016, Martins-Melo et al., 2018).

O estado de São Paulo, apresenta elevado número de indivíduos infectados com diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo que no ano de 2019 foram registrados 85 casos de LV com 10 mortes (CVE, 2020a) e 4577 casos de LTA (CVE, 2020b). Só o município de Sorocaba, totalizou 545 casos de LTA em humanos entre os anos de 1998 e 2006 (CVE, 2008), e 447 casos entre os anos de 2007 e 2015 (CVE, 2015) demonstrando a necessidade de estudos adicionais para uma maior compreensão da rede de transmissão da doença no município.

Na região Sul do país, fizeram parte do estudo os PNH do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba, no Paraná. Na região Sul do Brasil, embora caracterizada por um clima mais ameno, casos de leishmaniose foram relatados no estado do Paraná, local que sofreu transformações antrópicas, em que a vegetação nativa foi substituída por plantações. Atualmente, as florestas nativas representam uma pequena porcentagem do território do estado. O ambiente modificado tornou-se muito favorável à disseminação de vetores de *Leishmania*, uma vez que, em muitas das áreas rurais, há florestas e também arbustos remanescentes que ficam em torno das casas, onde ainda existem casos enzoóticos de *Leishmania*. No estado, foram encontrados inúmeros flebotomíneos responsáveis por tornar algumas regiões endêmicas para a doença (Teodoro et al., 2004).

Até o ano de 2012, além dos vetores, casos de LV canina autóctone foram registrados no estado, em que foi isolado *L. infantum* nas amostras caninas (Dias et al., 2020). O estado do Paraná era uma área livre da LV canina, uma vez que até então não haviam relatos de casos autóctones da doença (Thomaz-Soccol et al., 2009). Uma vez apresentando vetores e casos autóctones (Dias et al., 2020), o estado do Paraná pode ser classificado como uma área vulnerável para que novos casos caninos e humanos da doença sejam diagnosticados.

A região Centro-Oeste apresenta um rico ecossistema, já que representa o ambiente de transição entre os biomas da Amazônia e do Cerrado e também, por ser região do bioma Pantanal (IBGE, 2004). Esses ecossistemas permitem a existência de uma grande diversidade de organismos, sobretudo vetores de protozoários parasitos (Gomes et al., 2019). No município de Brasília já foram registrados casos autóctones de LV em humanos (Carranza-Tamayo et al., 2010) e casos de LTA em indivíduos do Distrito Federal, onde constatou-se além da presença de indivíduos infectados, vetores circulantes no ambiente periurbano (Sampaio e de Paula, 1999; Reis et al., 2019).

O estudo das leishmanioses em PNH representantes das cinco regiões geográficas brasileiras é desconhecido. É sabido que diversas doenças ocasionadas por protozoários parasitos em primatas são pouco estudadas. Os primatas cativos são propícios a contrair a infecção, porém é incerto o papel deles como reservatórios de *Leishmania* (Roviroso-Hernández et al., 2013). Primatas pertencentes à zoológicos ou centros de conservação e pesquisa são constantemente manipulados, o que permite

a realização de coletas de sangue sem ocasionar um estresse desnecessário ao animal. Porém, estes animais são protegidos por leis ambientais e por tratar de animais que vivem em cativeiro, torna-se inviável a realização de técnicas cirúrgicas ou procedimentos mais invasivos, como por exemplo testes a partir de biópsia ou punção medular.

Portanto, neste trabalho, foi realizada uma pesquisa por protozoários de *Leishmania* em amostras de primatas de cativeiro das cinco regiões brasileiras, já que o Brasil concentra elevado número de casos de LV e LTA (Gontijo e Melo, 2004; Basano e Camargo, 2004). Assim, devido ao alto grau de semelhança filogenética entre PNH e os humanos e também, por esses animais estarem inseridos em diversos biomas brasileiros que são considerados endêmicos para a doença, eles podem representar a distribuição dos parasitos nos locais estudados. Por esta razão, sugere-se a realização de análises pontuais dos casos positivos e medidas preventivas para diminuição do risco de transmissão para outros animais, tratadores e público visitante.

Objetivos

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Pesquisar *Leishmania* spp. em primatas não-humanos procedentes de quatro zoológicos e um centro de conservação localizados nas cinco regiões brasileiras em diferentes amostras biológicas e utilizando técnicas diagnósticas distintas.

2.2 Objetivos específicos

- Visualizar diretamente o parasito em lâminas de extensão sanguínea dos primatas amostrados;
- Detectar anticorpos contra os agentes das leishmanioses nos primatas não-humanos estudados;
- Pesquisar *Leishmania* spp. nas amostras biológicas (sangue e suabe conjuntival) por amplificação de fragmentos específicos do parasito;
- Realizar a caracterização molecular e inferências filogenéticas das amostras positivas à cPCR com diferentes pares de iniciadores (*primers*) para a detecção de citocromos de leishmanias;
- Identificar as espécies de *Leishmania* nas amostras positivas à técnica molecular;
- Comparar os diferentes *primers* empregados na pesquisa;
- Determinar as regiões brasileiras amostradas com maior positividade de PNH para *Leishmania* spp.;
- Informar aos locais do estudo, a respeito dos resultados obtidos a fim de que cada instituição realize monitoramento periódico com uso de armadilhas para flebotomíneos e monitoramento dos animais positivos.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Considerações éticas, autorizações, declarações e apoio financeiro

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (Nº1212/2017; Anexo A) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio), do Ministério do Meio Ambiente (SISBIO/ICMBio/MMA Nº 57385-3; Anexo B).

A pesquisa foi aprovada pelas Comissões de Ética em Pesquisa e/ou Diretoria de Pesquisa dos quatro zoológicos e um centro de conservação que tiveram os primatas não-humanos amostrados.

O estudo obteve autorização do Centro Nacional de Primatas do Pará (CENP) que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas – IEC Nº19/2019 (Anexo C).

O Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, em Salvador, estado da Bahia concedeu uma declaração autorizando a realização do trabalho (Anexo D). O Parque Municipal Quinzinho de Barros, em Sorocaba, estado de São Paulo, emitiu uma declaração de autorização de uso dos animais (Anexo E). A diretoria do Departamento de Pesquisa e Inovação da Fauna do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba, em Curitiba, Estado do Paraná forneceu uma declaração permitindo a realização do estudo (Anexo F). O projeto também foi analisado e aprovado de acordo com as normas e diretrizes para o desenvolvimento de Projetos de Pesquisa destinados ao aprofundamento do conhecimento científico e tecnológico no âmbito da Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB), no Distrito Federal (Anexo G).

O projeto de pesquisa foi realizado com recursos concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) vinculada ao Ministério da Educação do Brasil, bolsa de doutorado.

3.2 Local da realização dos exames

Os procedimentos laboratoriais sorológico (RIFI) e molecular (HRM) foram realizados no Instituto Adolfo Lutz de Bauru – SP. A técnica molecular de cPCR e o diagnóstico parasitológico (lâminas de extensão ou esfregaços sanguíneos) foram executados no Laboratório de Sanidade Animal - LASAB da APTA/SAA-SP – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo – Polo Regional de Bauru - SP. O sequenciamento genético foi realizado pelo BPI - Biotecnologia Pesquisa e Inovação, que pertence ao grupo *Genotyping* Laboratório de Biotecnologia LTDA, Botucatu, SP.

3.3 Organograma experimental

O trabalho consistiu em um estudo epidemiológico transversal, de amostragem por técnicas parasitológica, sorológica e molecular do protozoário parasito *Leishmania* spp. em primatas não-humanos (Figura 3).

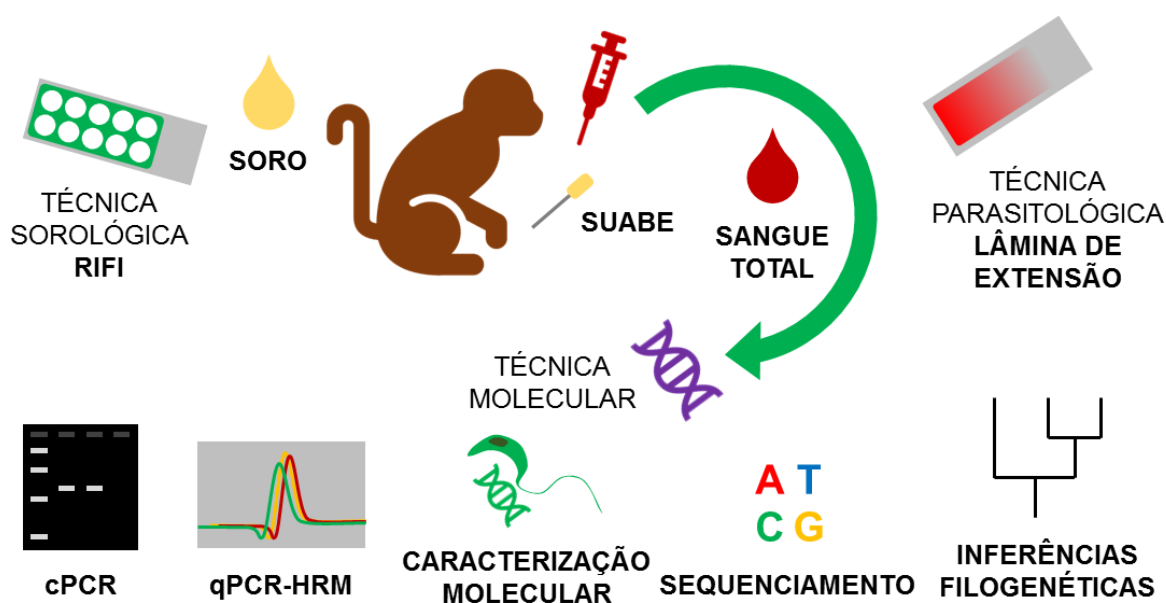


Figura 3: Organograma experimental com todas as etapas da pesquisa. Fonte: arquivo pessoal.

3.4 Locais Amostrados - Centro de Conservação (CENP) e Zoológicos (Zoo) da Pesquisa

Diferentes materiais biológicos (soro, sangue e suabes conjuntival) foram coletados de PNH adultos pertencentes ao Centro de Conservação e zoológicos já citados anteriormente (Figura 4).

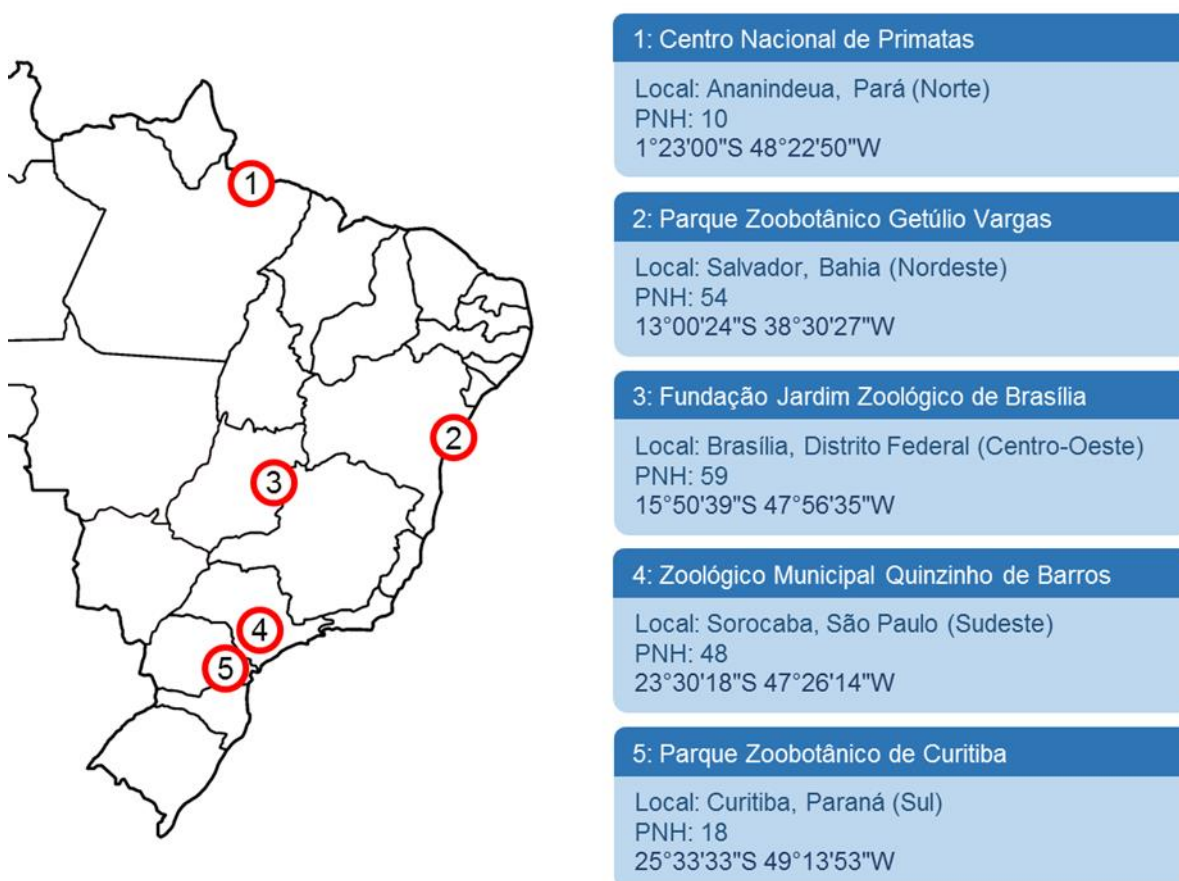


Figura 4: Locais de colheita de amostras dos PNH. Foram amostrados animais de um centro de conservação e de quatro zoológicos representando as cinco regiões brasileiras. Fonte: arquivo pessoal.

3.4.1 Centro de Conservação

O CENP, localizado na Rodovia Federal BR 316, km 7, no município de Ananindeua, no Estado do Pará (região Norte, nas coordenadas 1° 23' 00" S, 48° 22' 50" O), concentra primatas que são utilizados em diversas pesquisas. O local foi inaugurado dia 15 de março de 1987, a partir de um convênio estabelecido entre o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura. O estado do Pará está inserido no bioma Amazônia, o qual possui uma grande circulação de vetores e de parasitos (Carneiro et al., 2020). Para pesquisa, foram analisadas amostras de 10 (dez) PNH.

3.4.2 Zoológicos

3.4.2.1 Parque Zoobotânico Getúlio Vargas

O Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, situado na rua Alto de Ondina, s/nº no bairro de Ondina, na cidade de Salvador, no estado da Bahia (BA), (região Nordeste do país, nas coordenadas 13° 00' 24" S, 38° 30' 27" O) tem mais de 700 mil m² de área construída e preservada (250 mil m² de remanescentes da Mata Atlântica). Inaugurado em 1956, o zoológico recebe mais de 500 mil visitantes anualmente e possui mais de 1500 animais em seu plantel de 158 espécies distintas. O zoológico tem destaque na pesquisa de manejo e reprodução, sendo conhecido por trabalhos de reprodução de macacos-prego, por exemplo. Foram coletadas amostras de 54 PNH.

3.4.2.2 Parque Municipal Quinzinho de Barros

Os PNH de cativeiro que representam a região Sudeste do estudo pertencem ao Parque Municipal Quinzinho de Barros, na rua Teodoro Kaisel, número 883 no município de Sorocaba, estado de São Paulo (SP), nas coordenadas 23°30'18"S, 47°26'14"O.

O local recebe mais de 600 mil visitantes por ano. Inaugurado em 1968, o zoológico possui aproximadamente 130 mil m², distribuídos em áreas construídas para visitação e preservada, com destaque para a mata com diversas espécies livres. O local possui importante papel na conservação de animais ameaçados de extinção, além de atividades educacionais ao longo do ano, recebendo mais de 90 mil alunos por ano em suas dependências. Foram incluídos no trabalho 48 PNH de cativeiro.

3.4.2.3 Jardim Zoológico Municipal de Curitiba

A região Sul do país foi representada pelos PNH do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba, localizado na rua João Miqueletto, s/n - Alto Boqueirão, na cidade de Curitiba, no estado do Paraná (PR), nas coordenadas 25°33'33"S, 49°13'53"O. Na região Sul do país, a cidade conta com dois parques abertos à

visitação pública, que abrigam coleções de animais de vários grupos e espécies: o Passeio Público (inaugurado em 1886) e o Jardim Zoológico Municipal de Curitiba (inaugurado em 1982). O Passeio Público é o mais antigo parque de Curitiba, e já no século XX passou a abrigar o primeiro zoológico da cidade. Em seus 69.285m² se encontram espécies nativas e também exóticas da flora e fauna. Além de abrigar animais de pequeno porte, apresenta o maior grupo de muriquis (o maior primata das Américas). Fizeram parte da pesquisa 18 PNH.

3.4.2.4 Jardim Zoológico de Brasília

Os 59 PNH representantes da região Centro-Oeste foram os do Jardim Zoológico de Brasília, situado na avenida das Nações, s/n, Via L4 Sul, no bairro Candangolândia, em Brasília, Distrito Federal (DF), nas coordenadas 15°50'39"S, 47°56'35"O. O local foi inaugurado em 1957 e possui mais de 1.300 animais de aproximadamente 300 espécies distintas que estão distribuídos em uma área equivalente a 139,75 hectares. O zoológico apresenta diversos lagos artificiais, garantindo um maior conforto para os animais.

3.5 Animais do estudo

O número de amostras foi dependente de cada local da pesquisa de acordo com a agenda de manejo e procedimento dos primatas cativos durante o período deste estudo, não podendo realizar testes estatísticos prévios para delineamento do número amostral.

No total, foram amostrados 189 primatas adultos, pertencentes a 16 gêneros sendo 14 destes dos primatas do Novo Mundo e dois gêneros de primatas do Velho Mundo (Tabela 1); de 37 espécies, além de um animal híbrido (cruzamento de *Callithrix penicilatta* e *Callithrix jacchus*).

Tabela 1: Gêneros e número de animais amostrados no presente estudo por localidade.

Gênero/Local	Nome popular	Número de animais
<i>Alouatta</i> spp.	Bugio	
Zoo Salvador		06
Zoo Brasília		12
Zoo Sorocaba		12
Total		30

<i>Aotus</i> spp.	Macaco-da-noite	
Zoo Brasília		09
Zoo Sorocaba		02
Total		11
<i>Ateles</i> spp.	Macaco-aranha	
CENP		10
Zoo Salvador		07
Zoo Sorocaba		14
Zoo Curitiba		08
Total		39
<i>Brachyteles</i> spp.	Muriqui	
Zoo Sorocaba		4
Total		4
<i>Callicebus/Plecturocebus</i> spp.	Zogue-zogue	
Zoo Brasília		02
Zoo Sorocaba		04
Total		6
<i>Callithrix</i> spp.	Sagui-de-tufos-brancos	
Zoo Brasília		03
Zoo Sorocaba		01
Zoo Curitiba		06
Total		10
<i>Cebus</i> spp.	Macaco-prego	
Zoo Brasília		01
Zoo Sorocaba		01
Total		2
<i>Chiropotes</i> spp.	Cuxiú	
Zoo Brasília		02
Zoo Sorocaba		01
Total		3
Híbrido (<i>Callithrix penicilatta</i> e <i>Callithrix jacchus</i>)	Sagui ou Sauim	
Zoo Brasília		1
Total		1
<i>Lagothrix</i> spp.	Macaco-barrigudo	
Zoo Salvador		03
Zoo Brasília		02
Total		5
<i>Leontopithecus</i> spp.	Mico-leão	
Zoo Brasília		04
Zoo Sorocaba		03
Total		7
<i>Lophocebus</i> spp.*	Mangabei-de-crista-negra	
Zoo Brasília		2
Total		2
<i>Mico</i> spp.	Mico ou Sagui	
Zoo Brasília		1
Total		1
<i>Papio</i> spp.*	Babuíno	
Zoo Sorocaba		2
Total		2
<i>Saguinus</i> spp.	Sagui	
Zoo Brasília		7
Total		7
<i>Saimiri</i> spp.	Macaco-de-cheiro	

Zoo Brasília	1
Zoo Curitiba	1
Total	2
<i>Sapajus</i> spp.	Macaco-prego
Zoo Salvador	38
Zoo Brasília	02
Zoo Sorocaba	04
Zoo Curitiba	03
Total	47
Não informado	
Zoo Brasília	10
Total	10
Total de PNH	189

*Gêneros de PNH do Velho Mundo.

3.5.1 Animais do Centro Nacional de Primatas (CENP - Pará).

Foram coletadas amostras de 10 primatas pertencentes a espécie *Ateles marginatus*, conhecido popularmente como macaco-aranha-de-cara-branca (Apêndice A).

3.5.2 Animais do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoológico Salvador)

De acordo com a rotina de manejo do Zoológico, foi possível a coleta de material biológico de 54 primatas de seis diferentes espécies (Tabela 2). Os dados de cada animal podem ser visualizados no Apêndice B.

Tabela 2: Espécies de primatas amostrados do Zoológico de Salvador

Nome científico	Nome popular	Número de animais
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	6
<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-testa-branca	3
<i>Ateles paniscus</i>	Macaco-aranha-de-cara-vermelha	4
<i>Lagothrix lagotricha</i>	Macaco-barrigudo	3
<i>Sapajus flavius</i>	Macaco-prego-galego	10
<i>Sapajus xanthosternus</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo	28
Total		54

3.5.3 Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zoológico Sorocaba)

Os 48 primatas amostrados constituem 15 espécies diferentes (Tabela 3). Dados detalhados podem ser visualizados no Apêndice C.

Tabela 3: Espécies de primatas amostrados do Zoológico de Sorocaba

Nome científico	Nome popular	Número de animais
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	5
<i>Alouatta guariba</i>	Bugio-marrom	4
<i>Alouatta seniculus</i>	Bugio-vermelho	3
<i>Aotus trivirgatus</i>	Macaco-da-noite	2
<i>Ateles chamek</i>	Macaco-aranha-de-cara-preta	3
<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-testa-branca	11
<i>Brachyteles arachnoides</i>	Muriqui-do-sul	4
<i>Plecturocebus vieirai</i>	Zogue-zogue	4
<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui-de-tufo-branco	1
<i>Cebus olivaceus</i>	Cairara	1
<i>Chiropotes utahickae</i>	Cuxiú	1
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Mico-leão-de-cara-dourada	3
<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno-sagrado	2
<i>Sapajus nigritus</i>	Macaco-prego-preto	2
<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo	2
Total		48

3.5.4 Animais do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba (Zoológico Curitiba)

As quatro espécies de primatas dos quais foi coletado material biológico referem-se a 18 animais que fizeram parte dos procedimentos de rotina realizados pelo zoológico durante o período do estudo (Tabela 4). O Apêndice D descreve a identidade e o material que foi possível coletar.

Tabela 4: Espécies de primatas amostrados no Zoológico de Curitiba

Nome científico	Nome popular	Número de animais
<i>Ateles chamek</i>	Macaco-aranha-de-cara-preta	8
<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufo-preto	6
<i>Saimiri sciureus</i>	Mico-de-cheiro	1
<i>Sapajus apella</i>	Macaco-prego	3
Total		18

3.5.5 Animais do Jardim Zoológico de Brasília (Zoológico Brasília)

Fizeram parte do estudo 59 animais pertencentes a 19 espécies e um animal híbrido (cruzamento de *Callithrix penicillata* e *Callithrix jacchus*) (Tabela 5).

Não foram informadas as espécies de 11 animais que também foram inclusas na pesquisa. Maiores informações constam no Apêndice E.

Tabela 5: Espécies de primatas amostrados no zoológico de Brasília

Nome científico	Nome popular	Número de animais
<i>Alouatta belzebul</i>	Guariba-de-mãos-ruivas	2
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	7
<i>Alouatta seniculus</i>	Bugio-vermelho	3
<i>Aotus nigriceps</i>	Macaco-da-noite	9
<i>Callicebus cupreus</i>	Zogue-zogue	2
<i>Callithrix geoffroyi</i>	Sagui-de-cara-branca	1
<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufo-preto	2
<i>Cebus albifrons</i>	Cairara-de-fronte-branca	1
<i>Chiropotes satanas</i>	Cuxiú-preto	2
Híbrido		1
<i>Lagothrix cana</i>	Macaco-barrigudo-cinzentos	2
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Mico-leão-de-cara-dourada	3
<i>Leontopithecus rosalia</i>	Mico-leão-dourado	1
<i>Lepocephalus aterrimus</i>	Mangabei-de-crista-negra	1
<i>Mico chrysoleucus</i>	Sagui-de-tufo-branco	1
Não informado		11
<i>Saguinus bicolor</i>	Sauim-de-coleira	2
<i>Saguinus imperator</i>	Sagui-imperador	1
<i>Saguinus niger</i>	Sagui-preto	4
<i>Saimiri boliviensis</i>	Macaco-de-cheiro-boliviano	1
<i>Sapajus libidinosus</i>	Macaco-prego-amarelo	2
Total		59

3.6 Colheita de sangue e secreção conjuntival

A colheita de material biológico ocorreu de acordo com a necessidade de manejo operante em cada instituição. Assim, as coletas de sangue foram realizadas durante as práticas de rotina para avaliação clínica e laboratorial definidas pelos médicos veterinários responsáveis de cada local. Os primatas não foram contidos apenas com a finalidade deste estudo e, portanto, o trabalho seguiu o cronograma das instituições e o número de animais amostrados foram determinados segundo o calendário de cada localidade.

Cada animal foi contido, separadamente, com o auxílio de um puçá. O veterinário responsável por cada instituição utilizou contenção física manualmente

(quando o primata era de pequeno porte e/ou não apresentava agressividade) ou utilizou-se o anestésico cetamina (Quetamina®, Vetnil, Brasil) na proporção de 10 mg por quilograma de peso do animal. O animal, já anestesiado foi encaminhado ao centro cirúrgico do local para manipulação de rotina.

O procedimento de colheita de sangue ocorreu por punção venosa periférica e assepsia com álcool 70%. Foi coletado de 2 à 5mL de sangue dependendo do porte do primata. Uma alíquota do sangue foi armazenada em tubos vacutainer® contendo anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), para a confecção de esfregaços sanguíneos e posterior exame parasitológico de pesquisa direta do parasita em microscopia, bem como para as técnicas moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PCR) e *High Resolution Melting* (HRM). Outra alíquota da amostra foi armazenada em tubo seco, para obtenção do soro e realização da técnica sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Após a coleta de sangue, com o auxílio de suabes estéreis, foram coletados material da secreção ocular da conjuntiva inferior dos primatas (Figura 5). Os suabes foram imediatamente acondicionados em microtubos livres de DNases e RNases, armazenados em geladeira a 4°C até o momento de uso, para a realização da extração do DNA e posterior PCR.

Após o procedimento de colheita, os animais foram acompanhados pela equipe das instituições até transcorrer o tempo de ação do anestésico sendo a seguir, reintroduzido aos seus respectivos recintos.

As amostras biológicas (sangue e secreção conjuntival) foram acondicionadas em meio refrigerado e imediatamente enviadas ao laboratório via correios. O material dos tubos secos (sem anticoagulante) foi centrifugado a 3000 rpm/10 min para obtenção do soro, o qual permaneceu armazenado a -20° C até a realização da sorologia. Foi realizada a extração de DNA nas amostras dos tubos com anticoagulante e o material extraído foi armazenado a -20° C até a realização das técnicas moleculares. Os suabes contendo secreção conjuntival permaneceram refrigerados (2 a 8° C) até a realização da extração do material genético e então armazenados em freezer.

As lâminas de extensão sanguínea foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente, no ambiente de laboratório, coradas utilizando-se a

técnica de Giemsa e avaliadas por microscopia óptica (Nikon Eclipse E200) com a objetiva de imersão (1000X).

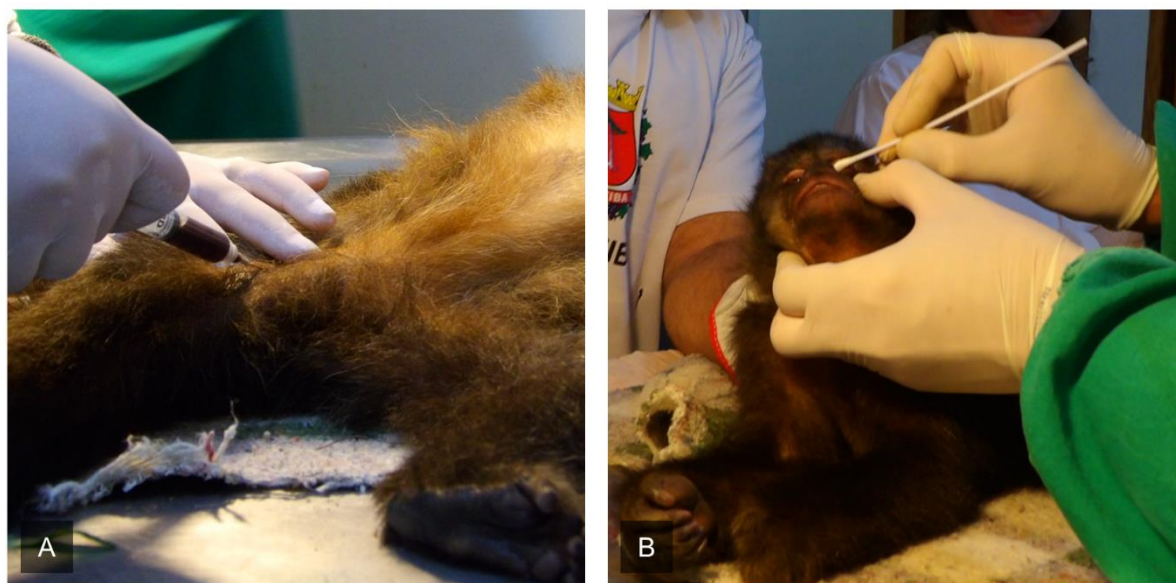


Figura 5: Colheita de material biológico. Em A, punção venosa a partir da veia femoral. Em B, fricção de suabe na conjuntiva inferior para obtenção de células. Fonte: arquivo pessoal.

3.7 Exame parasitológico

3.7.1 Lâminas de extensão sanguínea

Uma gota de sangue de cada animal foi depositada em lâminas de vidro, e realizado o esfregaço por extensão. Posteriormente foram coradas pela técnica de Giemsa (Anexo H) para pesquisa direta do agente. A leitura das lâminas foi realizada sob microscopia óptica (Nikon Eclipse E200) em objetiva de imersão (1000X).

3.8 Exame Sorológico

3.8.1. Antígenos de *Leishmania (L.) infantum*; *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*

Para a sensibilização das lâminas, foram utilizados como antígenos formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) e *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/IOC/L0575), mantidas em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) em tubos rosqueados contendo meio sólido NNN (Novy, MacNeal, Nicolle)

acrescido de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Anexo I e Anexo J). Os protocolos de manutenção dos antígenos e sua obtenção para confecção das lâminas estão descritos nos anexos (Anexo K e Anexo L).

3.8.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966) (Anexo M), com a utilização do conjugado específico contendo Anti-Anticorpo IgG de macaco (*IgG – γ – chain specific* – Sigma – Aldrich®, St. Louis, USA), diluído 1:500 em solução de Azul de Evans a 20%. Foram consideradas positivas as amostras de soro com titulação a partir de 40. Os soros reagentes à diluição 1:40 foram avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640), para determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum*, anti-*Leishmania amazonensis* e anti-*Leishmania braziliensis*.

Além do conjugado específico contendo Anti-Anticorpo IgG de macaco (*IgG – γ – chain specific* – Sigma – Aldrich®, St. Louis, USA), utilizou-se o conjugado IgG de cabra anti-humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (anti-humano/FITC) da Bio-Manguinhos® para posterior comparação dos resultados. De acordo com Ferreira (2019), a utilização de conjugado humano em amostras de primatas não-humanos para a realização da técnica de RIFI demonstrou ser viável. O protocolo de RIFI com o uso do conjugado anti-humano/FITC está descrito no Anexo M.

3.9 Análises Moleculares

A técnica molecular de PCR convencional foi realizada para todas as amostras extraídas de sangue e células conjuntivais e o HRM para as amostras de sangue que amplificaram na cPCR.

3.9.1 Extração do DNA para pesquisa de Leishmania spp. a partir de amostras de sangue

A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®) de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo N). Todo o DNA extraído foi armazenado em freezer à -20°C.

3.9.2 Extração do DNA para pesquisa de Leishmania spp. a partir de amostras de suabe conjuntival

Com o auxílio de suabes estéreis, foram coletadas células epiteliais da conjuntiva inferior de um dos olhos (direito ou esquerdo) dos primatas. Os suabes permaneceram armazenados em microtubos de 1,5mL estéreis mergulhados em 300µL de solução salina de PBS (Phosphate-Buffered Saline) pH7,4 e sob refrigeração à 2-8 °C até o momento de extração. O procedimento de extração do material genético a partir dos suabes foi realizado com o uso do processo denominado *Salting-out*, seguindo um protocolo baseado em John et al. (1991) e Lahiri & Numberger (1991) com modificações de Benassi et al (2017). Todo o material extraído foi armazenado em freezer à -20°C (Anexo O).

3.9.3 Quantificação do DNA

Após a extração do material genético das amostras de sangue e secreção conjuntival, realizou-se a quantificação do DNA (ng/µL) para verificar a quantidade de DNA em cada amostra e determinação do grau de pureza pela relação 260/280. Todas foram submetidas à quantificação utilizando-se o espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare, Bioscience/UK) (Anexo P).

3.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR)

A cPCR a partir das amostras de sangue para detecção do DNA de *Leishmania* spp. foi realizada (em duplicata) em termociclador MastercyclerPro® (Eppendorf) utilizando-se 1,3µL de tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl pH

8,4), 0,4µL de MgCl₂ (1,6 µM), 0,25µL de dNTPs (0,2µM), 0,25µL (1U) de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), 0,25µL (0,2µM) de cada primer, 1µL da amostra testada (10 ng/µL) e 8,3µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo apresentou 11µL do MIX-PCR e 1µL do produto de extração do DNA.

Para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir das amostras de células conjuntivais foi realizado uma nova amplificação com os mesmos *primers*, para aumentar a sensibilidade da técnica, utilizando-se 2µL do produto da primeira reação.

Foram utilizadas cepas (procedentes da Coleção de *Leishmanias* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC FIOCRUZ – RJ) de *Leishmania* (*L.*) *infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) e *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (MHOM/BR/IOC/L0575) como controles positivos da reação. Cada cepa foi previamente sequenciada geneticamente. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

3.9.4.1 Avaliação da integridade do DNA extraído e inibição da PCR

Para avaliar a integridade do DNA extraído (sangue e células conjuntivais), bem como, ausência de inibidores nas amostras, foi realizada a técnica molecular de cPCR com amplificação de uma região conservada do gene de β-globulina (DNA nuclear) de vertebrados que amplificam um produto de 140 pares de bases (pb) com o uso dos *primers*:

β-1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTTCAC-3')

β-2 (5'-CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3').

As condições de amplificação em termociclador MastercyclerPro® (Eppendorf) seguiu um ciclo inicial de 95°C por 50 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, seguindo uma extensão final à 72°C por 5 minutos (Edvinsson, 2006 com modificações).

3.9.4.2 cPCR de sangue total e células conjuntivais

Os ensaios de cPCR das amostras extraídas de sangue e células conjuntivais foram realizados com o uso de *primers* que amplificam regiões do DNA da família Trypanosomatidae; do gênero *Leishmania* spp. e específicos das espécies de *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* como mostra o Quadro 2.

Quadro 2: Especificação dos *primers* utilizados para pesquisa de família, gênero e espécies em amostras de sangue total de primatas não-humanos

cPCR das amostras de sangue e células conjuntivais			
	Região-alvo	<i>Primers</i> utilizados	Tamanho dos produtos (pb) ¹
Família Trypanosomatidae	ITS-2 (rRNA)	L5.8SR/LITSV	700 a 750pb
	V7/V8 (rRNA)	SSU561F/SSU561R	561pb
Gênero <i>Leishmania</i> spp.	Sequência do Mini-exon (nuclear)	FME/RME	223 a 226pb (<i>Viannia</i>) e 283 a 327pb (<i>Leishmania</i>)
<i>Leishmania infantum</i>	Gene 18S (rRNA)	LCS1/LCS3	259pb
<i>Leishmania braziliensis</i>	DNA do Minicírculo do Cinetoplasto (kDNA)	B1/B2	741pb
<i>Leishmania amazonensis</i>	Gene nuclear p53	A1/A2	62pb

¹Tamanho aproximado dos produtos amplificados em pares de base (pb).

cPCR para pesquisa de família Trypanosomatidae:

Para pesquisa de família Trypanosomatidae foram empregados *primers* que amplificam genes codificadores ssU rRNA e 5.8S rRNA da região ITS-2 (*Internal Transcribes Sapcer*) localizada entre as subunidades SSU- Subunidade menor/ LSU- Subunidade maior do DNA ribossomal (Figura 6) que amplificam um produto de 700 a 750pb. Os iniciadores utilizados foram L5.8SR (5'-AAGTGCGATAAGTGGTA-3') e LITSV (5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3'). As condições de amplificação foram desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e uma extensão final de 72°C durante 6 minutos (el Tai et al., 2000).

Outro par de *primer* utilizado na pesquisa por parasitos da família Trypanosomatidae, conhecido por ser *barcoding* dos tripanossomatídeos, que

amplificam a região V7-V8 do gene 16S SSU rRNA foram SSU561F (5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3') e SSU561R (5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-3') amplificando um produto de 561pb. O perfil de ciclagem foi de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos; 54°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos (Noyes et al., 1996).

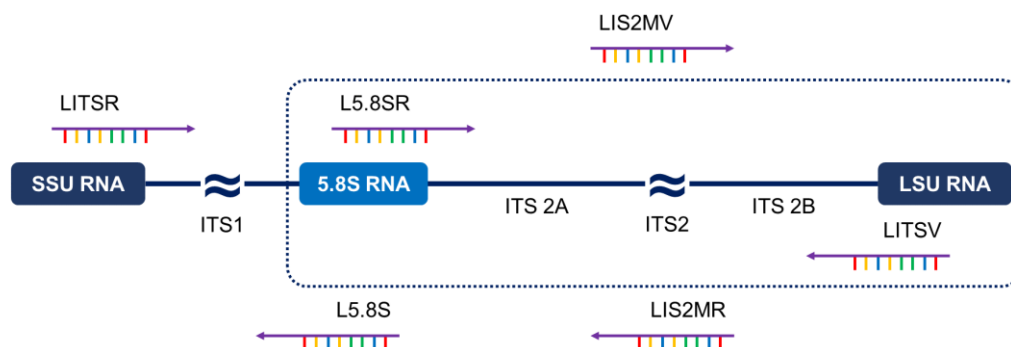


Figura 6: Representação do espaço de transcrição interno (ITS) da região ribossomal. A demarcação no esquema, representa a região ITS-2. Fonte: modificado de el Tai et al., 2000.

cPCR para amplificação do gênero *Leishmania* spp:

Para pesquisa do gênero de *Leishmania* spp. utilizou-se os *primers* FME (5'-TATTGGTATGCGAACTTCCG-3') e RME (5'-ACAGAACTGATACTTATATAGCG-3') que amplificam a região intergênica do gene do mini-exon ou *spliced leader* RNA (Figura 7) de aproximadamente 223 a 226pb para o subgênero *Viannia* e 283 a 327pb para o subgênero *Leishmania*. As condições de amplificação foram 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos; 54°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos (Marfurt et al., 2003).

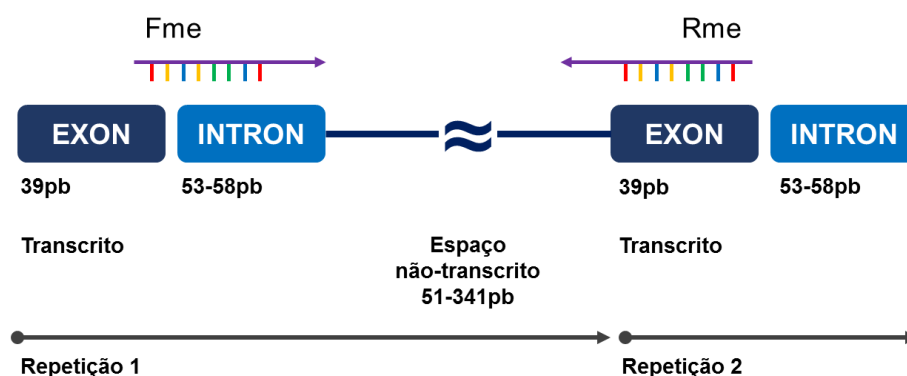


Figura 7: Repetição do mini-exon de *Leishmania* spp.. Cada repetição contém um exon altamente conservado (39 pb), uma região de íntron transcrita moderadamente variável (55 a 101 pb) e uma sequência espaçadora não transcrita e altamente variável (51 a 341 pb). A localização dos *primers* Fme e Rme é indicada pelas setas. Fonte: modificado de Marfurt et al., 2003.

cPCR espécie-específica para detecção de *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*:

Para amplificação espécie-específica de *Leishmania infantum*, as amostras foram submetidas à cPCR com os *primers* LCS1 (5'-GCAATGCCAGCTACATATATG-3') e LCS3 (5'-CAGCTTTTTGGGTGGGTAACA-3') que amplificam uma região de 259pb do gene 18S rRNA. A amplificação ocorreu com o perfil de ciclagem: 94°C por 2 minutos; seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 2 minutos (Neto et al., 2012).

A amplificação do kDNA de *Leishmania braziliensis* que amplificam 741pb foi realizada com os iniciadores B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') desenvolvido por De Bruijn e Barker (1992) cujo o perfil de ciclagem foi de um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos e 60°C por 1 minuto, seguido de 33 ciclos de 95°C por 30 segundos; 60°C por 1 minuto; 95°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 2 minutos (Alexander et al., 1998).

Algumas modificações foram necessárias para a realização da cPCR para amplificação de espécie-específica de *Leishmania amazonensis*. Para tanto, cada tubo de reação de 0,2mL recebeu 1,3μL de tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl pH 8,4), 0,4μL de MgCl₂ (1,6 μM), 0,25μL de dNTPs (0,2μM), 0,25μL (1U) de Taq-polimerase (*Platinum® Taq DNA Polymerase*, Invitrogen®), 0,50μL (0,2μM) de cada *primer*, 1μL da amostra testada (10 ng/μL) e 7,8μL de água ultrapura (MIX-PCR). Dessa forma, cada tubo apresentou 11μL do MIX-PCR e 1μL do DNA extraído. Na reação, empregou-se os *primers* que amplificam a região do gene nuclear p53 com os iniciadores A1 (5'-TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA-3') e A2 (5'-GTGCCCTGACTTGCATGTCTA-3') que resultam em 62pb. As condições de amplificação foram de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C por 90 segundos; 72°C por 90 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos (Mimore et al., 1998).

3.9.5 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 10μL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2μL de tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol, 30%

de glicerol e 70% de água Milli-Q, e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A identificação dos produtos amplificados foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1,5% e a 3% (para *L. amazonensis*), corado com SYBR Safe® DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) 0,1µL/mL. A voltagem utilizada foi de 100V por 50 minutos (*Electrophoresis Power Supply EPS 301*). Para o padrão de peso molecular, utilizou-se o LowRanger 100pb e 50pb (*L. amazonensis*) DNA Ladder /NORGEN® e o tamanho dos fragmentos amplificados, foram comparados visualmente com o padrão de peso molecular utilizados como controles positivos com o uso do Transiluminador Ultraviolet (MS Major Science® UVDI) acoplado a uma câmera fotográfica.

3.9.6 Caracterização molecular (das amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR) com o uso de alvos gênicos direcionado ao Citocromo de *Leishmania* spp.

Para todas amostras amplificadas, utilizando-se *primers* descritos no item 3.9.4.2 (cPCR de sangue total e células conjuntivais) deste trabalho, realizou-se novas reações com o uso de *primers* direcionados aos genes mitocondriais baseados no citocromo B (cytB); *primers* para as sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA) e *primers* direcionados às sequências codificadoras direcionado ao DNA nuclear de citocromo C (cytC).

As condições de amplificação foram 94°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30s, T°C por 30s e 72°C por 30s (sendo que o valor T°C para cada conjunto de *primer* pode ser visualizado na Tabela 6) e uma extensão final de 72°C por 5min. Os alvos gênicos CytB, CytOxII e CytC, foram realizados baseado no estudo de Lopes et al. (2016).

Tabela 6: Sequência de nucleotídeos dos *primers* empregados na análise molecular, tamanho dos fragmentos amplificados (pb) e a temperatura (T°C) de anelamento de cada *primer*.

Gene	Alvo-gênico	Primers	Sequência	Fragmento / T°C
Cytochrome B	Gene mitocondrial	CytB/F1 CytB/R2	5'ATGCATTTTGTGTTTACATTATTTTA3' 5'GAACTTCKACAATAHACAAATCATAATA3'	377pb / 52°C
Cytochrome Oxidase II	Gene mitocondrial	CytOxII/F1 CytOxII/R2	5'TGGCTTTTATWTTATCATTTTGAATG3' 5'GCATAA ATCCATGTAAACACCACA3'	602pb / 52°C
Cytochrome C	Gene 18S rRNA do DNA nuclear	CytC/F3 CytC/R2	5'GYGGYGAGAAGCTGTTCAAG3' 5'CGACATCTTCGTGCCAGGCATAA3'	230pb / 60°C

3.9.7 Sequenciamento - Método de Sanger

As amostras de sangue amplificadas com o uso de *primers* direcionados às sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA), foram encaminhadas ao sequenciamento genético BPI - Biotecnologia Pesquisa e Inovação, que pertence ao grupo *Genotyping* Laboratório de Biotecnologia LTDA, Botucatu, SP, avaliadas em gel de agarose 2% corados com *UniSafe Dye*® 0,03% (v/v) e visualizado sob luz UV. O sequenciamento automático por eletroforese capilar ocorreu no equipamento ABI3730xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) com o uso do kit *BigDye*® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®) com precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio, com protocolo sugerido pelo fabricante.

Após o sequenciamento, foi realizada análise dos eletroferogramas utilizando o programa Chromas v. 2.3 (*Technelysium Pty Ltd, Australia*) e as sequências submetidas ao alinhamento global no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA X) para *Windows*® (Kumar et al., 2018). As sequências “sense” (ou *forward*) foram submetidas ao BLASTn (*nucleotide basic local alignment search tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparadas com as sequências já depositadas na base de dados do GenBank.

3.9.8 Inferências filogenéticas

As sequências (*sense*) obtidas pelo sequenciamento genético – método *Sanger*, foram alinhadas pelo método do alinhamento múltiplo *CLUSTAL/W*. A análise foi inferida pelo método de *Maximum Likelihood* (ML) e o modelo Tamura 3-parameter (Tamura, 1992), utilizando-se o *software* MEGA X (*maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*) (Kumar et al., 2018). O mesmo *software* foi usado para executar os alinhamentos de nucleotídeos e determinar o modelo de substituição, usando a análise de seleção de modelo. Utilizou-se o modelo *bootstrap* (1000 repetições).

A árvore foi obtida automaticamente aplicando os algoritmos *NJ* e *BioNJ* a uma matriz de distâncias aos pares estimada usando a abordagem de *Maximum Composite Likelihood* (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor superior de *likelihood* de log. Somente valores de *bootstrap* (BS) (*cut-off*) iguais ou maiores que 70 são mostrados na árvore.

A análise envolveu 24 sequências nucleotídicas (12 amostras de sangue, uma de suabe conjuntival, nove espécies de *Leishmania* e duas espécies como grupo externo) (Quadro 3). O grupo externo foi utilizado para a comparação da distância evolutiva entre ele e as outras espécies presentes na árvore, uma vez que, apesar de pertencerem a gêneros diferentes, compartilham muitas características genéticas. Todas as sequências utilizadas para fins de comparação foram obtidas pelo *Nucleotide NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) e buscadas por “*Leishmania* cytochrome oxidase subunit II (COII) gene”.

Quadro 3: Sequências nucleotídicas envolvidas na inferência filogenética.

Local/Amostra/Espécie	
CENP	
PA02 - <i>Ateles marginatus</i>	
PA03 - <i>Ateles marginatus</i>	
PA04 - <i>Ateles marginatus</i>	
Zoo Salvador	
BA02* - <i>Sapajus xanthosternos</i>	
BA07 - <i>Sapajus xanthosternos</i>	
BA11 - <i>Sapajus xanthosternos</i>	
BA14 - <i>Sapajus xanthosternos</i>	
BA15 - <i>Sapajus xanthosternos</i>	
BA37 - <i>Sapajus flavius</i>	
BA39 - <i>Alouatta caraya</i>	
BA47 - <i>Ateles paniscus</i>	
Zoo Brasília	
DF45 – Sem identificação	
DF56 <i>Alouatta caraya</i>	
Espécies de <i>Leishmania</i> spp.	Nº de Acesso
<i>Leishmania infantum</i>	KF815207.1
<i>Leishmania tropica</i>	HQ586847.1
<i>Leishmania major</i>	KU680820.1
<i>Leishmania mexicana</i>	HQ586845.1
<i>Leishmania amazonensis</i>	HQ586836.1
<i>Leishmania colombiensis</i>	KF302725.1
<i>Leishmania lainsoni</i>	KF302724.1
<i>Leishmania braziliensis</i>	KF302719.1
<i>Leishmania guyanensis</i>	KF302718.1
Grupo externo	
<i>Crithidia fasciculata</i>	KU680826.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	KT337308.1

*Amostra sequenciada a partir de suabe conjuntival.

3.9.9 Discriminação de espécies de *Leishmania* por Análises de Dissociação de DNA em Alta Resolução (HRM)

Para discriminação de espécies de *Leishmania* das amostras de sangue amplificadas com o uso de *primers* descritos no item 3.9.4.2 (cPCR de sangue total e células conjuntivais) deste trabalho, foi realizada a técnica de análises de perfis de dissociação em alta resolução - HRM (*High resolution melting*).

Inicialmente foi realizada uma pré-amplificação (cPCR) em termociclador (96 *Well Thermal Cycler*, Applied Biosystems) do gene *hsp70* que amplificam o gene codificador de proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*) de *Leishmania* spp. a fim de se restringir a região de interesse, com a amplificação do DNA específico de *Leishmania* com 380pb. Os *primers* utilizados foram *hsp70* Preamp.F (5' GGCATCCTGAACGTGTCCG3') e *hsp70* Preamp. R

(5'ATCTTGGTCATGATCGGGTTGCAT3'). As condições de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Após o fim da reação, os produtos foram mantidos a 8°C (Graça et al., 2012).

A análise de dissociação pela curva de *Melting* foi realizada de acordo com Graça et al. (2012), e adaptações de Zampieri et al. (2016). Os *primers* utilizados, bem como a sequência de cada um e o tamanho do fragmento que amplificam podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7: *Amplicons* utilizados na técnica de HRM

<i>Primers</i> utilizados	Tamanho dos <i>amplicons</i>	Sequência
<i>Amplicon 1:</i> hsp70F2 hsp70C anti-sense	144pb	5'GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG3' 5'TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG3'
<i>Amplicon 2:</i> hsp70F1 hsp70R1	104pb	5'AGCGCATGGTGAACGTGCGTC3' 5'CTTCA TCGAGTACGCGTAGTTCTCC3'

O *Amplicon 1* é mais generalista, conseguindo distinguir a maioria das espécies. Já o *amplicon 2* é específico para as espécies do subgênero *Viannia*, permitindo a segregação dos padrões desse grupo (Zampieri et al., 2016).

Para cada reação de qPCR seguida por HRM, utilizou-se um volume final de 20,0µL, sendo 10,0µL do *Meltdoctor™ HRM Master-mix* (Applied Biosystems®, *Life Technologies*, EUA) com o fluoróforo *Meltdoctor™ HRM Dye/SYTO 9* (*Life Technologies*), 0,6µL de cada oligonucleotídeo (0,2µM), 3,8µL de água ultrapura e 5,0µL do DNA extraído com concentração ajustada de 10,0 ng/µL.

O *mix* foi preparado em capela de fluxo laminar e 15µL foram distribuídos na placa de 96 poços (de 0,1mL para cada poço) (*MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 0.1mL* – Applied Biosystemns/*Life Technologies*) e após, acrescentado 5µL de cada amostra em cada poço.

Os ensaios de HRM foram realizados ao final de cada PCR em tempo real (qPCR). As condições de amplificação em tempo real e análise de *melting* consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos, com a captura de sinais de fluorescência no

final de cada fase, seguido por uma curva de dissociação para a análise de HRM em *Termociclador StepOne™ Plus Real Time PCR System* (Life Technologies, USA).

A análise de dissociação dos *amplicons* foi realizada com captura de sinais de fluorescência em intervalos de 0,2°C e mantendo-se por 10 segundos em cada faixa da curva de *melting* (entre 60°C e 95°C). A aquisição dos dados de fluorescência e a construção dos perfis de dissociação foram realizados usando o *software* v.3.0.1 (Life Technologies, USA). O *software* do HRM normaliza as curvas de *melting* em relação aos valores de pré e pós-*melting* designando como 100% e 0%, respectivamente. O *software* determina a diferença normalizada que significa a diferença da relação do sinal/ruído de cada amostra versus uma sequência que é definida pelo usuário. O parâmetro denominado “*Call efficiency*” é o valor de referência medido em porcentagem da semelhança entre dois perfis de dissociação usando os valores de fluorescência e T_m como parâmetros. O *software* realiza uma comparação emparelhada entre o perfil da amostra e de cada cepa utilizada como controle e escolhe o padrão que tem o valor mais próximo (Zampieri et al., 2016).

As amostras foram avaliadas em duplicata, sendo comparadas às cepas padrão das espécies: *Leishmania infantum* (MCER/BR/1981/M6445); *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) fornecidas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP). Para garantir a correta diferenciação das espécies, realizou-se o sequenciamento genético de cada uma delas, previamente à sua utilização. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Todos os *amplicons* encontravam-se na mesma diluição, de 1:10 (10µL produto da cPCR + 90µL de água ultrapura) a fim de se evitar interpretações equívocas e análises incorretas. Os gráficos que contêm as médias e desvios-padrão dos valores de T_m obtidos pela análise do HRM foram feitas utilizando-se o *software* GraphPad PRISM v. 6.02.

A Figura 8 mostra o mapa de localização dos *amplicons* no gene hsp70 e o número de pares de base que amplificam. Neste trabalho foram utilizados os *amplicons* 1 e 2.

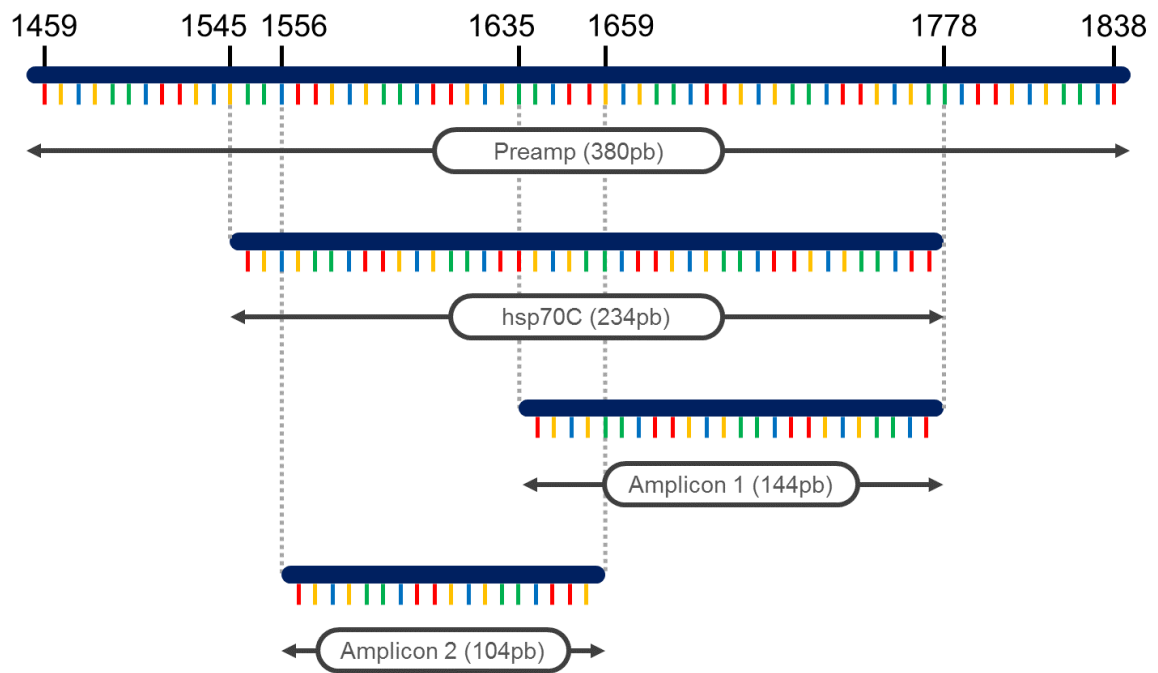


Figura 8: Mapa com a localização e tamanho dos fragmentos de DNA dos *amplicons* 1 e 2 utilizados neste trabalho. A numeração indica o posicionamento dos fragmentos com relação à sequência completa do gene HSP70. Fonte: arquivo pessoal embasado e modificado a partir de Zampieri, 2019.

Resultados

4 Resultados

4.1 Animais do estudo

Foram coletados, no período de outubro de 2016 a outubro de 2019, amostras biológicas de 189 primatas adultos. Destes, 166 foi possível colher amostras de soro; de 149 foram colhidas amostras de sangue (sendo que de 127 animais foram colhidas amostras de soro e sangue); foram feitas lâminas de extensão sanguínea de 140 animais e de 118 primatas foram coletados suabes de células conjuntivais. O número de amostras biológicas total processadas neste trabalho foi de 573 (sangue; soros; lâminas sanguíneas e suabes conjuntivais) (Tabela 8).

Tabela 8: Total de amostras biológicas (Sangue; soro; lâmina sanguínea e suabe conjuntival) de cada local amostrado.

	CENP	Zoo Salvador	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Zoo Brasília	Total
Sangue	10	53	48	18	20	149
Soro	10	53	44	17	42	166
Suabe	10	46	45	12	5	118
Lâmina	10	53	46	17	14	140
Total	40	206	185	64	81	573

Registros fotográficos referentes aos locais da pesquisa, com imagens de alguns primatas, colheitas de material biológico e ambientalização dos recintos podem ser visualizadas no Apêndice F. Foram realizadas visitas técnicas nos quatro zoológicos do trabalho. O único lugar que não foi possível a visita foi o Centro Nacional de Primatas do Pará devido dificuldades burocráticas e financeiras.

4.2 Exame parasitológico

4.2.1 Lâminas de extensão sanguínea

Foi realizada extensão sanguínea de 140 PNH do estudo (lâminas em duplicata). O número total de lâminas e a relação em porcentagem (número de lâminas pelo número de animais) para cada local da pesquisa podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9: Número de lâminas e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.

	Total de Primatas	Lâminas de extensão	Relação (em %)
CENP	10	10	100,0
Zoo Salvador	54	53	98,1
Zoo Sorocaba	48	46	95,8
Zoo Curitiba	18	17	94,4
Zoo Brasília	59	14	23,7
Total	189	140	74,0

Quatro primatas cativos (4/140-2,85%) apresentaram lâminas compatíveis¹ com formas amastigotas (Figura 9, Figura 10 e Figura 11) de *Leishmania* spp. (Tabela 10). A maioria das lâminas com formas sugestivas do parasito também apresentaram numerosas células de defesa, indicando uma possível infecção.

Tabela 10: Primatas, por localidade, com presença de lâminas de extensão sanguínea sugestivas de *Leishmania* spp.

Local (amostra)	Nome científico	Nome popular
Cenp		
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
Zoológico de Salvador:		
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
Zoológico de Sorocaba:		
SP28	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
SP42	<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui-de-tufos-brancos

¹ O primata do Pará - PA09 (*Ateles marginatus*) apresentou lâmina positiva com outro protozoário que não foi alvo da pesquisa. A lâmina continha formas compatíveis com *Plasmodium* spp., agente causador da malária. (Apêndice G).

A Tabela 11 mostra a porcentagem de lâminas de extensão positivas para cada local, revelando que o Centro Nacional de Primatas no Pará foi o que apresentou maior porcentagem de animais positivos ao teste parasitológico (10%).

Tabela 11: Porcentagem de animais positivos ao teste parasitológico de lâmina de extensão sanguínea.

Local	Nº de extensões sanguínea	Nº de animais com formas amastigotas	Porcentagem de positividade
CENP	10	01	10%
Zoo Salvador	53	01	1,8%
Zoo Sorocaba	46	02	4,3%
Zoo Curitiba	17	0	0%
Zoo Brasília	14	0	0%
Total	140	04	2,8%

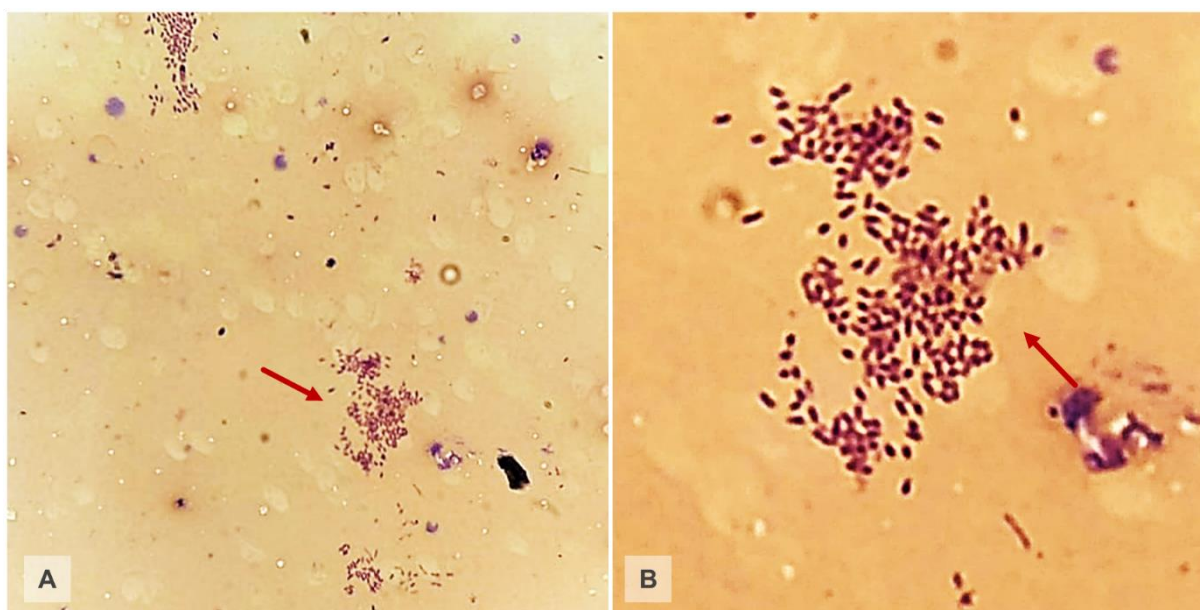


Figura 9: Lâmina de extensão sanguínea do primata PA03 da espécie *Ateles marginatus* (macaco-aranha-de-cara-branca) do plantel do Centro de Conservação de Primatas no Pará com formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* spp. Em A e B ninhos de amastigotas. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal).

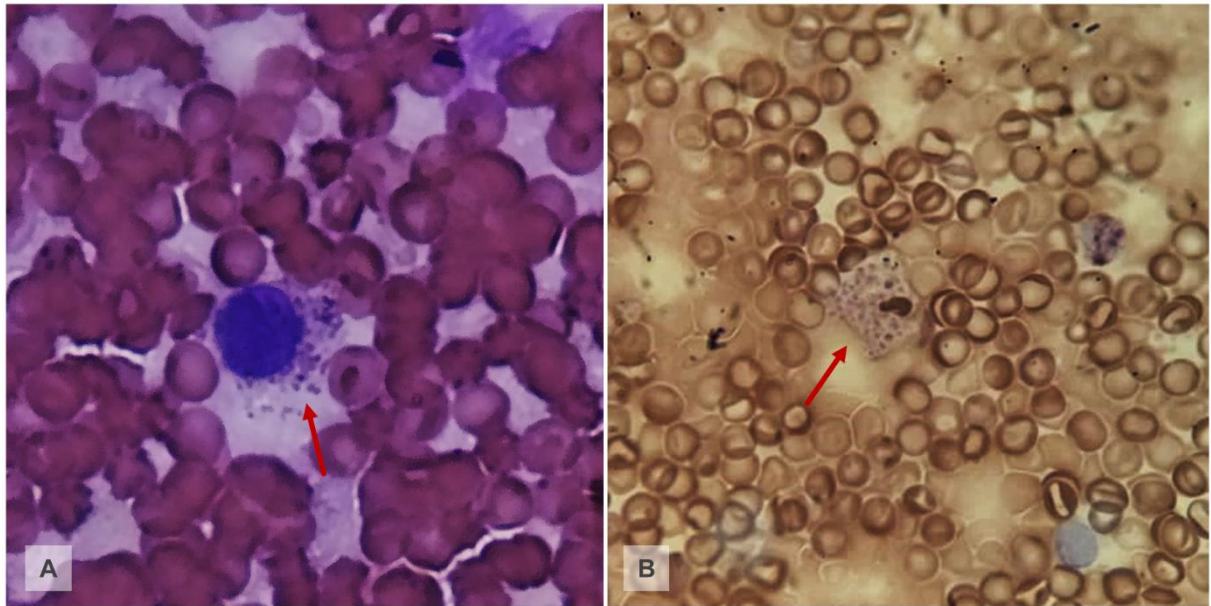


Figura 10: Lâmina de extensão sanguínea com formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* spp. Em A, primata do zoológico de Salvador – BA14. Em B, primata do zoológico de Sorocaba – SP42. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal).

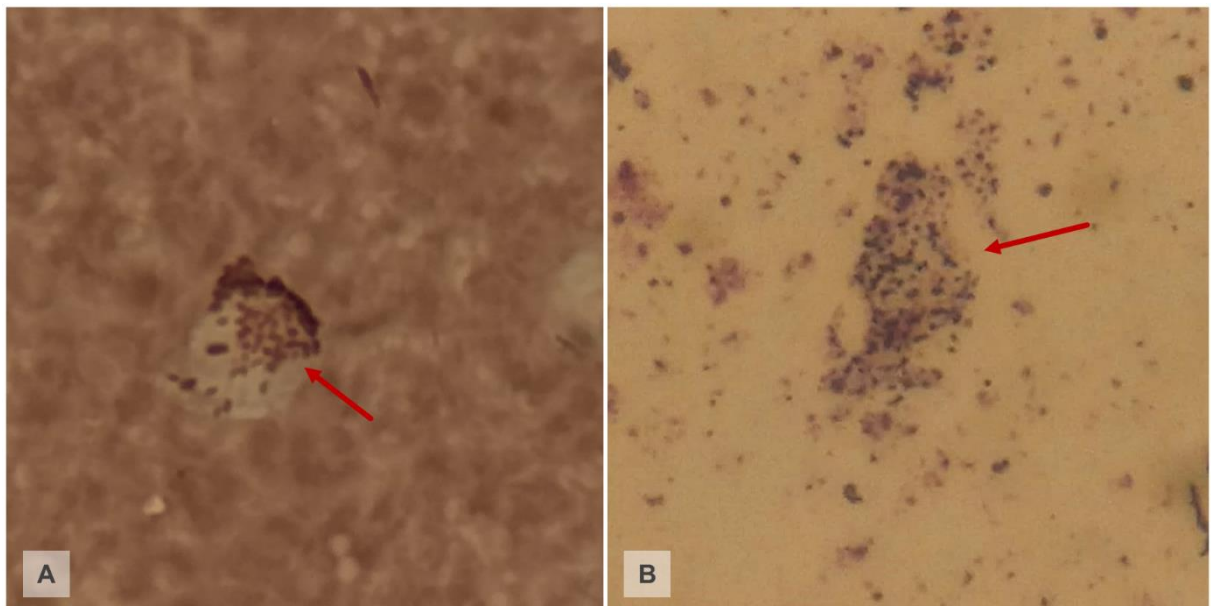


Figura 11: Lâmina de extensão sanguínea do primata do zoológico de Sorocaba – animal SP28. Em A, pode-se visualizar formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* spp. Em B (animal SP28), aglomerado de formas suspeitas de amastigotas. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal).

4.3 Exame Sorológico

4.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Foi realizado o teste sorológico para todas as 166 amostras de soro dos animais. A Tabela 12 contém os dados do número total de amostras de soro em cada localidade do estudo e a relação em porcentagem (número de amostras de soro de cada local pelo número total).

Tabela 12: Número de amostras de soro e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.

	Total de Primatas	Amostras de Soro	Relação (em %)
CENP	10	10	100
Zoo Salvador	54	53	98,1
Zoo Sorocaba	48	44	91,7
Zoo Curitiba	18	17	94,4
Zoo Brasília	59	42	71,2
Total	189	166	87,8

A técnica de RIFI com o uso do conjugado específico contendo Anti-Anticorpo IgG de macaco (IgG – γ – chain specific – Sigma – Aldrich®, St. Louis, USA), não revelou nenhuma amostra reagente.

Já com o uso do conjugado IgG de cabra anti-humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (anti-humano/FITC) da Bio-Manguinhos®, oito amostras foram reagentes (4,81%), sete delas com titulação igual a 40 e uma delas com título 80, são elas (Tabela 13):

Tabela 13: Amostras reagentes à RIFI com conjugado IgG de cabra anti-humano.

Amostras reagentes na sorologia por RIFI			
Local/Amostra	Nome científico	Nome popular	Titulação
Zoo Salvador			
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo	40
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	80
BA52	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-testa-branca	40
BA54	<i>Sapajus flavius</i>	Macaco-prego-dourado	40
Zoo Sorocaba			
SP05	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	40
Zoo Brasília			
DF18	<i>Alouatta belzebul</i>	Guariba-de-mãos-ruivas	40
DF34	<i>Sapajus libidinosus</i>	Macaco-prego-amarelo	40
DF39	<i>Saguinus niger</i>	Sagui-preto	40

A Tabela 14 mostra a porcentagem de animais positivos para cada local, revelando que o Zoológico de Salvador foi o que apresentou maior porcentagem de reagentes ao teste sorológico (7,54%).

Tabela 14: Porcentagem de animais reagentes à RIFI de cada local do estudo.

Local	Nº total de soro	Nº de animais reagentes na RIFI	Porcentagem de reagentes
CENP	10	0	0%
Zoo Salvador	53	4	7,54%
Zoo Sorocaba	44	1	2,27%
Zoo Curitiba	17	0	0%
Zoo Brasília	42	3	7,14%
Total	166	8	4,81%

4.4 Análises Moleculares

4.4.1 Quantificação do DNA

Após a extração do DNA das amostras de sangue (total de 149) e células conjuntivais (total de 118), foi realizada

A quantificação do DNA extraído das amostras de sangue (total de 149) mostrou um valor mínimo de -3,6 ng/μL; um valor máximo de 218,5 ng/μL e uma média de quantificações equivalente a 51,52 ng/μL. A média da relação 260/280 foi de 1,8.

A quantificação do DNA extraído das amostras de células conjuntivais (total de 118) obteve um valor mínimo de 2,1 ng/μL; valor máximo de 83,0 ng/μL e média de 10,42 ng/μL. A média da relação 260/280 foi de 2,93.

A quantificação para determinação da concentração de DNA (ng/μL) e relação 260/280 para todas as amostras pode ser visualizada no Apêndice H.

4.4.2 Avaliação da integridade do DNA extraído e inibição da PCR

Nas reações de cPCR realizadas com *primers* que amplificam uma região conservada do gene de β-globulina de vertebrados, todas as amostras (sangue e células conjuntivais) amplificaram com produto de tamanho esperado (140pb). Assim, foi possível verificar a integridade do DNA extraído e a ausência de inibidores nas amostras.

4.4.3 cPCR de sangue total

Foi possível realizar a cPCR em todas as 149 amostras de sangue. A Tabela 15 contém os dados do número total de amostras de sangue em cada localidade do estudo e a relação em porcentagem (número de amostras de sangue de cada local pelo número total).

No diagnóstico molecular para pesquisa de família Trypanosomatidae com o uso dos *primers* L5.8SR/LITSV, que amplificam a região ITS-2, não houve positividade em nenhuma amostra pesquisada.

Tabela 15: Número de amostras de sangue e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.

	Total de Primatas	Amostras de Sangue	Relação (em %)
CENP	10	10	100
Zoo Salvador	54	53	98,1
Zoo Sorocaba	48	48	100
Zoo Curitiba	18	18	100
Zoo Brasília	59	20	33,9
Total	189	149	78,8

Com outro par de *primers* empregado para pesquisa de família Trypanosomatidae, (SSU561F/SSU561R), 14 (9,39%) animais apresentaram amplificação com fragmentos de tamanho de 561pb (quatro primatas do CENP; sete animais do zoológico de Salvador e três do zoológico de Brasília) (Tabela 16).

Tabela 16: Animais, por localidade, com amostras de sangue amplificadas com *primers* SSU561F/SSU561R para pesquisa de Família Trypanosomatidae. Partes destacadas na tabela indicam os PNH com lâminas compatíveis com formas amastigotas do parasito neste estudo.

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> SSU561F/SSU561R		
Local/Amostra	Nome científico	Nome popular
CENP		
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
Zoo Salvador		
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo

BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	Macaco-prego-dourado
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	Macaco-aranha-de-cara-vermelha
Zoo Brasília		
DF45	Sem identificação	Sem identificação
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	Sauim-de-coleira
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	Sauim-de-coleira

4.4.3.1 cPCR para amplificação do gênero *Leishmania* spp:

Com os *primers* FME e RME que amplificam a sequência do mini-exon de *Leishmania* spp. nenhuma amostra foi amplificada.

4.4.3.2 cPCR espécie-específica para detecção de *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*:

Os *primers* específicos para detecção de *Leishmania infantum*, LCS1 e LCS3, permitiram a detecção do parasito em três primatas (2,01%), sendo um primata do zoológico de Salvador; um de Sorocaba e um de Brasília, com fragmento de aproximadamente 259pb (Tabela 17).

Tabela 17: Animais, por localidade, com amostras de sangue amplificadas com *primers* LCS1 e LCS3 para pesquisa de *Leishmania infantum*.

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> LCS1/LCS3		
Local/Amostras	Nome científico	Nome popular
Zoo Salvador		
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo
Zoo Sorocaba		
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	Zogue-zogue
Zoo Brasília		
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto

Os *primer* B1 e B2 específicos para *Leishmania braziliensis* apresentou seis amostras amplificadas (4,02%) (cinco de Sorocaba e uma do zoológico de Brasília) (Tabela 18).

Tabela 18: Animais, por localidade, com amostras de sangue amplificadas com *primers* B1 e B2 para pesquisa de *Leishmania braziliensis*.

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> B1/B2		
Local/Amostra	Nome científico	Nome popular
Zoo Sorocaba		
SP01	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
SP10	<i>Ateles chamek</i>	Macaco-aranha-de-cara-preta
Zoo Brasília		
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	Macaco-da-noite

Para pesquisa específica de *Leishmania amazonensis* com o uso dos *primers* A1 e A2 nenhuma amostra amplificou.

No total, com todos os *primers* empregados, 22 (14,76%) amostras (de sangue) apresentaram amplificação de fragmento de DNA, sendo quatro amostras do CENP; sete do zoológico de Salvador; seis do zoológico de Sorocaba e cinco do zoológico de Brasília como mostra a Tabela 19 .

Tabela 19: Todas as amostras de sangue amplificadas na cPCR.

		Primers utilizados		
Local/Amostra	Nome científico	SSU561F/SSU561R (Trypanosomatidae)	LCS1/LCS3 (<i>L. infantum</i>)	B1/B2 (<i>L. braziliensis</i>)
CENP				
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	-
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	-
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	-
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	-
Zoo Salvador				
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+	-
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-	-
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-	-
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-	-
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	+	-	-
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	+	-	-
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	+	-	-
Zoo Sorocaba				

SP01	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
SP10	<i>Ateles chamek</i>	-	-	+
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	-	+	-
Zoo Brasília				
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	-	-	+
DF45	Não informado	+	-	-
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-	-
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-	-
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	-
Total		14	3	6

Legenda: +: amostra amplificada; -: amostra não amplificada.

A Figura 12 esquematiza as 22 amostras de sangue dos PNH que amplificaram fragmentos de DNA com o uso de todos os *primers* empregados nesta pesquisa (SSU561F/SSU561R para pesquisa de família Trypanosomatidae, LCS1/LCS3 para *L. infantum* e B1/B2 para *L. braziliensis*). Das 22 amostras, seis amplificaram para o kDNA de *L. braziliensis*, outras 14 amplificaram para região V7 e V8 de família Trypanosomatidae e três para o gene 18S rRNA de *L. infantum*, sendo que uma dessas três, também amplificou com o uso de *primers* para o V7 e V8.

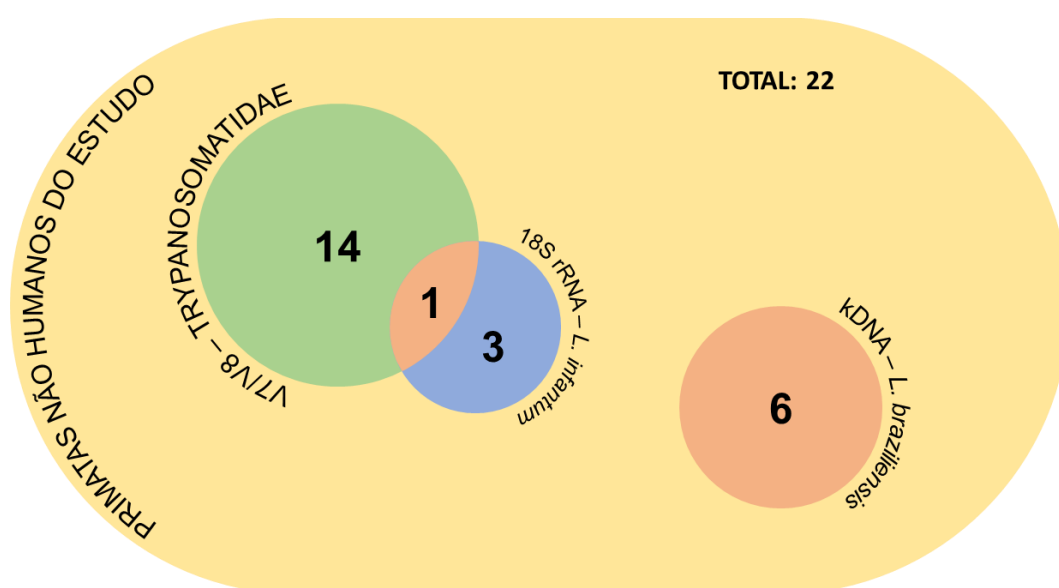


Figura 12: Demonstração das amostras positivas no estudo para as diferentes regiões alvo empregadas. Fonte: arquivo pessoal.

A Tabela 20 mostra a porcentagem de animais positivos para cada local, revelando que o Centro Nacional de Primatas no Pará foi o que apresentou maior porcentagem de animais positivos ao teste molecular com as amostras de sangue (40%).

Tabela 20: Porcentagem de positividade na cPCR das amostras de sangue de cada local estudado.

Local	Nº total de sangue	Nº de animais positivos na cPCR	Porcentagem de positividade
CENP	10	04	40%
Zoo Salvador	53	07	13,2%
Zoo Sorocaba	48	06	12,5%
Zoo Curitiba	18	0	0%
Zoo Brasília	20	05	25%
Total	149	22	14,7%

A Tabela 21 mostra os resultados obtidos nesta pesquisa com os exames parasitológico de esfregaço por extensão; sorológico pela técnica de RIFI e molecular pela técnica de cPCR nas amostras de sangue. É possível verificar todos os animais positivos em apenas uma das técnicas e/ou em mais de uma e os locais de onde os PNH são procedentes. A Figura 13 esquematiza os oito animais que foram reagentes à RIFI, quantos deles foram reagentes na RIFI e também positivos na cPCR e em quantos foi possível a realização apenas da RIFI, não sendo realizada a técnica molecular.

Tabela 21: Animais positivos em todas as técnicas utilizadas neste estudo. Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal foi positivo em mais de uma técnica utilizada.

Local/Amostra	Nome científico	Esfregaço por extensão	cPCR	RIFI
CENP				
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	NR
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	+	NR
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	NR
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	NR
Zoo Salvador				
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	R
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	NR

BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+	NR
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	NR
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	-	+	NR
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	R
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	-	+	NR
BA52	<i>Ateles marginatus</i>	-	-	R
BA54	<i>Sapajus flavius</i>	-	-	R
Zoo Sorocaba				
SP01	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	NR
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	NR
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	NR
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	NR
SP05	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	R
SP10	<i>Ateles chamek</i>	-	+	NR
SP28	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	NR
SP42	<i>Callithrix jacchus</i>	+	-	NR
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	-	+	NR
Zoo Brasília				
DF18	<i>Alouatta belzebul</i>	-	-	R
DF34	<i>Sapajus libidinosus</i>	-	-	R
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	-	+	NR
DF39	<i>Saguinus niger</i>	-	-	R
DF45	Não informado	-	+	NR
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	-	+	NR
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	-	+	NR
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	NR
Total		4	22	8

Legenda: +: animal positivo; -: animal negativo; R: animal reagente; NR: animal não reagente.



Figura 13: Representação dos oito PNH reagentes à técnica sorológica de RIFI e comparação com os resultados da PCR das amostras de sangue. Desses oito, dois foram reagentes e positivos tanto na RIFI como na PCR; três foram reagentes apenas na RIFI, mas não na PCR e em três animais foi realizado apenas a RIFI por apresentarem somente amostras de soro. Fonte: arquivo pessoal.

4.4.4 cPCR de Células Conjuntivais (a partir de suabes)

Foi possível realizar a cPCR em 118 PNH que tiveram células conjuntivais coletadas. A Tabela 22 contém os dados do número total de amostras de células conjuntivais em cada localidade do estudo e a relação em porcentagem (número de amostras de células conjuntivais de cada local pelo número total).

Tabela 22: Número de amostras de células conjuntivais/suabes e a porcentagem pelo número total de animais de cada local da pesquisa.

	Total de Primatas	Amostras de Suabes	Relação (em %)
CENP	10	10	100
Zoo Salvador	54	46	85,18
Zoo Sorocaba	48	45	93,75
Zoo Curitiba	18	12	66,66
Zoo Brasília	59	05	8,47
Total	189	118	62,43

Este é o primeiro trabalho que utiliza uma técnica pouco invasiva (suabe conjuntival) e que identifica *Leishmania* spp. em amostras de PNH.

No diagnóstico molecular para pesquisa de família Trypanosomatidae com o uso dos *primers* L5.8SR/LITSV, que amplificam a região ITS-2, dois (1,69%) animais apresentaram amplificação com fragmentos de tamanho de 700pb (um primata do zoológico de Salvador e um de Sorocaba) (Tabela 23).

Tabela 23: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com *primers* L5.8SR/LITSV para pesquisa de Família Trypanosomatidae.

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> L5.8SR/LITSV		
Local/Amostras	Nome científico	Nome popular
Zoo Salvador		
BA05	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo
Zoo Sorocaba		
SP08	<i>Alouatta guariba</i>	Bugio-marrom

Com outro par de *primers* empregado para pesquisa de família Trypanosomatidae, (SSU561F/SSU561R), sete (5,93%) animais apresentaram amplificação com fragmentos de tamanho de 561pb (seis PNH do CENP e um do zoológico de Salvador) (Tabela 24).

Tabela 24: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com *primers* SSU561F/SSU561R para pesquisa de Família Trypanosomatidae.

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> SSU561F/SSU561R		
Local/Amostra	Nome científico	Nome popular
CENP		
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA08	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
Zoo Salvador		
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo

4.4.4.1 cPCR para amplificação do gênero *Leishmania* spp:

Com os *primers* FME e RME que amplificam a sequência do mini-exon de *Leishmania* spp., oito (6,77%) PNH apresentaram amplificação com fragmentos de tamanho de 800pb (quatro do zoológico de Salvador e quatro de Sorocaba) (Tabela 25).

Tabela 25: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com *primers* FME/RME para pesquisa de gênero *Leishmania* spp..

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> FME/RME		
Local/Amostras	Nome científico	Nome popular
Zoo Salvador		
BA19	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo
BA20	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo
BA36	<i>Sapajus flavius</i>	Macaco-prego-dourado
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
Zoo Sorocaba		
SP14	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-testa-branca
SP29	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-testa-branca
SP36	<i>Aotus trivirgatus</i>	Macaco-da-noite
SP44	<i>Chiropotes utahickae</i>	Cuxiú

4.4.4.2 cPCR espécie-específica para detecção de *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*:

Os *primers* específicos para detecção de *Leishmania infantum*, LCS1 e LCS3, permitiram a detecção do parasito em quatro PNH (3,38%), sendo um primata do CENP, dois do zoológico de Salvador e um de Sorocaba como mostra a Tabela 26.

Tabela 26: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com *primers* LCS1/LCS3 para pesquisa de *Leishmania infantum*.

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> LCS1/LCS3		
Local/Amostras	Nome científico	Nome popular
CENP		
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
Zoo Salvador		
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo
Zoo Sorocaba		
SP09	<i>Alouatta guariba</i>	Bugio-marrom

Os *primers* B1 e B2 específicos para *Leishmania braziliensis* amplificou três amostras (2,54%), sendo um PNH de Salvador e dois do zoológico de Sorocaba (Tabela 27).

Tabela 27: Animais, por localidade, com amostras de células conjuntivais amplificadas com *primers* B1/B2 para pesquisa de *Leishmania braziliensis*.

Amostras amplificadas com os <i>primers</i> B1/B2		
Local/Amostras	Nome científico	Nome popular
Zoo Salvador		
BA06	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-de-peito-amarelo
Zoo Sorocaba		
SP017	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
SP19	<i>Brachyteles arachnoides</i>	Muriqui-do-sul

Para pesquisa específica de *L. amazonensis* com o uso dos *primers* A1 e A2 nenhuma amostra amplificou.

No total, com todos os *primers* empregados, 22 (18,64%) amostras de células conjuntivais amplificaram DNA, sendo seis amostras do CENP; oito do zoológico de Salvador e oito do zoológico de Sorocaba como mostra a Tabela 28.

Tabela 28: Todas as amostras de células conjuntivais amplificadas na cPCR. Partes destacadas na tabela indicam os primatas que também foram positivos na cPCR com amostras de sangue.

Local/Amostra	Nome científico	Primers				
		L5.8SR/LITSV	561F/561R	FME/RME	LCS1/LCS3	B1/B2
CENP						
PA02	Ateles marginatus	-	+	-	-	-
PA03	Ateles marginatus	-	+	-	-	-
PA04	Ateles marginatus	-	+	-	+	-
PA05	Ateles marginatus	-	+	-	-	-
PA08	Ateles marginatus	-	+	-	-	-
PA09	Ateles marginatus	-	+	-	-	-
Zoo Salvador						
BA02	Sapajus xanthosternos	-	-	-	+	-
BA05	Sapajus xanthosternos	+	-	-	-	-
BA06	Sapajus xanthosternos	-	-	-	-	+
BA07	Sapajus xanthosternos	-	+	-	+	-
BA19	Sapajus xanthosternos	-	-	+	-	-
BA20	Sapajus xanthosternos	-	-	+	-	-
BA36	Sapajus flavius	-	-	+	-	-
BA38	Alouatta caraya	-	-	+	-	-
Zoo Sorocaba						
SP08	Alouatta guariba	+	-	-	-	-
SP09	Alouatta guariba	-	-	-	+	-
SP14	Ateles marginatus	-	-	+	-	-
SP17	Ateles marginatus	-	-	-	-	+
SP19	Brachyteles arachnoides	-	-	-	-	+
SP29	Ateles marginatus	-	-	+	-	-
SP36	Aotus trivirgatus	-	-	+	-	-
SP44	Chiropotes utahickae	-	-	+	-	-
Total		2	7	8	4	3

Legenda: +: amostra amplificada; -: amostra não amplificada L5.8SR/LITSV e 561F/561R foram os *primers* utilizados para pesquisa de família Trypanosomatidae; FME/RME para o gênero *Leishmania* spp.; LCS1/LCS3 para *Leishmania infantum* e B1/B2 para *Leishmania braziliensis*.

A Figura 14 esquematiza as 22 amostras de células conjuntivais dos PNH que amplificaram fragmentos de DNA com o uso de todos os *primers* empregados na pesquisa. Das 22 amostras, duas amplificaram para a região ITS-2 de tripanosomatídeos, sete para região V7 e V8 da mesma família, oito para a região

intergênica do gene do mini-exon do RNA de *Leishmania* spp., quatro para o gene 18S rRNA de *L. infantum* e três amplificaram para o kDNA de *L. braziliensis*.

Das sete amostras amplificadas para a região V7-V8, duas delas também amplificou com o *primer* LCS-1/LCS-3 para *L. infantum* (PA04 – *Ateles marginatus* e BA07 - *Sapajus xanthosternos*). Todas as outras amplificaram apenas uma vez e com um único *primer*.

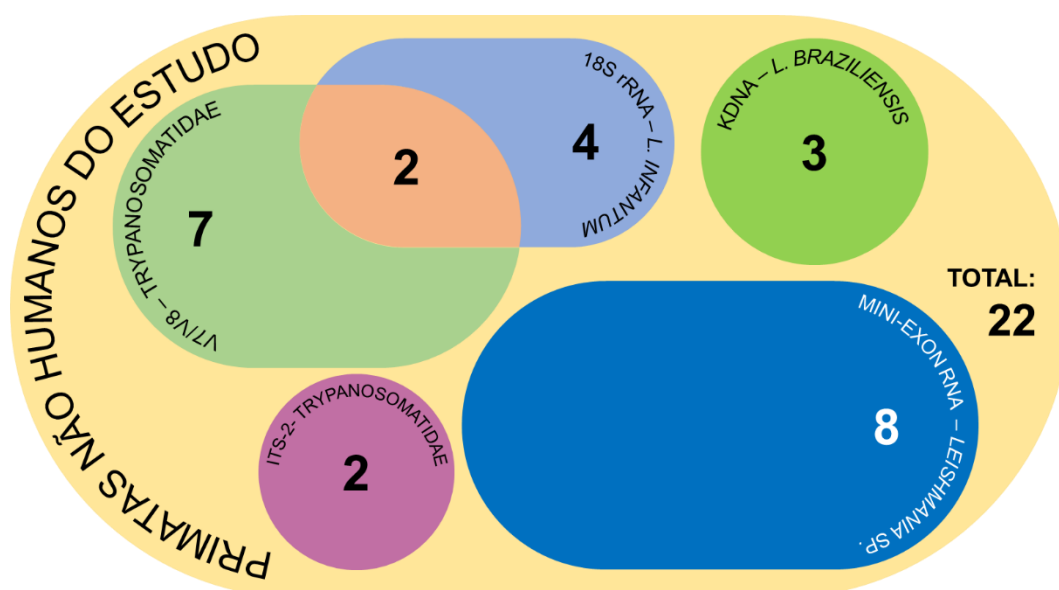


Figura 14: Esquema das 22 amostras de células conjuntivais dos PNH que amplificaram fragmentos de DNA com o uso de todos os *primers* empregados na pesquisa.

Dos 22 PNH que amplificaram utilizando-se como amostra células da conjuntiva inferior, um deles também apresentou lâmina de extensão sanguínea positiva (PA03 - *Ateles marginatus*), além de outro ter sido reagente no teste sorológico de RIFI (BA07 - *Sapajus xanthosternos*).

Na Tabela 29 é possível observar a porcentagem de animais positivos para cada local, revelando mais uma vez que o Centro Nacional de Primatas no Pará foi o que apresentou maior porcentagem de animais positivos ao teste molecular das células conjuntivais (60%).

Tabela 29: Porcentagem de positividade na cPCR das amostras de células conjuntivais (suabes) de cada local estudado.

Local	Nº total de suabes	Nº de animais positivos na cPCR	Porcentagem de positividade
CENP	10	06	60,0
Zoo Salvador	46	08	17,39
Zoo Sorocaba	45	08	17,77
Zoo Curitiba	12	0	0
Zoo Brasília	05	0	0
Total	118	22	18,64

4.4.4.1 Comparação dos resultados moleculares das amostras de sangue e células conjuntivais

De todos os 39 (39/189: 20,63%) primatas que apresentaram amplificação de DNA do parasito, 22 (22/149: 14,76%) foram positivos no sangue e 22 (22/118: 18,64%) no suabe conjuntival, sendo que cinco (05/39: 12,82%) animais positivaram em ambos os tipos de materiais biológicos (sangue e suabe) (Tabela 30).

Tabela 30: Todos os primatas positivos nesta pesquisa ao teste molecular de cPCR das amostras de sangue e células conjuntivais (suabes). Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal amplificou com ambos os materiais biológicos (sangue e suabe).

Local/Amostra	Nome científico	Positivas-Sangue	Positivas – Suabe
CENP			
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA08	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
Zoo Salvador			
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA05	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA06	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-

BA19	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA20	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA36	<i>Sapajus flavius</i>	-	+
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	+	-
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	-	+
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	+	-
Zoo Sorocaba			
SP01	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP10	<i>Ateles chamek</i>	+	-
SP08	<i>Alouatta guariba</i>	-	+
SP09	<i>Alouatta guariba</i>	-	+
SP14	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
SP17	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
SP19	<i>Brachyteles arachnoides</i>	-	+
SP29	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
SP36	<i>Aotus trivirgatus</i>	-	+
SP44	<i>Chiropotes utahickae</i>	-	+
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	+	
Zoo Brasília			
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	+	-
DF45	Não informado	+	-
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
Total	39	22	22

Os resultados obtidos com o uso dos *primers* que amplificam a região ITS-2 de tripanosomatídeos, mostraram que nenhuma amostra de sangue amplificou, enquanto que dois (2/118: 1,69%) PNH foram positivos (BA05 - *Sapajus xanthosternos* e SP08 - *Alouatta guariba*) a partir de suabes conjuntivais.

Com a utilização de iniciadores que amplificam a região V7-V8 da mesma família, 16 animais foram positivos (16/189: 8,46%), 14 animais amplificaram com o sangue (14/149: 9,39%) e sete com as células conjuntivais (07/118: 5,93%) (sendo

que cinco animais (05/16: 31,25%) foram positivos tanto no sangue como nas células da conjuntiva) (Tabela 31 e Figura 15).

Tabela 31: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR para Família Trypanosomatidae. Partes destacadas indicam quando o mesmo animal apresentou amostras de sangue e suabe positivas.

Amostras de sangue e suabe conjuntival amplificadas com os <i>primers</i> SSU561F/SSU561R			
Local/Amostra	Nome científico	Positivas - Sangue	Positivas – Suabes
CENP			
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA08	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
Zoo Salvador			
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	+	-
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	+	-
Zoo Brasília			
DF45	Sem identificação	+	-
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-

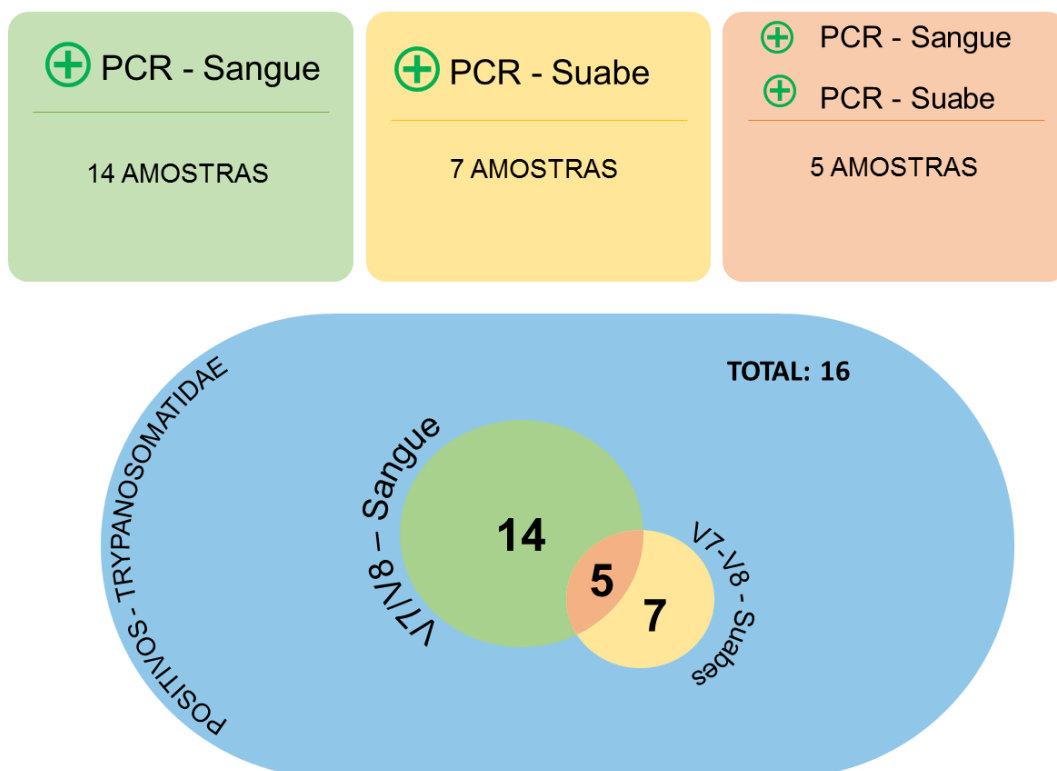


Figura 15: Comparação dos resultados positivos das amostras de sangue e células conjuntivais na PCR para pesquisa de Família Trypanosomatidae.

Para a amplificação do gênero *Leishmania* spp. com os *primers* FME/RME somente as células da conjuntiva foram positivas (oito PNH (08/118: 6,77%)), enquanto nenhuma amostra de sangue amplificou.

Para pesquisa específica de *L. infantum*, seis animais amplificaram (06/189: 3,12%), sendo três PNH positivos com amostras de sangue (03/149: 2,01) e quatro com suabes da conjuntiva inferior (04/118: 3,38%), sendo que apenas um animal foi positivo tanto no sangue como no suabe (01/06: 16,66%), como mostra a Tabela 32.

Tabela 32: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR para *L. infantum*. Partes destacadas indicam quando o mesmo animal apresentou amostras de sangue e suabe positivas.

Amostras de sangue e suabe conjuntival amplificadas com os <i>primers</i> LCS1/LCS3			
Local/Amostras	Nome científico	Positivas - Sangue	Positivas – Suabe
CENP			
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
Zoo Salvador			
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+
Zoo Sorocaba			
SP09	<i>Alouatta guariba</i>	-	+
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	+	-
Zoo Brasília			
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	+	-

Os resultados positivos para *L. braziliensis* apontaram para nove animais positivos (09/189: 4,76%), seis primatas a partir do sangue (06/149: 4,02%) e três com suabe conjuntival (03/118: 2,54%), sendo que nenhum deles foi positivo tanto no sangue como no suabe (01/09: 11,1%) (Tabela 33).

Tabela 33: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas na cPCR para *L. braziliensis*.

Amostras de sangue e suabe amplificadas com os <i>primers</i> B1/B2			
Local/Amostra	Nome científico	Positivos - Sangue	Positivo – Suabe
Zoo Salvador			
BA06	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
Zoo Sorocaba			
SP01	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP10	<i>Ateles chamek</i>	+	-
SP17	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
SP19	<i>Brachyteles arachnoides</i>	-	+
Zoo Brasília			
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	+	-

Na busca de *L. amazonensis* com o uso do *primer* A1/A2 nenhuma amostra (sangue e células conjuntivais) foi positiva.

4.4.4.2 Comparação dos resultados: parasitológico, sorológico e molecular (sangue e suabe)

A Tabela 34 mostra os resultados obtidos com os exames parasitológico de esfregaço por extensão; sorológico pela técnica de RIFI e molecular pela técnica de cPCR das amostras de sangue e células conjuntivais (suabes). É possível visualizar todos os animais positivos em apenas uma das técnicas e/ou em mais de uma e os locais de onde os PNH são procedentes.

Tabela 34: Animais positivos em todas as técnicas utilizadas neste estudo. Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal foi positivo em mais de uma técnica utilizada.

Local/Amostra	Nome científico	Esfregaço	cPCR - suabes	cPCR - sangue	RIFI
CENP					
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	+	NR
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	+	+	NR
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	+	NR
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	+	NR
PA08	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	-	NR
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	-	NR
Zoo Salvador					
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	-	NR
BA05	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	-	NR
BA06	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	-	NR
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	+	R
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	-	+	NR
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-	+	NR
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	-	+	NR
BA19	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	-	NR
BA20	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+	-	NR
BA36	<i>Sapajus flavius</i>	-	+	-	NR
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	-	-	+	NR
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	-	+	-	NR
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+	R
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	-	-	+	NR
BA52	<i>Ateles marginatus</i>	-	-	-	R
BA54	<i>Sapajus flavius</i>	-	-	-	R
Zoo Sorocaba					
SP01	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+	NR
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+	NR
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+	NR

SP04	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+	NR
SP05	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	-	R
SP08	<i>Alouatta guariba</i>	-	+	-	NR
SP09	<i>Alouatta guariba</i>	-	+	-	NR
SP10	<i>Ateles chamek</i>	-	-	+	NR
SP14	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	-	NR
SP17	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	-	NR
SP19	<i>Brachyteles arachnoides</i>	-	+	-	NR
SP28	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	-	NR
SP29	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	-	NR
SP36	<i>Aotus trivirgatus</i>	-	+	-	NR
SP42	<i>Callithrix jacchus</i>	+	-	-	NR
SP44	<i>Chiropotes utahickae</i>	-	+	-	NR
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	-	-	+	NR
Zoo Brasília					
DF18	<i>Alouatta belzebul</i>	-	-	-	R
DF34	<i>Sapajus libidinosus</i>	-	-	-	R
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	-	-	+	NR
DF39	<i>Saguinus niger</i>	-	-	-	R
DF45	Não informado	-	-	+	NR
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	-	-	+	NR
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	-	-	+	NR
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+	NR
Total		4	22	22	8

Legenda: +: animal positivo; -: animal negativo; R: animal reagente; NR: animal não reagente.

O total de animais positivos pelas técnicas de extensão sanguínea; RIFI e cPCR de sangue e células conjuntivais (somatória de animais positivos em todas as técnicas mencionadas) foi de 47 (24,86%). Destes, seis animais foram provenientes do CENP; 16 do Zoológico de Salvador; 17 de Sorocaba e oito de Brasília. A Tabela 35 mostra a porcentagem de positividade em todos os locais amostrados com relação a todas as técnicas descritas anteriormente, revelando que Centro Nacional de Primatas no Pará foi o que apresentou maior porcentagem de animais positivos (60%).

Dos 47 PNH, quatro apresentaram lâminas positivas; oito mostraram-se reagentes à RIFI; 22 tiveram amostras de sangue positivas no teste molecular e 22 com amostras de células conjuntivais amplificadas.

Dos quatro animais positivos no teste parasitológico, um deles (PA03 - *Ateles marginatus*) também foi positivo no teste molecular de cPCR (no sangue e no suabe) e outro (BA14 - *Sapajus xanthosternos*) apresentou amplificação do DNA do parasito no sangue.

Dos oito animais sorologicamente reagentes, um deles (BA07 - *Sapajus xanthosternos*) também foi positivo na cPCR tanto no sangue como no suabe conjuntival e um PNH (BA39 - *Alouatta caraya*) que além de reagente à RIFI, teve amostra de sangue amplificada.

Dos 22 animais positivos na cPCR com as amostras de sangue, cinco deles também amplificaram DNA do protozoário no teste molecular com amostras de células conjuntivais (quatro do CENP e um do Zoológico de Salvador).

Tabela 35: Porcentagem de positividade dos 189 PNH amostrados com as técnicas parasitológica; sorológica e molecular (sangue e células conjuntivais) em cada local estudado.

Local	Nº total de animais	Nº de animais positivos em pelo menos uma das técnicas	Porcentagem de positividade
CENP	10	06	60
Zoo Salvador	54	16	29,62
Zoo Sorocaba	48	17	35,41
Zoo Curitiba	18	0	0
Zoo Brasília	59	8	30,50
Total	189	47	24,86

4.4.5 Caracterização molecular com o uso de alvos gênicos direcionado ao Citocromo de *Leishmania* spp.

4.4.5.1 Caracterização molecular das amostras de sangue positivas na cPCR

Em todas as 22 amostras de sangue que apresentaram amplificação de DNA (Tabela 19), foi realizada a caracterização molecular utilizando-se *primers* direcionados aos genes mitocondriais baseados no citocromo B (cytB); *primers* para as sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA) e *primers* direcionados às sequências codificadoras direcionado ao DNA nuclear de citocromo C (cytC).

Os *primers* direcionados ao citocromo B de *Leishmania* spp. (CytBF1/CytBR2) amplificaram cinco amostras (PA02; PA03; PA04; BA07 e DF45) com fragmento de amplificação de aproximadamente 380pb (5/22; 22,72%) (Tabela 36).

Tabela 36: Amostras de sangue amplificadas com o uso dos *primers* CytBF1 e CytBR2.

Local/Amostra	Nome científico	Nome popular
CENP		
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
Zoo Salvador		
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
Zoo Brasília		
DF45	Sem identificação	Sem identificação

Com o uso de *primers* direcionados ao citocromo C de *Leishmania* spp. (CytCF3/CytCR2), uma amostra (DF36) do PNH da espécie *Aotus nigriceps* (macaco-da-noite) do zoológico de Brasília amplificou com fragmento de 230pb (1/22; 4,54%).

Os *primers* CytOxIIF1/CytOxIIR2 das sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA), amplificaram 18 amostras (18/22; 81,80%), sendo quatro PNH do Centro Nacional de Primatas; sete PNH do zoológico de Salvador; quatro do zoológico de Sorocaba e três PNH do zoológico de Brasília (Tabela 37).

Tabela 37: Amostras de sangue amplificadas com o uso dos *primers* CytOxIIF1/CytOxIIR2.

Local/Amostra	Nome científico	Nome popular
CENP		
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
Zoo Salvador		
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo

BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	Macaco-prego-dourado
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	Macaco-aranha-de-cara-vermelha
Zoo Sorocaba		
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto
SP10	<i>Ateles chamek</i>	Macaco-aranha-peruano
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	Zogue-zogue
Zoo Brasília		
DF45	Sem identificação	Sem identificação
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	Sauim-de-coleira
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto

A Tabela 38 mostra todos os PNH (19 amostras), por localidade, amplificados com o uso de *primers* para caracterização de *Leishmania* spp. (19/22; 86,36%). As únicas três amostras que não amplificaram com nenhum dos *primers* para caracterização molecular foram: dois PNH do zoo Sorocaba (SP01 e SP03 – ambos da espécie *Alouatta caraya*) e um do zoo de Brasília (DF53 – *Saguinus bicolor*).

A Figura 16 esquematiza todas as amostras que amplificaram com os três pares de iniciadores para caracterização molecular, revelando um total de cinco amostras amplificadas com o CytB, uma com o CytC e 18 com o CytOXII, sendo que todas as cinco amostras amplificadas com o CytB também amplificaram como o CytOXII.

Tabela 38: Amostras de sangue amplificadas com *primers* direcionados aos citocromos de *Leishmania* spp.

Local/Amostra	Nome científico	Primers de citocromo		
		CytBF1/ CytBR2	CytCF3/ CytCR2	CytOxIIIF1/ CytOxIIR2
CENP				
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	+
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	+
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	+	-	+
PA05	<i>Ateles marginatus</i>			+
Zoológico Salvador				
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-	+

BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	-	+
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	-	+
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	-	+
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	-	-	+
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	-	-	+
Zoológico Sorocaba				
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
SP10	<i>Ateles chamek</i>	-	-	+
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	-	-	+
Zoológico Brasília				
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	-	+	-
DF45	Sem identificação	+	-	+
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	-	-	+
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
Total		5	1	18

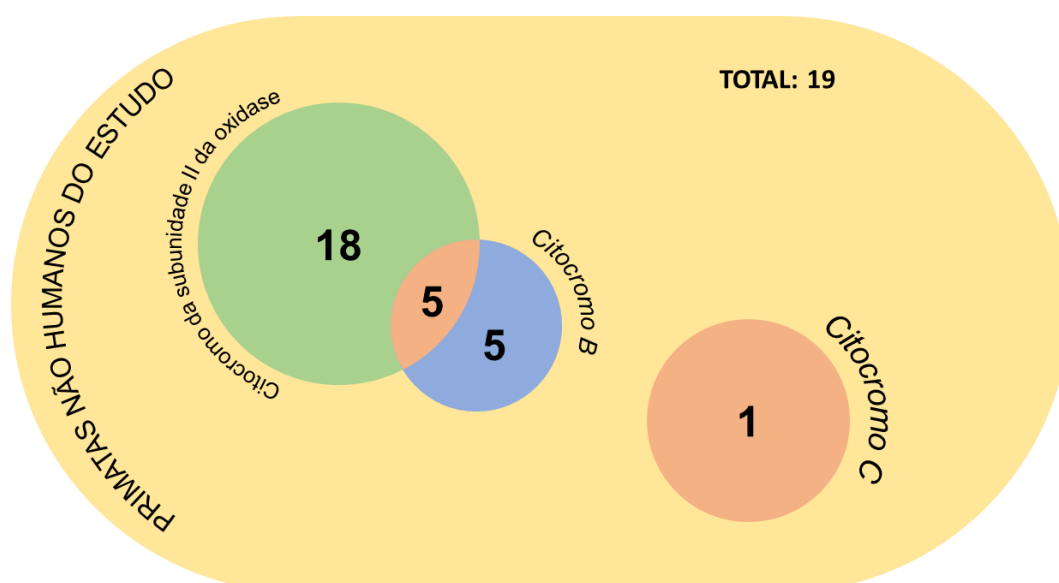


Figura 16: Esquemas de todas as amostras de sangue dos PNH que amplificaram com os *primers* direcionados aos citocromos de *Leishmania* spp.. Fonte: arquivo pessoal.

4.4.5.2 Caracterização molecular das amostras de células conjuntivas (suabes) positivas na cPCR

Em todas as 22 amostras de células conjuntivas que apresentaram amplificação de DNA (Tabela 28), foi realizada a caracterização molecular utilizando-

se os mesmos *primers* descritos no item “4.4.5.1 Caracterização molecular das amostras de sangue positivas na cPCR” desta pesquisa (citocromo B (cytB); citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) e citocromo C (cytC)).

Com o uso dos *primers* direcionados ao citocromo B de *Leishmania* spp. (CytBF1/CytBR2), uma amostra amplificou referente ao PNH do zoológico de Salvador (BA02 - *Sapajus xanthosternos*) com fragmento de amplificação de aproximadamente 380pb (1/22; 4,54).

Com o uso de *primers* direcionados ao citocromo C de *Leishmania* spp. (CytCF3/CytCR2), duas amostras amplificaram com fragmento de 230pb, sendo um PNH do zoológico de Salvador e um de Sorocaba (2/22; 9,09%) (Tabela 39).

Tabela 39: Amostras de células conjuntivais amplificadas com o uso dos *primers* CytCF3/CytCR2.

Local/Amostra	Nome científico	Nome popular
Zoo Salvador		
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
Zoo Sorocaba		
SP29	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-testa-branca

Com o uso dos *primers* CytOxIIF1/CytOxIIR2 das sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA), cinco amostras amplificaram (5/22; 22,72%), sendo dois PNH do Centro Nacional de Primatas e três PNH do zoológico de Salvador (Tabela 40).

Tabela 40: Amostras de células conjuntivais amplificadas com o uso dos *primers* CytOxIIF1/CytOxIIR2.

Local/Amostra	Nome científico	Nome popular
CENP		
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-cara-branca
Zoo Salvador		
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto

A Tabela 41 mostra todos os animais amplificados (seis amostras), por localidade, com o uso dos três pares de *primers* para caracterização de *Leishmania* spp. (6/22; 27,27%).

Tabela 41: Amostras de células conjuntivais amplificadas com *primers* direcionados aos citocromos de *Leishmania* spp. Parte destacada indica quando a amostra de um mesmo animal amplificou com mais de um *primer* empregado.

Local/Amostra	Nome científico	Primers de citocromo		
		CytBF1/ CytBR2	CytCF3/ CytCR2	CytOxII F1/ CytOxII R2
CENP				
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	-	-	+
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	-	-	+
Zoológico Salvador				
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+	+
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	-	+
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	-	-	+
Zoológico Sorocaba				
SP29	<i>Ateles marginatus</i>	-	+	-
Total		01	02	05

No total, seis amostras de células conjuntivais amplificaram citocromos de *Leishmania* spp., sendo uma amostra amplificada com o CytB, duas com o CytC e cinco com o CytOXII. A amostra do PNH do zoológico de Salvador BA02 - *Sapajus xanthosternos* foi a única que amplificou com todos os iniciadores utilizados para caracterização molecular.

4.4.5.2 Comparação dos resultados da caracterização molecular das amostras de sangue e células conjuntivais

Com o uso dos *primers* direcionados ao citocromo B de *Leishmania* spp., cinco amostras no sangue amplificaram (PA02; PA03; PA04 - *Ateles marginatus*; BA07 - *Sapajus xanthosternos* e DF45 - Sem identificação) e uma no suabe (BA02 - *Sapajus xanthosternos*), sendo que nenhum animal foi positivo tanto no sangue como no suabe.

Já com o uso de *primers* direcionados ao citocromo C de *Leishmania* spp., uma amostra amplificou no sangue (DF36 - *Aotus nigriceps*) e duas nas células da conjuntiva (BA02 - *Sapajus xanthosternos* e SP29 - *Ateles marginatus*), assim como no citocromo B, nenhuma amostra amplificou tanto no sangue como no suabe.

Com os *primers* CytOxIIIF1/CytOxIIR2 das sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA), 18 amostras de sangue e cinco de células conjuntivais amplificaram, sendo que dois animais amplificaram tanto no sangue como no suabe conjuntival como mostra a Tabela 42.

Tabela 42: Amostras de sangue e células conjuntivais positivas para citocromo da subunidade II da oxidase (coxII). Partes destacadas indicam quando o animal apresentou tanto sangue como células conjuntivais positivos.

Local/Amostra	Nome científico	Positivas - Sangue	Positivas - Suabe
CENP			
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	+	-
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	-
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	+	-
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
Zoo Salvador			
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	+	-
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	-	+
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	+	-
Zoo Sorocaba			
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP10	<i>Ateles chamek</i>	+	-
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	+	-
Zoo Brasília			
DF45	Sem identificação	+	-
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	+	-

4.4.6 Sequenciamento - Método de Sanger

Para o sequenciamento genético, a escolha do *primer* baseou-se no maior número de amostras amplificadas. Assim, entre os três pares de iniciadores utilizados para a caracterização molecular de *Leishmania* spp., o *primer* que amplifica o gene *coxII* foi o que apresentou maior número de animais positivos, portanto, foi o iniciador de escolha.

O total de amostras amplificadas com o CytOxII foi de 21 animais, sendo 18 PNH amplificados no sangue e cinco com amostras de suabes conjuntivais. Destes cinco, dois PNH tiveram amostras de sangue também positivas, enquanto as outras três foram positivas apenas no suabe como mostra a Tabela 43.

Dos 21 animais, em 18 deles foi realizado o sequenciamento genético. As outras três amostras referem-se àquelas que também amplificaram utilizando-se *primers* específicos para *L. braziliensis* na cPCR com confirmação da espécie pelo HRM (consenso entre cPCR e HRM), portanto, não necessitaram de sequenciamento genético para confirmação da espécie (marcados com asterisco na Tabela 43). Das 18 amostras sequenciadas, 15 delas foram a partir do sangue e três pelo suabe conjuntival. (Figura 17).

Tabela 43: Todas as amostras (sangue e células conjuntivais) amplificadas com o uso do *primer* CytOxII F1/CytOxII R2. Partes destacadas na tabela indicam quando o mesmo animal amplificou tanto no sangue como no suabe.

Local/Amostra	Nome científico	Primer CytOxII (Sangue)	Primer CytOxII (Suabe)
CENP			
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	+	-
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	+	-
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	+	-
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	+	+
PA09	<i>Ateles marginatus</i>	-	+
Zoo Salvador			
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	-	+
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	+
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	+	-

BA37	<i>Sapajus flavius</i>	+	-
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	-	+
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	+	-
Zoo Sorocaba			
SP02*	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP04*	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
SP10*	<i>Ateles chamek</i>	+	-
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	+	-
Zoo Brasília			
DF45	Sem identificação	+	-
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	+	-
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	+	-
Total		18	05

*Amostras positivas para *L. braziliensis* na cPCR com confirmação de espécie pelo HRM, portanto não foi feito sequenciamento genético. As amostras PA05 e BA07 que amplificaram no sangue e no suabe, foram enviadas para o sequenciamento genético a partir do sangue.

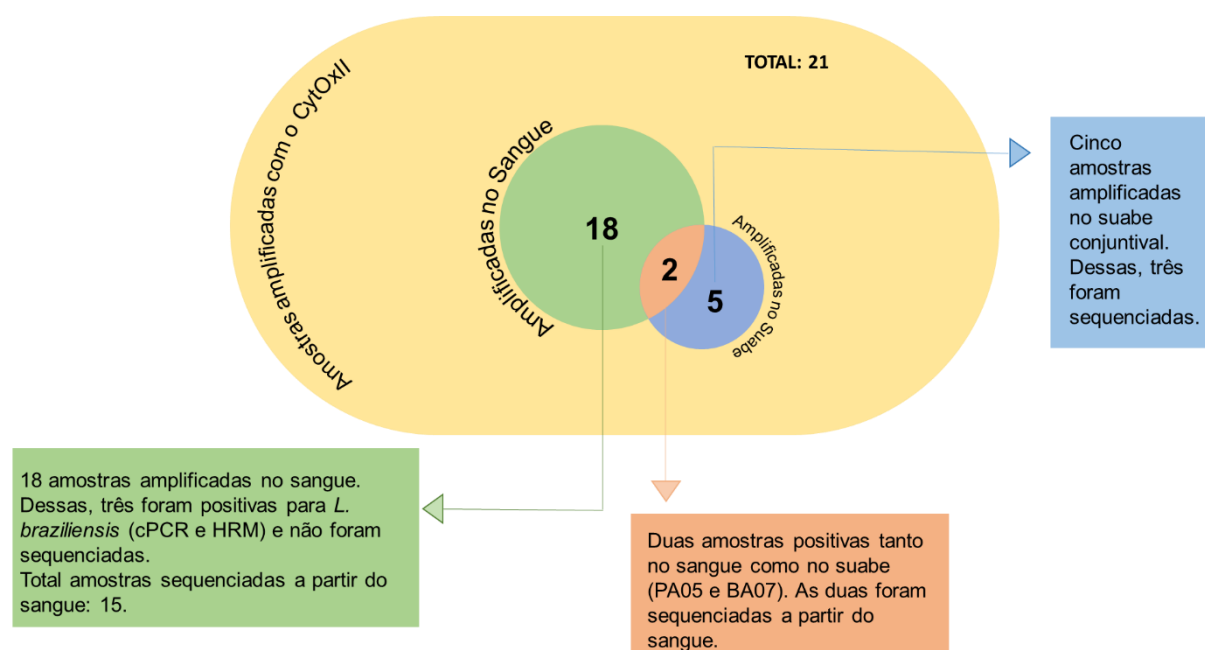


Figura 17: Todas as 21 amostras amplificadas com o *primer* direcionado às sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA). Dessas, 18 amplificaram a partir do sangue e cinco pelo suabe da conjuntiva inferior. Duas amostras amplificaram tanto pelo sangue como pelo suabe. No total, 18 amostras foram sequenciadas, 15 a partir do sangue e três pelo suabe das células da conjuntiva. Fonte: arquivo pessoal.

Das 18 amostras sequenciadas, em 13 delas foi confirmado a identidade da espécie do parasito como *Leishmania infantum* (12 a partir do sangue e uma pelo suabe conjuntival), as cinco demais amostras não apresentaram êxito nos resultados

do sequenciamento genético, retornando como “No significant similarity found”. (Tabela 44).

Tabela 44: Amostras de sangue sequenciadas pelo método de *Sanger* com os *primers* CytOxIIIF1/CytOxIIR2 que amplificam sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) (maxicircle-kDNA) de *Leishmania* spp. com identidade dos produtos confirmada como *Leishmania infantum*.

Amostra	Espécie	BLASTn ¹	Nº de acesso
Zoo Salvador			
BA02*	<i>Sapajus xanthosternos</i>	99,48% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 99%; E value 0.0.	LR697137.1
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	99,13% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 99%; E value 0.0.	LR697137.1
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	99,12% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 94%; E value 0.0.	LR697137.1
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	99,82% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 92%; E value 0.0.	LR697137.1
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	99,30% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 97%; E value 0.0.	LR697137.1
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	98,96% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 95%; E value 0.0.	LR697137.1
BA38*	<i>Alouatta caraya</i>	No significant similarity found.	
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	99,30% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 98%; E value 0.0.	LR697137.1
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	94,64% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 100%; E value 0.0.	LR697137.1
Zoo Sorocaba			
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	No significant similarity found.	
Zoo Brasília			
DF45	Sem Identificação	98,29% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 99%; E value 0.0.	LR697137.1
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	No significant similarity found.	

DF56	<i>Alouatta caraya</i>	94,13% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 91%; E value 3e-174**.	LR697137.1
CENP			
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	95.45% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 94%; E value 0.0.	LR697137.1
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	98.77% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 96%; E value 0.0.	KU680822.1
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	98.42% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 96%; E value 0.0.	KU680822.1
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	No significant similarity found.	
PA09*	<i>Ateles marginatus</i>	No significant similarity found.	

¹Resultado obtido no BLASTn (*nucleotide basic local alignment search tool*); *Amostra sequenciada a partir de suabe conjuntival; **Sequência apresentou perfil de contaminação mesmo na repetição do sequenciamento.

As amostras que amplificaram com *primers* gerais (ITS-2; V7/V8 e FME/RME) e não amplificaram com o CytOxII, não foi possível realizar o sequenciamento genético, uma vez que não se obteve bons resultados durante o sequenciamento por tratarem-se de iniciadores muito amplos.

4.4.7 Inferências filogenéticas

As inferências filogenéticas foram realizadas com todas as 13 amostras que tiveram resultados satisfatório no sequenciamento genético pelo método de *Sanger* com o uso dos *primers* CytOxII F1/CytOxII R2 (ítem 4.4.6 Sequenciamento - Método de *Sanger*).

Todas as sequências obtidas e as inferências evolutivas podem ser visualizadas na Figura 18. Para melhor visualização, foram inseridos símbolos com cores diferentes (canto inferior esquerdo) atribuídos para cada estado pesquisado e para o tipo de material biológico (sangue ou suabe conjuntival).

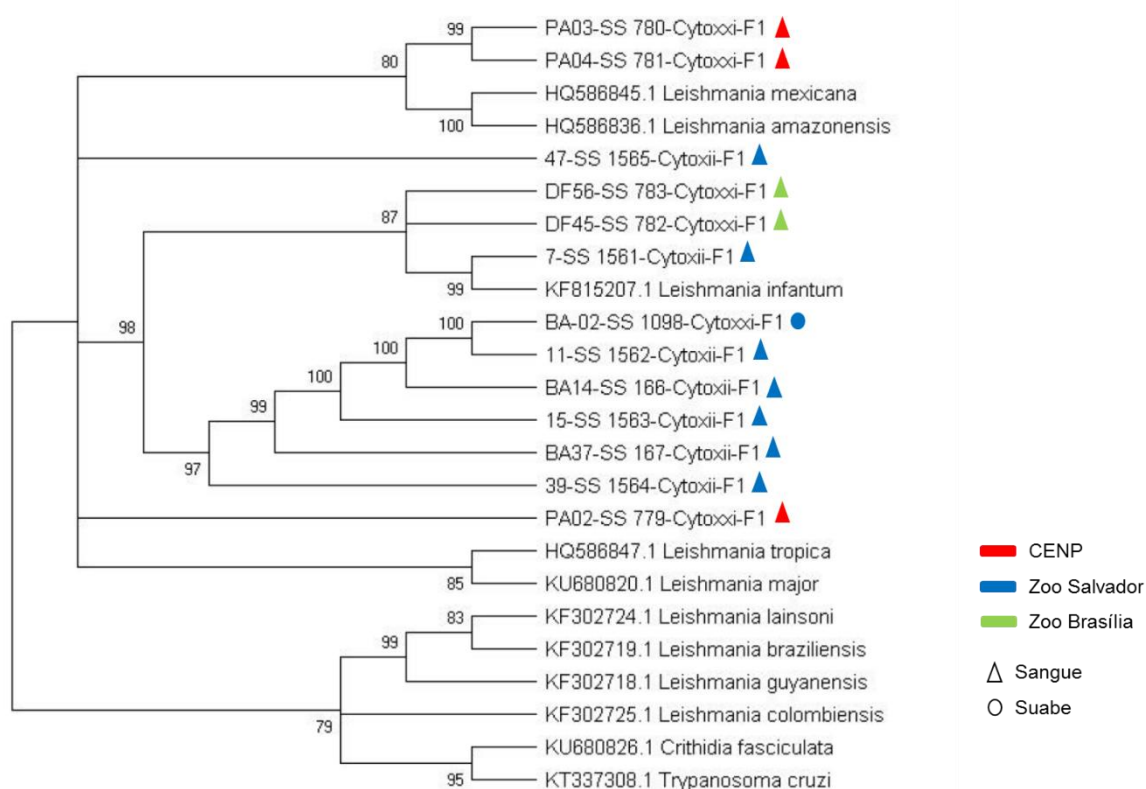


Figura 18: *Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method*. A história evolutiva foi inferida usando o método *Maximum Likelihood* e *Tamura 3-parameter model* (Tamura, 1992). A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada ao lado dos ramos. A (s) árvore (s) inicial (is) para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando o método *Maximum Parsimony*. Esta análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas (*complete deletion option*). As análises evolutivas foram realizadas pelo Mega X (Kumar et al., 2018).

4.4.8 Discriminação de espécies de *Leishmania* por Análises de Dissociação de DNA em Alta Resolução (HRM)

A técnica de HRM foi realizada para todas as 22 amostras de sangue positivas na cPCR a fim de discriminar as espécies de *Leishmania* spp. envolvidas na infecção.

Foram obtidos perfis de dissociação e valores de T_m (Temperatura de *melting*/dissociação) em duplicata de 16 amostras compatíveis com os valores exibidos para as cepas padrão de *Leishmania* (*L. infantum*; *L. braziliensis* e *L. amazonensis*). Não foi possível detectar DNA de *Leishmania* em seis amostras

utilizando essa metodologia (amostras DF53; PA02; PA03; PA05; SP47 e DF56) (Figura 19).

Na análise de todas as amostras, o *amplicon* 1 foi o que apresentou melhor performance e melhores resultados durante a corrida.

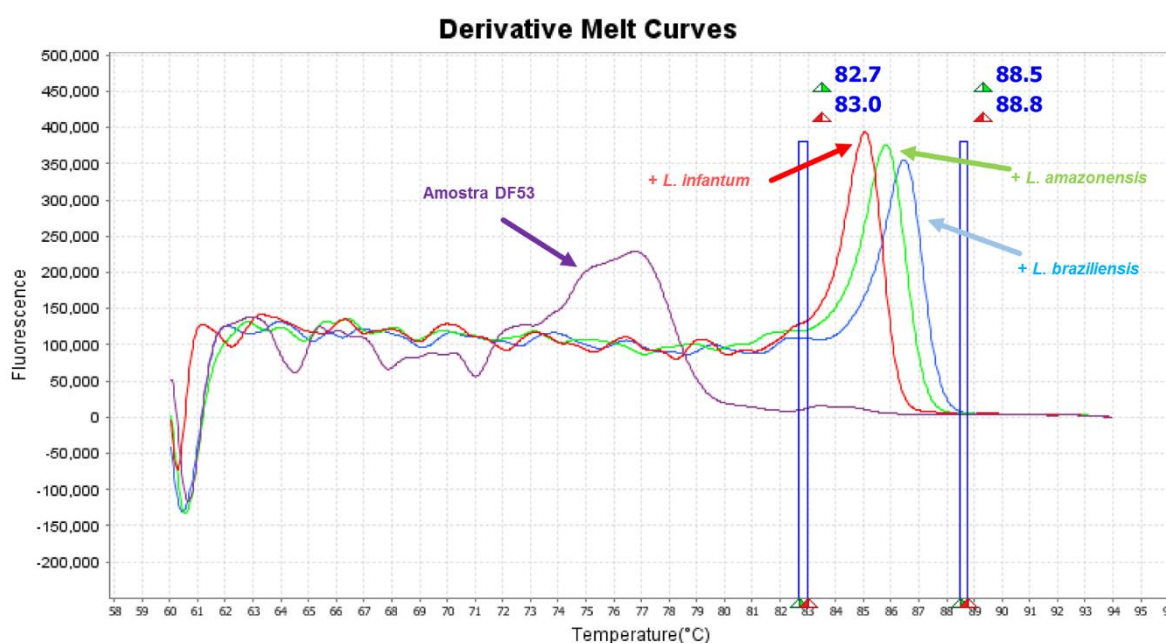


Figura 19: Amostra DF 53, primata do zoológico de Brasília da espécie *Saguinus bicolor* (Sauim-de-coleira); não foi possível detectar DNA de *Leishmania* nessa amostra utilizando essa metodologia. Fonte: arquivo pessoal.

O índice de *Silhouette Score* que mede a dispersão entre as curvas das espécies de *Leishmania* que deve apresentar valores entre 80 e 100, encontrou-se satisfatório para todas as amostras testadas (Tabela 45).

Tabela 45: Valores do índice de *Silhouette Score* de todas as amostras testadas na técnica de HRM.

Local/Amostra	Nome científico	<i>Silhouette Score</i>
CENP		
PA02	<i>Ateles marginatus</i>	93,90
PA03	<i>Ateles marginatus</i>	94,90
PA04	<i>Ateles marginatus</i>	97,20
PA05	<i>Ateles marginatus</i>	93,40
Zoo Salvador		
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	91,40
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	82,50
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	93,60
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	93,90
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	94,30

BA39	<i>Alouatta caraya</i>	94,00
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	95,50
Zoológico Sorocaba		93,70
SP01	<i>Alouatta caraya</i>	97,70
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	97,10
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	97,80
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	96,90
SP10	<i>Ateles chamek</i>	95,50
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	
Zoológico Brasília		
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	98,00
DF45	Não informado	98,70
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	100,00
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	97,40
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	93,30

As curvas de temperatura, com valores pré-melting e pós-melting dos controles positivos utilizados para fins de comparação (*L. infantum*; *L. amazonensis* e *L. braziliensis*) podem ser observadas na Figura 20.

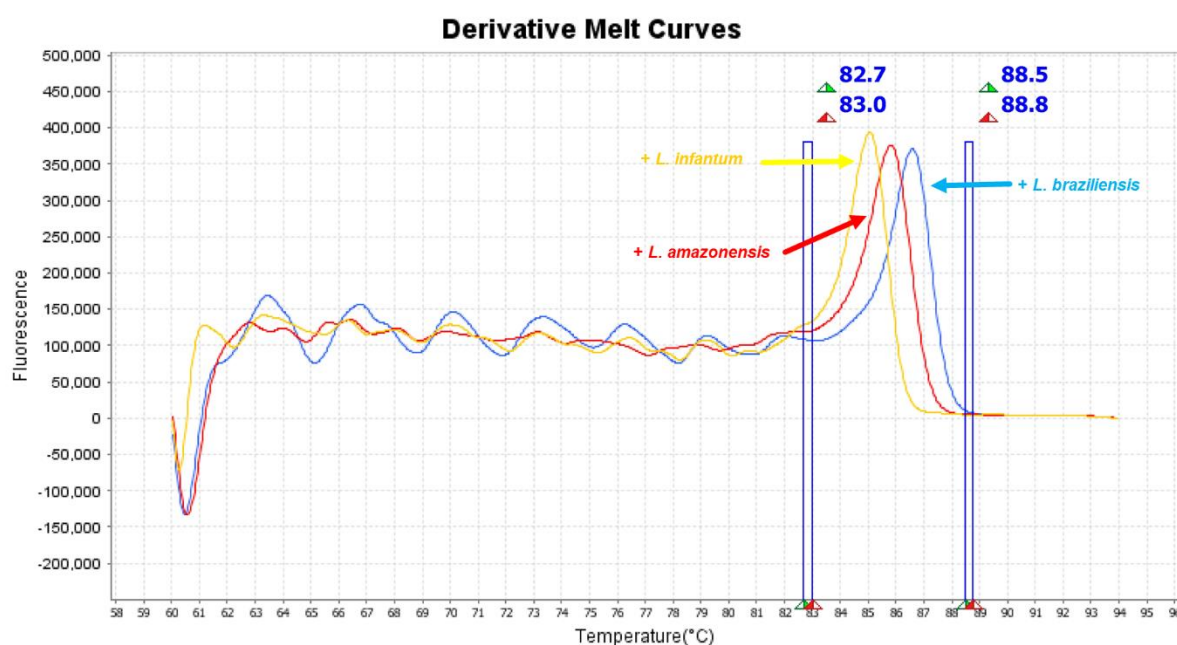


Figura 20: Curvas de dissociação apresentada entre as espécies de *Leishmania* utilizadas como controles positivos da reação. Em amarelo, curva de *melting* da espécie *L. infantum*; em vermelho de *L. amazonensis* e em azul curva de *L. braziliensis*. Os valores de temperatura pré-melting foram definidos entre 82,7°C e 83,0 °C e os valores pós-melting entre 88,5°C e 88,8°C (sempre respeitando até 3°C de diferença). Os valores de temperatura pré-melting e pós-melting foram ajustados a fim de se excluir a máximo os ruídos que poderiam resultar em interpretações equivocadas. A figura ilustra as curvas de dissociação referentes ao Amplicon 1. Fonte: arquivo pessoal.

A análise dos valores de CT (*Cycle Threshold*) que indica o limiar do ciclo em que as amostras e cepas controles começam a amplificar (início das curvas em exponencial), mostrou que as amostras apresentaram um CT “precoce”, com valores em torno de 12-14, enquanto o CT das cepas utilizadas como controle positivo da reação apresentou valores entre 18-20 (Figura 21).

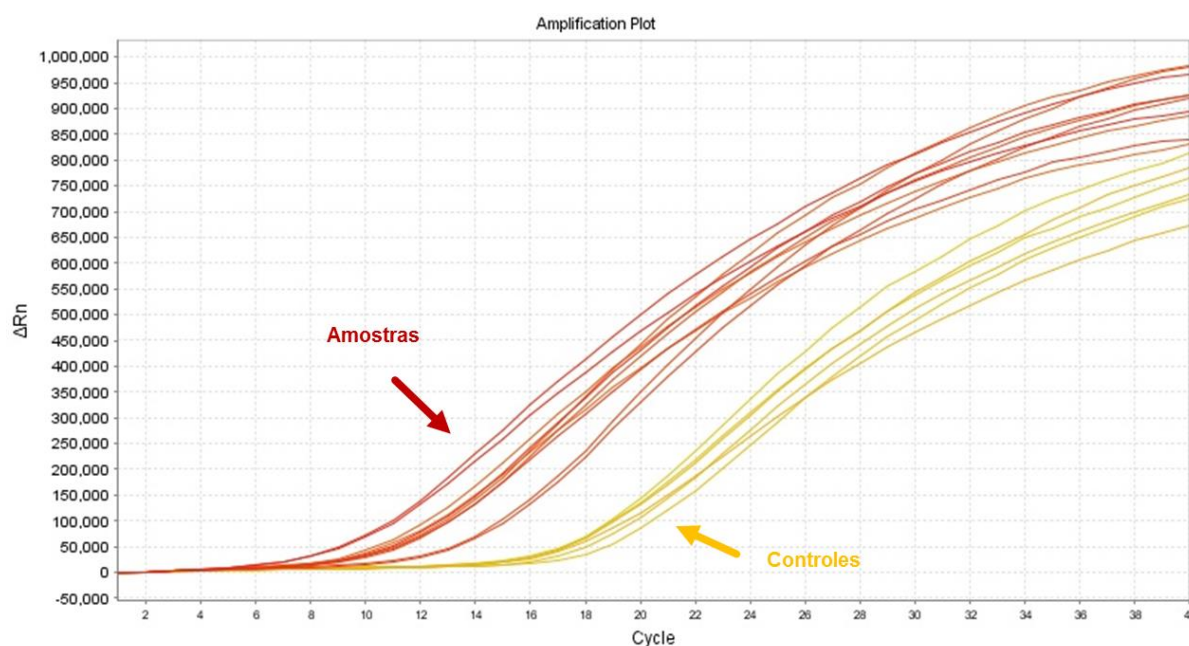


Figura 21: Valores de CT (*Cycle Threshold*) das amostras e dos controles no *amplicon* 1. Fonte: arquivo pessoal.

De acordo com a análise das T_m , utilizou-se o pico mais alto de temperatura (T_{m1}) e a maioria das amostras apresentaram T_m com valores iguais ou muito próximos aos de *L. infantum* (Figura 22, Figura 23 e Figura 24). Nas figuras, é possível visualizar a média e o desvio padrão entre as temperaturas exibidas pelas amostras (em duplicata). A Figura 25 mostra a média e o desvio padrão das cepas utilizadas como controles positivos da reação e as variações entre as T_m s. Embora as T_m s de *L. infantum* tenham demonstrado uma grande variação entre os experimentos, alguns cuidados foram tomados minimizando essa variação, como o uso de quantidades iguais dos controles, em massa de DNA. A Tabela 46 contém os dados referentes às médias e desvios padrões de todas as amostras nos três experimentos independentes.

Embora o sinal de fluorescência de algumas amostras apresentou valores mais altos quando comparados com os de *L. infantum*, os valores de T_m (das amostras e da cepa controle de *L. infantum*), como exemplo da amostra BA39

(*Alouatta caraya*), permaneceram iguais ou com valores muito próximos, e assim, foram identificadas como amostra positiva para cepa de *L. infantum* (Figura 26).

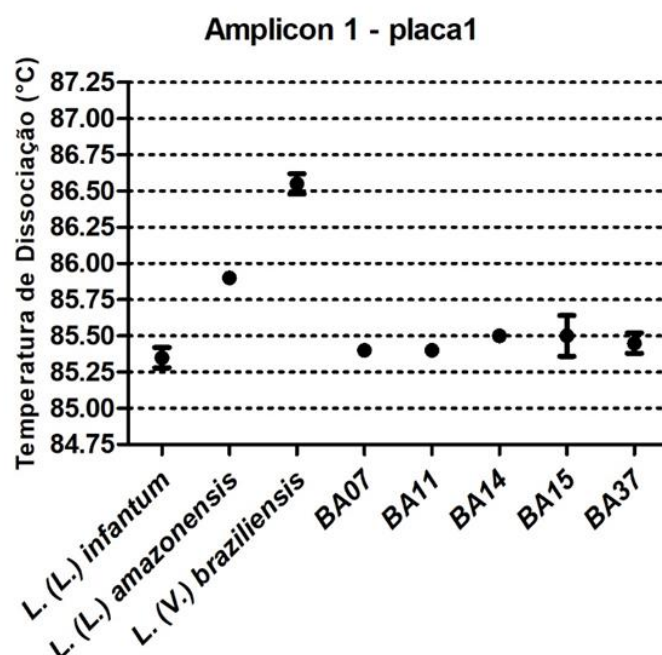


Figura 22: Gráfico de dispersão representativo dos valores individuais de Tm das cepas padrão de *Leishmania* e das amostras. Notar que as Tms das amostras ficaram próxima da Tm exibida pela cepa de *L. infantum*. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o software GraphPad PRISM v. 6.02.

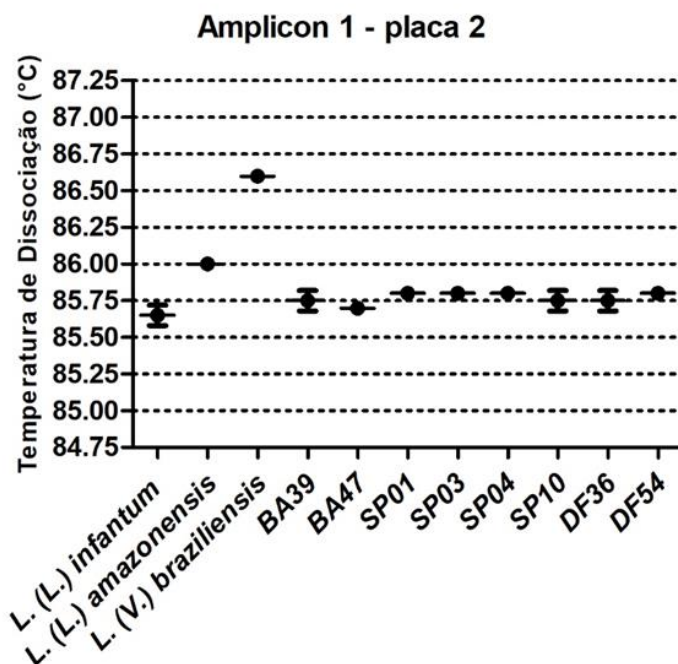


Figura 23: Gráfico de dispersão representativo dos valores individuais de Tm das cepas padrão de *Leishmania* e das amostras. Notar que as Tms das amostras ficaram próxima da Tm exibida pela cepa de *L. infantum*. Cada espécie foi testada em duplicata. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o software GraphPad PRISM v. 6.02.

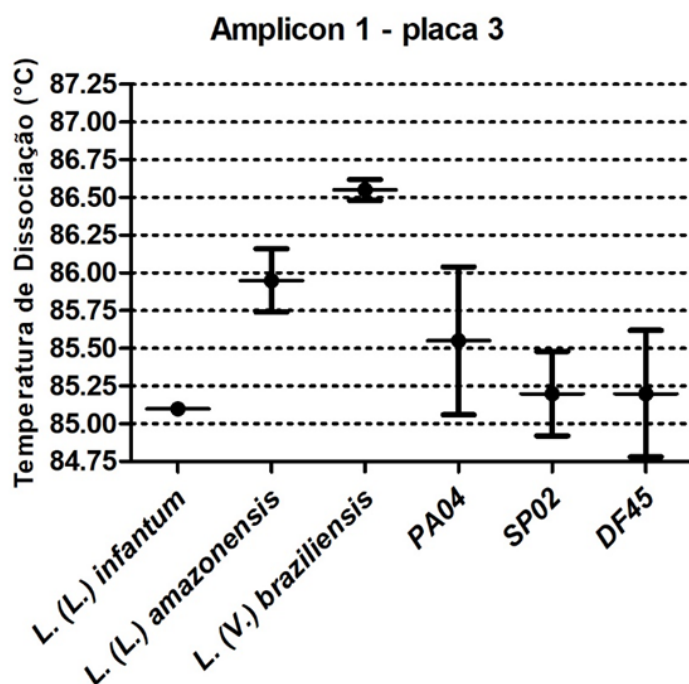


Figura 24: Gráfico de dispersão representativo dos valores individuais de Tm das cepas padrão de *Leishmania* e das amostras. Notar que as Tms das amostras ficaram próxima da Tm exibida pela cepa de *L. infantum*. Cada espécie foi testada em duplicata. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o software GraphPad PRISM v. 6.02.

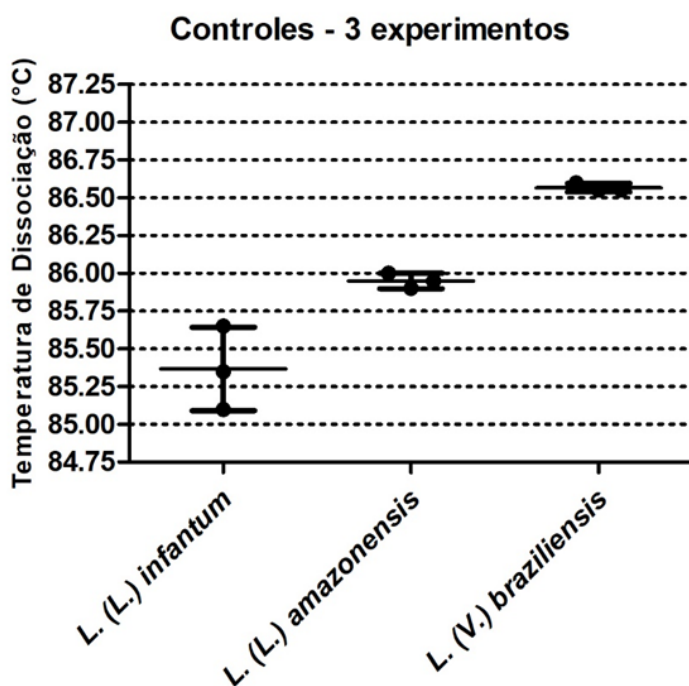


Figura 25: Gráfico de dispersão com média e desvio padrão dos valores de Tm. Cada espécie foi testada em duplicado em três experiências independentes utilizando 50 ng de DNA para cada espécie de referência. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o software GraphPad PRISM v. 6.02.

Tabela 46: Valores de média e desvio padrão das amostras nos três experimentos independentes. A média e o desvio padrão referem-se aos experimentos em duplicata das amostras. Fonte: colaboração do Dr. Ricardo Andrade Zampieri do departamento de Fisiologia da USP de São Paulo, utilizando o software GraphPad PRISM v. 6.02.

Amostras	Tm (C°) <i>Amplicon 1</i>
Placa 1:	
<i>L. infantum</i>	85,35 ± 0,07
<i>L. amazonensis</i>	85,90 ± 0,00
<i>L. braziliensis</i>	86,55 ± 0,07
BA07	85,40 ± 0,00
BA11	85,40 ± 0,00
BA14	85,50 ± 0,00
BA15	85,50 ± 0,14
BA37	85,45 ± 0,07
Placa 2:	
<i>L. infantum</i>	85,65 ± 0,07
<i>L. amazonensis</i>	86,00 ± 0,00
<i>L. braziliensis</i>	86,60 ± 0,00
BA39	85,75 ± 0,07
BA47	85,70 ± 0,00
SP01	85,80 ± 0,00
SP03	85,80 ± 0,00
SP04	85,80 ± 0,00
SP10	85,75 ± 0,07
DF36	85,75 ± 0,07
DF54	85,80 ± 0,00
Placa 3:	
<i>L. infantum</i>	85,10 (apenas um valor)
<i>L. amazonensis</i>	85,95 ± 0,21
<i>L. braziliensis</i>	86,55 ± 0,07
PA04	85,55 ± 0,49
SP02	85,20 ± 0,28
DF45	85,20 ± 0,42

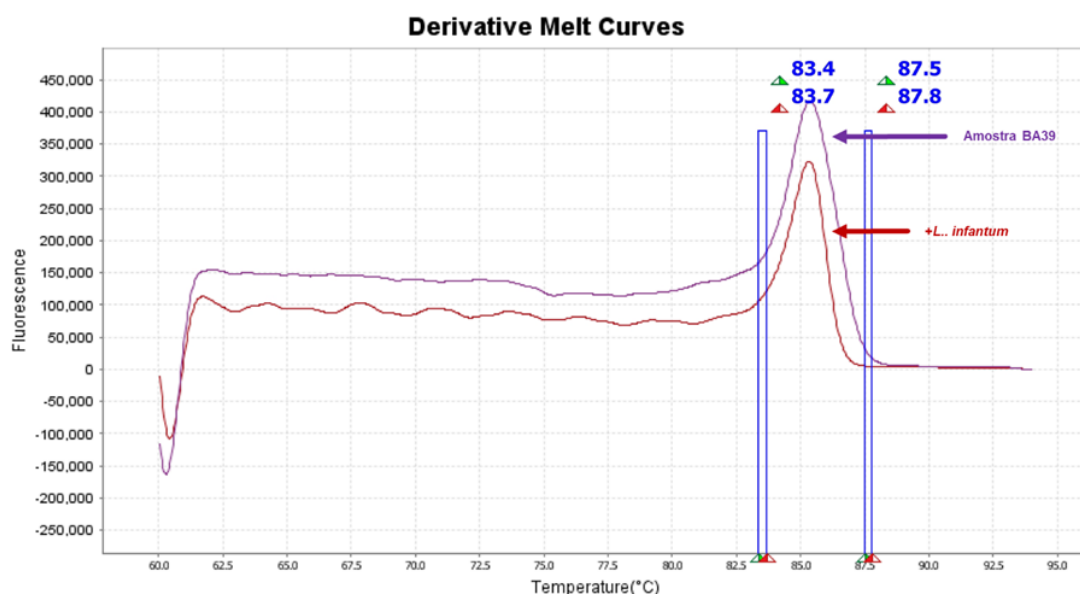


Figura 26: Amostra BA39 do zoológico de Salvador, primata da espécie *Alouatta caraya* (Bugio-preto) apresentou sinal de fluorescência com valor mais alto quando comparados com o de *L. infantum*, porém a análise do valor de Tm (da amostra e da cepa controle de *L. infantum*) apresentaram valores bem próximos (Tm BA39 85,7°C e Tm *L. infantum* 85,6°C). Fonte: arquivo pessoal.

A amostra BA37 (*Sapajus flavius*) apresentou curva de dissociação e T_m compatíveis com àquela apresentada pela cepa controle de *L. infantum* no *amplicon* 1 e curva de dissociação e T_m compatíveis com *L. braziliensis* no *amplicon* 2. (Figura 27 e Figura 28). De acordo com Zampieri (2016), quando a amostra apresenta um valor de CT tardio nos testes com o *amplicon* 2, com relação ao obtido nos testes com *amplicon* 1 (já que o *amplicon* 2 é mais eficiente para espécies do subgênero *L. (Viannia)*, tem-se um forte indício que a amostra é *L. infantum*.

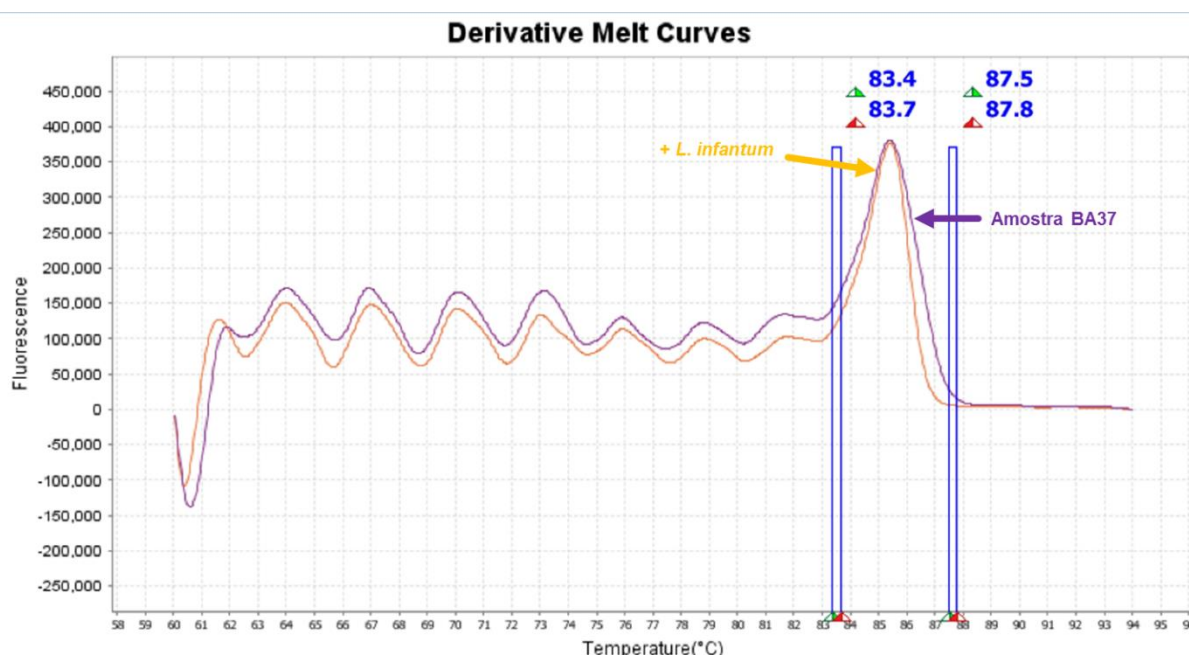


Figura 27: Curvas de dissociação resultante da reação em cadeia da polimerase em tempo real seguida de análise de dissociação de alta resolução (HRM) com *primers* direcionados ao gene HSP70 de *Leishmania* spp. e analisadas pelo *Software* v.3.0.1 (Life Technologies, USA). A seta roxa indica a curva de dissociação referente à amostra BA37, um primata do zoológico de Salvador da espécie *Sapajus flavius* (macaco-prego-dourado) com valor de T_m de 85,4°C. A seta em amarelo indica a curva de dissociação da cepa controle de *L. infantum*, com valor de T_m de 85,3 no *amplicon* 1. Observar que as curvas se alinham e os valores de T_m estão muito próximos. Fonte: arquivo pessoal.

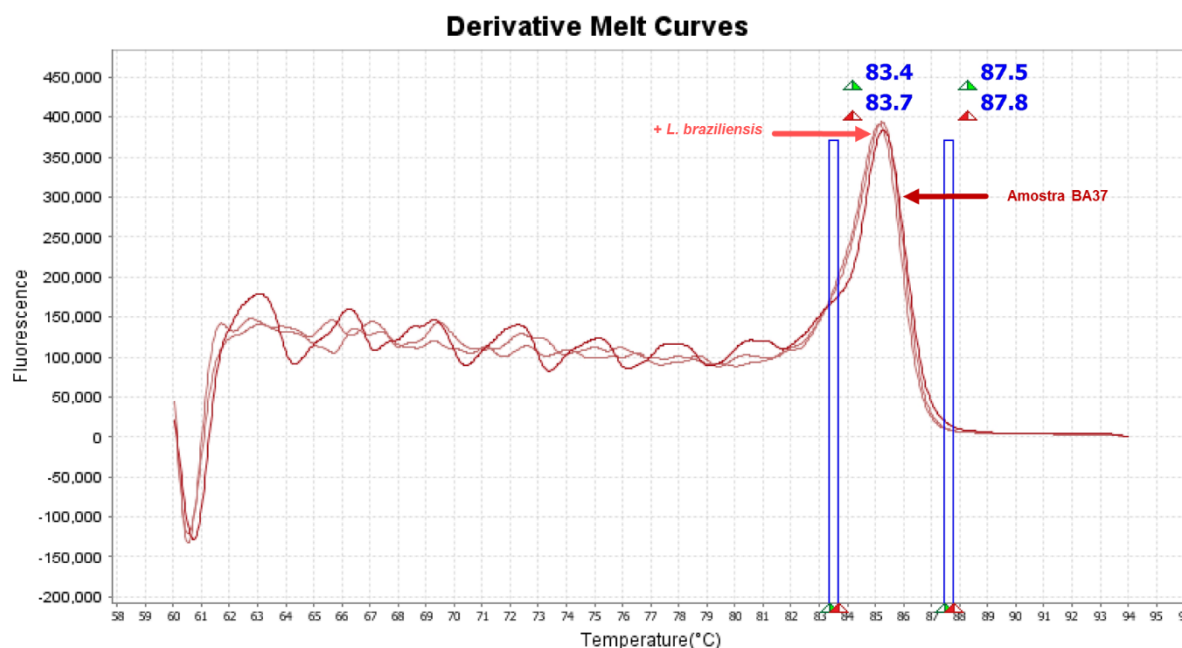


Figura 28: Curvas de dissociação resultante da reação em cadeia da polimerase em tempo real seguida de análise de dissociação de alta resolução (HRM) com *primers* direcionados ao gene HSP70 de *Leishmania* spp. e analisadas pelo *Software* v.3.0.1 (Life Technologies, USA). As setas indicam as curvas de dissociação referentes à amostra BA37, um primata do zoológico de Salvador da espécie *Sapajus flavius* (macaco-prego-dourado) com valor de Tm de 85,4°C e da cepa controle de *L. braziliensis* com Tm de 85,5°C no *amplicon* 2. Porém, a análise do CT apresenta uma amplificação tardia no *amplicon* 2, indicado tratar-se de *L. infantum*. Fonte: arquivo pessoal.

Além desta, a análise das amostras SP01, SP03, SP04, SP10 e DF36 apresentaram no *amplicon* 1, Tm de 85,8°C; 85,8°C; 85,8°C; 85,7°C e 85,7°C respectivamente, enquanto a cepa de *L. infantum* apresentou Tm de 85,6°C e *L. braziliensis* de 86,6°C, indicando ser *L. infantum*. Porém, a análise pelo *amplicon* 2 que apresenta maior eficiência para o subgênero *Viannia*, mostrou uma curva de dissociação próxima de *L. braziliensis*, cujas Tm foram SP 01 (85,1°C); SP03 (85,0°C); SP04 (85,0°C); SP10 (85,1°C) e DF36 (85,2°C) enquanto a cepa de *L. braziliensis* teve Tm de 85,1°C como ilustra as Figura 29 e Figura 30. Como o CT das amostras, neste caso, não foi tardio, e todas amplificaram (na cPCR) com *primers* específicos para *L. braziliensis*, foram consideradas na técnica de HRM como *L. braziliensis*.

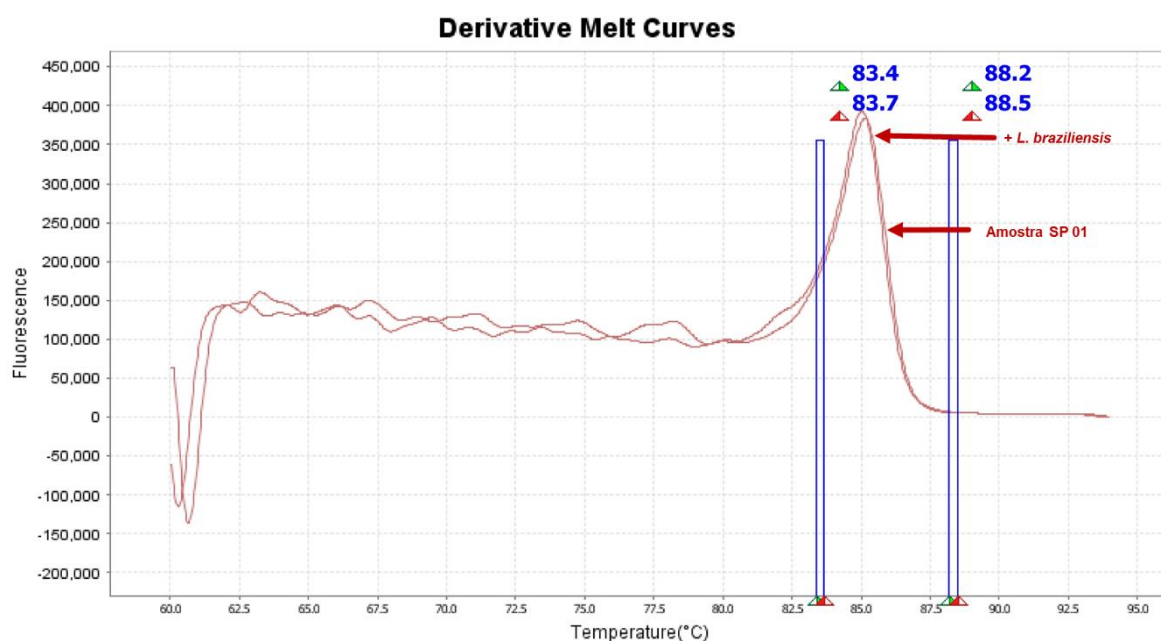


Figura 29: Curvas de dissociação da amostra SP01, primata do zoológico de Sorocaba, da espécie *Alouatta caraya* (bugio-preto) e da cepa controle de *L. braziliensis* no amplicon 2. Fonte: arquivo pessoal.

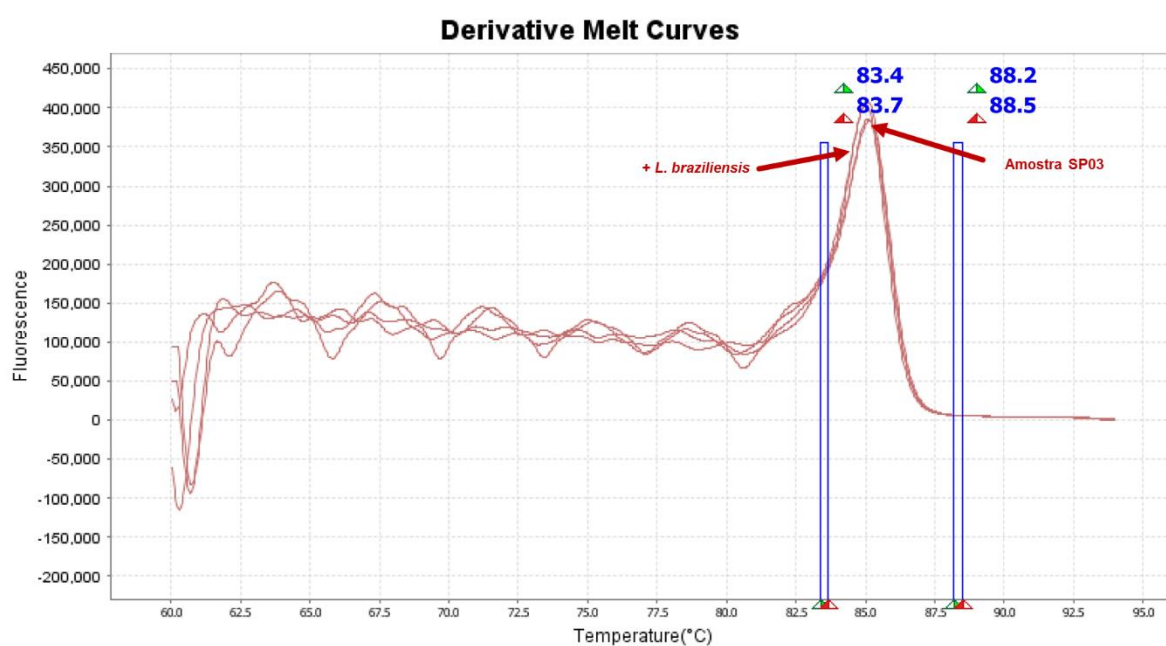


Figura 30: Curvas de dissociação da amostra SP03, primata do zoológico de Sorocaba, da espécie *Alouatta caraya* (bugio-preto) e da cepa controle de *L. braziliensis* no amplicon 2. Fonte: arquivo pessoal.

As amostras PA02; PA03; PA05; SP47 e DF56 não apresentaram Tm compatíveis com as cepas padrão, sendo classificada, pelo software, como “Variante” (Figura 31).

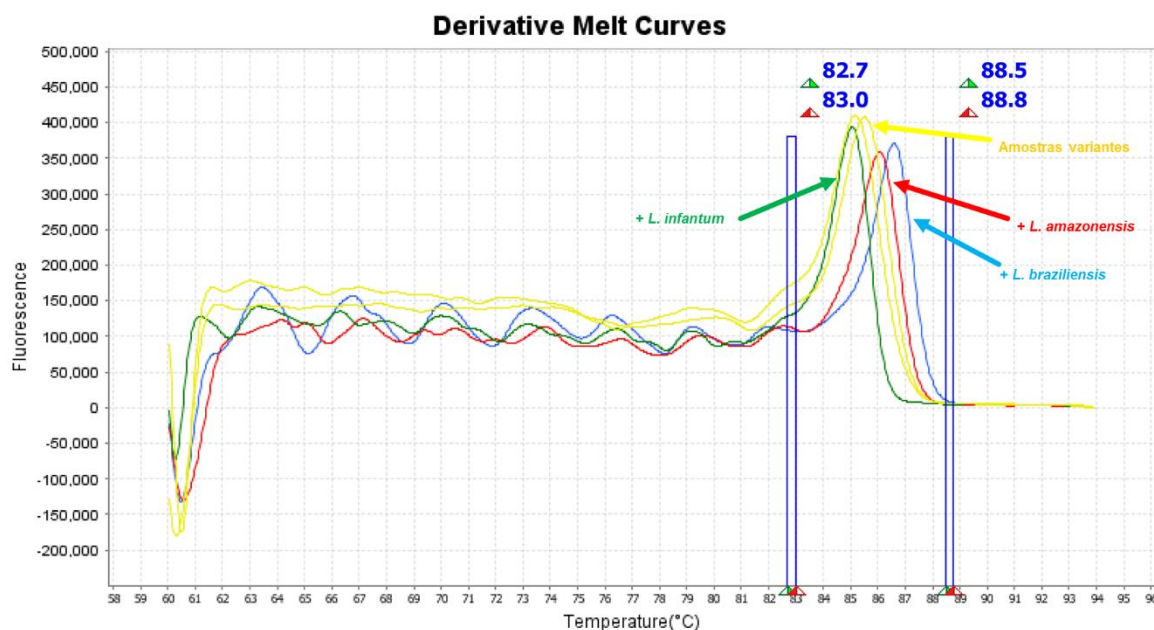


Figura 31: Amostras PA02; PA03; PA05; SP47 e DF 56 foram classificadas como "Variantes" por não apresentarem T_m compatíveis com as cepas utilizadas como controles positivos da reação (*L. infantum*; *L. amazonensis* e *L. braziliensis*). Portanto, não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* nessas amostras. Fonte: arquivo pessoal.

O Quadro 4 apresenta os valores de T_m (T_{m1}) de todas as 16 amostras que apresentaram picos satisfatórios, e valores de T_m compatíveis com os valores exibidos para as cepas padrão de *Leishmania* (*L. infantum*; *L. braziliensis* e *L. amazonensis*) e sua identificação da cepa envolvida em casa amostra.

Quadro 4: valores de Tm (Tm1) de todas as 16 amostras que apresentaram picos satisfatórios, e valores de Tm compatíveis com os valores exibidos para as cepas padrão de *Leishmania*.

Amostra	Tm amplicon 1			Tm amplicon 2			Identificação da amostra
	Placa 1			Placa 1			
	<i>L.infantum</i> 85,3°C	<i>L.amazonensis</i> 85,9°C	<i>L.braziliensis</i> 86,5°C	<i>L.infantum</i> 85,7°C	<i>L.amazonensis</i> 85,4	<i>L.braziliensis</i> 85,2	
BA07	85,4°C					85,2°C	<i>L. infantum</i> *
BA11	85,4°C					85,3°C	<i>L. infantum</i> *
BA14	85,5°C					85,3°C	<i>L. infantum</i> *
BA15	85,5°C					85,3°C	<i>L. infantum</i> *
BA37	85,4°C					85,2°C	<i>L. infantum</i> *
	Placa 2			Placa 2			
	<i>L.infantum</i> 85,6°C	<i>L.amazonensis</i> 86,0°C	<i>L.braziliensis</i> 86,6°C	<i>L.infantum</i> 85,7°C	<i>L.amazonensis</i> 85,4°C	<i>L.braziliensis</i> 85,1°C	
BA39	85,7°C				85,3°C		<i>L. infantum</i> *
BA47	85,7°C				85,4°C		<i>L. infantum</i> *
SP01	85,8°C					85,1°C	<i>L. braziliensis</i>
SP03	85,8°C					85,0°C	<i>L. braziliensis</i>
SP04	85,8°C					85,0°C	<i>L. braziliensis</i>
SP10	85,7°C					85,1°C	<i>L. braziliensis</i>
DF36	85,7°C					85,2°C	<i>L. braziliensis</i>
DF54	85,8°C				85,5°C		<i>L. infantum</i>
	Placa 3			Placa 3			
	<i>L.infantum</i> 85,1°C	<i>L.amazonensis</i> 85,9°C	<i>L.braziliensis</i> 86,5°C	<i>L.infantum</i> 86,1°C	<i>L.amazonensis</i> 86,3°C	<i>L.braziliensis</i> 85,6°C	
PA04	85,5°C					84,7°C	<i>L. infantum</i>
SP02	85,2°C					84,5°C	<i>L. infantum</i>
DF45	85,2°C				85,4°C		<i>L. infantum</i>

Legenda: BA: amostras de PNH do zoológico de Salvador; SP: amostras de animais do zoológico de Sorocaba; DF: amostras de PNH do zoológico de Brasília; PA: PNH cativos do Centro Nacional de Primatas do Pará; *: amostras em que foi realizado sequenciamento genético; Tm: Temperatura de *melting*.

Discussão

5 Discussão

5.1 Diagnóstico parasitológico

A detecção molecular de parasitos de *Leishmania* em amostras sanguíneas por ser uma técnica sensível e específica, geralmente apresenta êxito nos animais infectados; porém é um achado bastante raro quando pesquisados durante exames parasitológicos de extensão sanguínea, até mesmo quando o hospedeiro apresenta sintomatologia da doença (Oikonomidis et al., 2019). Um trabalho realizado em cães observou uma taxa de 0,28% de lâminas de sangue periférico com formas compatíveis com amastigotas de *Leishmania* (Giudice e Passantino, 2011). Além deste, um outro estudo envolvendo amostras de pacientes humanos encontrou formas amastigotas em esfregaços sanguíneos em 1,3% das amostras testadas (Sharma et al., 2000). Estes estudos corroboram com os achados deste trabalho em que quatro primatas apresentaram lâminas compatíveis com amastigotas de *Leishmania* spp., representando 2,85%.

Outros estudos realizaram o diagnóstico parasitológico de *Leishmania* a partir de lâminas de aspirado de tecidos, como no trabalho de Chulay e Bryceson (1983) que encontrou formas amastigotas em aspirado de baço em pacientes com leishmaniose visceral. Outra pesquisa que utilizou técnicas parasitológicas foi de Alves-Martin (2017) onde foi relatado a presença de amastigotas em imprint de órgãos em 11,1%, sendo encontrada a partir do imprint de linfonodo; baço e na pele de orelha de gatos. Embora tais resultados sejam relevantes, estudos apontam para o perigo da realização do diagnóstico parasitológico em aspirado de órgãos, mais especificamente, de tecidos do baço se a técnica for realizada a campo (Siddig et al., 1988; Zijlstra et al., 1992).

Além disso, embora vários tecidos biológicos possam ser utilizados para investigação de *Leishmania* spp., em exames parasitológicos, ainda não há um consenso sobre qual constitui a melhor amostra biológica. A sensibilidade do teste pode ser alterada dependendo do tecido utilizado (Dias et al., 2019) como demonstrou o trabalho de Cotterell e colaboradores (2000) que encontraram maior positividade no diagnóstico parasitológico em amostras de medula óssea comparada com outros tecidos estudados.

No presente trabalho, somente foi possível a colheita de sangue e suabe conjuntival (em alguns locais) para a execução das diferentes técnicas diagnósticas, tendo em vista que os PNH são animais silvestres e somente os médicos veterinários de cada instituição pesquisada eram responsáveis pela colheita dos materiais biológicos, além das autorizações pelos respectivos Comitês de Ética de cada local.

Além disso, embora o estudo em animais silvestres seja fundamental para o conhecimento básico da vida do animal e sua saúde, faz-se necessário uma contenção do mesmo para que possam ser examinados e realizadas as colheitas de amostras. A contenção, muitas vezes, gera estresse para o animal, uma vez que a contenção física para imobilização pode resultar em ferimentos superficiais, os quais podem requerer cuidados a posteriore e, nos casos em que a contenção química (com uso de anestésicos) deve ser realizada, tem que haver atenção com a administração do medicamento, tanto na aplicação, na dosagem adequada e também nos cuidados até que transcorra o tempo de ação do anestésico. Portanto, embora necessário a realização de estudos com colheita de amostras biológicas em animais silvestres, os procedimentos devem ser seguros tanto para o animal como para o pesquisador (Hampton et al., 2016).

Neste estudo, dos quatro PNH com amastigotas nas lâminas, dois deles (PA03 e BA14) foram positivos à técnica molecular de cPCR de sangue e um na cPCR de células conjuntivais (PA03), demonstrando a efetividade do diagnóstico e do examinador, além de um forte indício que as lâminas realmente apresentem formas de *Leishmania* spp. Em animais naturalmente infectados, fracassos na detecção do parasito pela técnica de cPCR deve-se a diversos fatores, como a quantidade baixa de DNA extraído utilizada para a realização da técnica (1µL); o curso da infecção no momento da colheita; baixa parasitemia e a menor sensibilidade dos *primers* empregados na pesquisa (Krause et al., 1996).

Somado a isso, a técnica de cPCR pode ter sua sensibilidade alterada durante o curso da infecção. Um estudo realizado em cães mostrou que a sensibilidade da cPCR em amostras pós-infecção foi de 78 a 88% durante os primeiros 135 dias após a infecção e teve uma queda da sensibilidade que foi para 50% após 300 dias. Além do intervalo de tempo após a infecção diminuir a sensibilidade da cPCR, cães não-doentes também apresentam uma diminuição na sensibilidade do teste. Assim, estes dados sugerem que essa técnica molecular é útil durante uma infecção

ativa principalmente em cães sintomáticos (Quinnell et al., 2001). Nesta pesquisa com primatas, a sensibilidade da técnica nas amostras SP28 e SP42 pode ter sido diminuída devido ao período de infecção que estes animais se encontravam e, em se tratando de animais silvestres, este tipo de amostra ainda é um desafio na padronização da técnica (Roque e Jansen, 2014).

Na maioria dos casos, o principal hospedeiro celular das formas amastigotas do parasito são os macrófagos que fagocitam os protozoários. Porém, muitos trabalhos estão relatando que no sangue periférico, as amastigotas estão constantemente sendo fagocitadas pelos neutrófilos (Schalm, 1979; Manzillo et al., 2005; Levy et al., 2006; Santos et al., 2006; Nardoni et al., 2012). Até o momento, não se tem uma elucidação verdadeira do papel dos neutrófilos na patogenia da doença, mas há fortes indícios de que eles sejam usados como portadores e permitem uma “entrada silenciosa” das formas amastigotas dentro dos macrófagos. Segundo a teoria do modelo “Cavalo de Tróia” (Laskay et al., 2003), a infecção por formas promastigotas recruta em seu primeiro momento diversos neutrófilos, que internalizam os protozoários (Witko-Sarsat et al., 2000). Os neutrófilos infectados tornam-se apoptóticos (morte celular programada) e convocam os macrófagos, os quais fagocitam neutrófilos infectados e também se infectam. Além disso, um aumento de células (eosinófilos, neutrófilos e macrófagos) podem ser observados no sangue de indivíduos infectados com *Leishmania* (Müller et al., 2001). Nessa pesquisa, as lâminas de extensão sanguínea dos PNH que apresentaram formas sugestivas do parasito também apresentaram numerosas células de defesa, indicando uma possível infecção.

O Centro Nacional de Primatas localizado no estado do Pará foi o local nesta pesquisa que apresentou maior porcentagem de lâminas sanguíneas sugestivas de *Leishmania*, o que já era esperado, uma vez que a região amazônica brasileira (onde localiza-se o estado do Pará) já é conhecida há muito tempo por apresentar alto números de casos de leishmaniose, uma vez que, o local conta com uma grande variedade de mamíferos que atuam como hospedeiros do parasito e um número elevado de flebotomíneos vetores (Lainson e Shaw, 1987; Shaw e Lainson, 1987; Silveira et al., 1991a; Silveira et al., 1991b; Lainson et al., 1994; Souza et al., 1996; Lainson e Shaw, 1998; Da Trindade et al., 2019; Gonçalves et al., 2019).

Na literatura, são escassos os trabalhos em primatas que relatem o diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* em exames parasitológicos de extensão sanguínea. A pesquisa de Lainson et al., 1989 apresenta um diagnóstico parasitológico, em que foi relatada a presença de amastigotas de *Leishmania* em lâminas de lesões cutâneas de hamsters infectados com amostras provenientes de primatas das espécies *Sapajus apella* e *Chiropotes satanas*, naturalmente infectados. Assim, o resultado do presente estudo tem um papel extremamente importante para comunidade científica, já que foram encontradas formas amastigotas do parasito em lâminas de sangue de PNH.

Outros trabalhos relatam a infecção experimental por *Leishmania donovani* em primatas da espécie *Saimiri sciureus*, em que foi possível a visualização de formas do protozoário a partir do exame parasitológico de *imprint* de fragmentos hepáticos dos primatas infectados (Dennis et al., 1985). Em um estudo bem parecido foi observado microscopicamente amastigotas a partir do exame parasitológico de biópsia do fígado, fixado em lâmina e corado por Giemsa, de primatas da espécie *Aotus trivirgatus* que haviam sido inoculados com *Leishmania donovani* (Broderon et al., 1986). Tais estudos embora sejam importantes, relatam os achados de infecção experimental nos PNH, sendo que a maioria dos trabalhos que relatam a infecção natural utilizam outras técnicas de diagnóstico para identificação do parasito.

Em infecções naturais, a detecção do parasito em exames parasitológicos direto é importante, pois pode indicar a circulação ativa do protozoário no ambiente, uma vez que os animais apresentam *Leishmania* spp. em sua forma íntegra na corrente sanguínea. Assim, o animal pode servir de fonte para o repasto sanguíneo aos flebotomíneos e contribuir com a disseminação do patógeno (Dias et al., 2019). Na presente pesquisa foi possível encontrar amastigotas durante observação direta em lâminas de esfregaço sanguíneo, reforçando a participação dos PNH na manutenção e disseminação do protozoário.

Embora não se tenha um consenso sobre o papel dos PNH como reservatórios de leishmanias, o trabalho de Oliveira e colaboradores (2019), realizado no Brasil, avaliou o potencial de transmissibilidade de *L. infantum* por esses animais através do xenodiagnóstico utilizando flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, os quais se alimentaram dos primatas. Dos 52 PNH de cativeiro, oito deles foram positivos no xenodiagnóstico e tiveram os parasitos quantificados pelo teste molecular,

demonstrando que estes animais positivos para *L. infantum* foram capazes de infectar flebotomíneos. Estudos como este, reforçam a participação dos PNH no ciclo de transmissão das leishmanioses, revelando o papel desses animais como reservatórios do parasito.

Apesar dos diagnósticos parasitológicos pela observação direta de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (extensão sanguínea; esfregaço de punção de medula óssea, fígado, baço, linfonodo ou pele) serem considerado padrão-ouro por tratar-se de uma técnica relativamente barata, fácil de ser realizada e pouco invasiva (no caso de amostra sanguínea), a sensibilidade do método depende muito do grau de parasitismo do hospedeiro, já que a sensibilidade do teste diminui se a intensidade da infecção for moderada ou baixa (Beltrame et al., 2017); do tipo de material biológico analisado (Zijlstra et al., 1992); do processo de coloração das lâminas empregado e da experiência do microscopista que esteja analisando as lâminas, tornando-o bastante sugestivo (Laurenti, 2009).

Dessa maneira, embora importante a investigação por meio de técnicas parasitológicas, como exemplo de lâmina de extensão sanguínea, diante de resultados negativos, deve-se complementar o diagnóstico com outras técnicas mais sensíveis e específicas como por exemplo exames moleculares (Hawash et al., 2018) e sorológicos (Mansueto et al., 2012) com pessoas treinadas para realização de métodos de diagnóstico apropriado para o combate às infecções parasitárias como no caso das leishmanioses (Özbilgin, 2018).

5.2 Diagnóstico sorológico

A técnica de RIFI empregada na pesquisa com o uso do conjugado específico contendo Anti-Anticorpo IgG de macaco (IgG – γ – chain specific – Sigma – Aldrich®, St. Louis, USA) não detectou nenhuma amostra reagente, colocando em dúvida os resultados do teste, uma vez que os PNH amostrados são provenientes de áreas endêmicas para leishmanioses no Brasil e trabalhos na literatura apontam para a detecção de anticorpos contra *Leishmania* spp. em animais silvestres (Ortega-García et al., 2019; Alcover et al., 2020) incluindo amostras de PNH (Paiz et al., 2019), inclusive com o uso da técnica de RIFI.

Dessa maneira, foi realizada a técnica de RIFI com outro conjugado, que detecta anticorpos contra *Leishmania* spp. em humanos. Foi utilizado o conjugado IgG de cabra anti-humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (anti-humano/FITC) da Bio-Manguinhos®. Embora as amostras deste estudo sejam de PNH, o uso de conjugado humano até mesmo nesses animais já foi descrito na literatura, em que foram encontrados 11 primatas (22,5% de positividade) das espécies *Pan troglodytes*; *Sapajus apella* e *Leontopithecus chrysomelas* reagentes para *Trypanosoma cruzi*, inclusive duas das espécies também fazem parte deste estudo em questão. O conjugado anticorpo-fluoresceína utilizado foi o mesmo que utilizamos neste estudo, o qual foi desenvolvido e fornecido pela Bio-Manguinhos (Ferreira, 2019).

Em nosso trabalho, oito amostras foram reagentes para *Leishmania* spp., representando 4,81%. Schäfer e colaboradores (2019) detectaram cães reagentes para *Leishmania* com a mesma técnica empregada no presente estudo. Além dos cães, amostras de gatos apresentaram anticorpos à técnica de RIFI, em que foram detectados em 15,38% dos animais amostrados, com títulos de 40 até 320 (Bezerra, 2019).

Para o diagnóstico de LV, a técnica de RIFI é utilizada desde 1964 (Duxbury e Sadun, 1964) e no Brasil, é considerada a principal técnica sorológica no diagnóstico pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Freire, 2017). O teste está bem consolidado para pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* spp., e trabalhos apontam altas porcentagens de sensibilidade e especificidade (maiores que 95%), além de apresentar elevado desempenho, simplicidade de uso e baixo custo (Badaró et al., 1983; Pedras et al., 2003).

Além dos animais domésticos, estudos apontam que animais silvestres também podem ser reagentes à *Leishmania* spp. na técnica de RIFI, como demonstrado por Jusi e colaboradores (2011) que encontraram canídeos silvestres reagentes e Cássia-Pires e colaboradores (2014) que detectaram roedores silvestres positivos. Além disso, o trabalho de Guiraldi, 2016 já havia detectado amostra de PNH da espécie *Erythrocebus patas* reagente para *L. braziliensis*, mostrando que os primatas se infectam e desenvolvem anticorpos contra o agente.

Dos oito PNH sororreagentes neste estudo, seis não foram positivos nos testes moleculares. Destes seis, três animais (dois de Brasília e um de Salvador) apresentavam apenas amostras de soro, portanto não foi realizado nenhum teste molecular, apenas a RIFI.

Os achados de outras três amostras de PNH (uma de Salvador; uma de Brasília e uma de Sorocaba) em que foram realizados ambos os testes (molecular e sorológico) e que foram reagentes apenas à sorologia, se sustentam no fato de que os protozoários têm um certo tropismo pelas células teciduais, como exemplo de *L. infantum* que tem tropismo pelas células da medula óssea, linfonodos e baço e no momento da coleta de sangue, os parasitos podiam estar compartimentados no interior dessas células, portanto não foi possível sua detecção na corrente sanguínea. Além disso, deve-se levar em consideração a ausência de parasitemia ou uma carga parasitária muito baixa no momento da colheita, e essa carga ser menor do que o limite de detecção do teste (Chatzis et al., 2014; Coura et al., 2018).

Outra hipótese para estes animais serem sororreagentes porém, negativos à PCR, pode ser devido a possibilidade de reações cruzadas contra anticorpos de outros parasitos semelhantes, como no caso da reação cruzada entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, que já foi relatado na literatura (Luciano et al., 2009; Troncarelli et al., 2009; Zanette et al., 2014; Silveira-Neto et al., 2015; Soares et al., 2016).

Uma outra explicação é que neste estudo foram pesquisados anticorpos da classe IgG, que está presente durante o curso de uma infecção tardia, considerada crônica (Fricker-Hidalgo et al., 2020). Portanto, os animais sororreagentes realmente não apresentariam os parasitos na circulação sanguínea, pois a infecção já não seria mais considerada aguda, estando na fase de cronicidade, como indicado pela presença de imunoglobulina IgG. Além disso, os animais sororreagentes nesta pesquisa também não apresentaram formas sugestivas de amastigotas no exame parasitológico de extensão sanguínea.

Outras duas amostras que foram reagentes à RIFI e também positivas à PCR (ambas de Salvador), podem indicar uma nova infecção, uma vez que os animais apresentaram anticorpos da classe IgG e também o parasito circulante no sangue. Somado a isso, após uma infecção natural, podem permanecer na corrente sanguínea do hospedeiro indefinidamente, sendo chamados de “parasitos persistentes”, onde em

um mesmo hospedeiro existem os parasitos persistentes juntamente com uma resposta imunológica montada pelo organismo (Mandell e Beverley, 2017).

No diagnóstico molecular deste trabalho (discutido no próximo tópico: 5.3 Diagnósticos moleculares), 39 animais foram positivos para *Leishmania* spp. (22 positivos no sangue e 22 nos suabes conjuntivais, sendo que cinco PNH positivaram em ambos os tipos de material biológico). No teste sorológico, oito animais foram reagentes. Destes oito, dois deles também foram positivos no teste molecular, (ambos do zoológico de Salvador, BA07 – *Sapajus xanthosternus* positivo no sangue e suabe conjuntival e BA39 – *Alouatta caraya* positivo na cPCR de sangue) indicando uma possível reinfecção ou reagudização (Salvatore et al., 2016).

5.3 Diagnósticos moleculares

5.3.1 Diagnóstico por cPCR

Nos últimos anos, a técnica molecular de cPCR vem sendo amplamente utilizada por ser considerada um método fácil de ser realizado, rápido, sensível e específico na detecção de uma gama de parasitos em diferentes tipos de material biológico (Smits e Hartskeerl, 1995; Lodh et al., 2013; Springer et al., 2016; Khadangi et al., 2017; Ala-Houhala et al., 2018; Santos, 2016). Muitos estudos estão detectando o DNA de *Leishmania* utilizando ensaios de cPCR (Schönian et al., 2003; da Silva et al., 2018; Selder et al., 2018; Torrellas et al., 2020).

Dessa forma, muitas pesquisas em mamíferos silvestres estão utilizando a cPCR para o diagnóstico de *Leishmania* spp. (Alexander et al., 1998; Tonelli et al., 2017; Viettri et al., 2018; Alcover et al., 2020), incluindo amostras de PNH (Malta et al., 2010; Lombardi et al., 2014; Porfirio et al., 2018; Paiz et al., 2019). No presente trabalho, também foi empregada a técnica de cPCR nas amostras de PNH com o uso de *primers* direcionados a diversos alvos para amplificação do DNA de *Leishmania* spp. A utilização desses diferentes alvos permitiu uma maior sensibilidade ao teste molecular. Assim, ao associar os resultados obtidos com diferentes iniciadores, foi possível a identificação de um número maior de animais infectados.

5.3.1.1 cPCR do sangue

A fim de se amplificar o DNA da família Trypanosomatidae, foram utilizados dois pares de iniciadores, um deles direcionado aos genes codificadores ssU rRNA e 5.8S rRNA da região ITS-2 (*Internal Transcribes Sapcer*) localizada entre as subunidades SSU- Subunidade menor/ LSU- Subunidade maior do DNA ribossomal e outro que é conhecido por ser *barcoding* dos tripanossomatídeos, que amplificam a região V7-V8 do gene16S SSU rRNA. Os resultados mostraram que *primers* para família Trypanosomatidae que amplificam a região ITS-2 não apresentou positividade em nenhuma amostra testada, tendo revelado uma baixa sensibilidade. Porém, o uso dos *primers* conhecidos por amplificarem uma região *barcoding* dos tripanossomatídeos (Fermio et al., 2013), apresentou 14 animais positivos, mostrando serem mais sensíveis.

Do total de 22 amostras de PNH amplificadas na cPCR com os diversos *primers* utilizados, 14 delas (63,63%) amplificaram com os iniciadores da região V7-V8 do gene16S SSU rRNA utilizados para amplificação do DNA de tripanossomatídeos; seis delas (27,27%) foram positivas com os *primers* direcionados ao kDNA de *Leishmania braziliensis* e três delas (13,63%) foram amplificadas com o uso de alvos para a região 18S rRNA de *Leishmania infantum*.

Das três amostras positivas para região de *L. infantum*, apenas uma delas também amplificou com o uso dos *primers* da região V7-V8 e nenhuma delas foi amplificada para *L. braziliensis*. Já as seis amostras positivas para região do kDNA de *L. braziliensis*, foram positivas somente com este alvo, não apresentando positividade em nenhuma das outras duas regiões testadas. A Figura 12 (no item 4.4.3 de resultados deste trabalho) esquematiza as amostras positivas com todos os *primers* empregados na pesquisa.

Com estes resultados, podemos inferir que os *primers* 561F e 561R, direcionados para a região V7-V8 do gene16S SSU rRNA do DNA de tripanossomatídeos é ineficiente (ou pouco eficiente) na amplificação da espécie *L. braziliensis*, uma vez que todas as amostras positivas para *L. braziliensis* (cPCR e HRM) não amplificaram com o uso deles. Trabalhos na literatura utilizam estes iniciadores para amplificação de família Trypanosomatidae, incluindo *Trypanosoma cruzi* (Porfirio et al., 2018); *Endotrypanum monterogeii*; *Phytomonas serpens*; *Trypanosoma avium* e *Trypanosoma rotatorium* (Noyes et al., 1999) além de

Leptomonas spp., *Crithidia fasciculata*; *Leishmania major*; *Leishmania amazonensis*; *Leishmania tarentolae*; *Leishmania dononani* e *Leishmania guyanensis* (Noyes et al., 1996) corroborando com os resultados da presente pesquisa, pois nenhum dos trabalhos conseguiu amplificar o DNA de *L. braziliensis* com estes *primers*.

Das três amostras amplificadas para região 18S rRNA de *L. infantum*, apenas uma também foi positiva para região V7-V8 (amostra BA07, um PNH do zoológico de Salvador da espécie *Sapajus xanthosternos*). A fim de se ter certeza que o *primer* 561F e 561R (para região V7-V8) seria capaz de amplificar o DNA de *L. infantum*, foi realizado o sequenciamento genético apenas dessa amostra BA07 a partir do V7-V8, a qual retornou 94,91% de similaridade com *L. guyanensis* (Nº acesso KF041803.1) indicando ser uma possível co-infecção. Embora o sequenciamento não tenha retornado resultados de similaridade para *L. infantum*, o item 5.3.2 “caracterização molecular” desta discussão revela que as amostras positivas com os *primers* 561F e 561R em que foram feitas a caracterização molecular com *primers* direcionados aos citocromos de *Leishmania* apresentaram positividade para *L. infantum*, portanto não se pode afirmar que a região V7-V8 seja ineficiente para *L. infantum*, mas sim que estes *primers* são bastante sensíveis mas são pouco específicos.

Não se pode descartar uma possível co-infecção, uma vez que trabalhos demonstram que animais podem estar co-infectados com mais de uma espécie de tripanosomatídeos, incluindo animais sivetres (Ramirez et al., 2002; Viettri et al., 2018; Porfirio et al, 2018; Santos et al., 2018; Trüeb et al., 2018), indicando que os PNH podem participar na transmissão de diferentes protozoários.

5.3.1.2 cPCR de suabe conjuntival

Em busca de uma alternativa à cPCR que utiliza amostras de sangue e/ou tecidos, neste trabalho empregou-se a técnica molecular em células conjuntivais, colhidas com o auxílio de suabes estéreis, que dispensa o uso de anestésicos químicos (na maioria dos casos) e torna o procedimento indolor, menos trabalhoso e pouco invasivo ao animal. Trabalhos na literatura relatam que este tipo de material biológico (células a partir de suabes) fornece resultados confiáveis, com maior rapidez

durante as coletas e menos estresse (Ferreira et al., 2013; Benvenga, 2013), contribuindo para o bem-estar animal.

Testes moleculares a partir de células epiteliais conjuntivais, coletadas com o auxílio de suabes estéreis, podem ser empregados na pesquisa de *Leishmania* spp., uma vez que as células presentes nas mucosas são repostas constantemente e por tratar-se de células esfoliativas, torna-se a coleta de fácil e rápida realização. Ferreira e colaboradores (2008) afirmaram que as mucosas dos hospedeiros podem ser colonizadas pelo protozoário e por isso, é possível a detecção do parasito neste material. Além disso, a colheita por meio de suabes é útil, pois estes são facilmente armazenados e podem ser uma alternativa às pesquisas epidemiológicas a campo.

Na presente pesquisa, o uso de *primers* que amplificam o DNA da família Trypanosomatidae, direcionados aos genes codificadores ssU rRNA e 5.8S rRNA da região ITS-2, assim como nas amostras de sangue, apresentaram uma baixa sensibilidade, tendo detectado o DNA em apenas duas amostras conjuntivais (um PNH de Salvador e um de Sorocaba) (2/118: 1,69%). Já o uso dos *primers* conhecidos por amplificarem uma região *barcoding* dos tripanossomatídeos, da região V7-V8, amplificou um total de sete PNH (seis do CENP e um do zoológico de Salvador) (7/118: 5,93%).

Embora ambos os *primers* (ITS-2 e V7-V8) foram utilizados para amplificação da mesma família (Trypanosomatidae), não houve concordância entre eles, uma vez que as amostras amplificadas para a região ITS-2 não amplificaram para a região V7-V8 e vice-versa. Isso deve-se ao fato de que mesmo direcionados ao DNA de membros pertencentes a mesma família, os *primers* foram “desenhados” contendo diferentes trechos de nucleotídeos (el Tai et al., 2000; Noyes et al., 1996) e os resultados deste trabalho evidencia-se uma maior sensibilidade atribuída aos iniciadores da região V7-V8, já que foi possível a identificação de um maior número de animais positivos tanto no sangue como nos suabes conjuntivais.

Os resultados do presente estudo se sustentam na afirmação do trabalho de D’Avila-Levy e colaboradores (2015) de que, *primers* direcionados ao DNA *barcoding*, referem-se aqueles orientados para o código de barras do DNA que são fragmentos de genes já conhecidos e padronizados e que podem ser úteis na

determinação rápida e precisa de uma espécie de agente, portanto, são considerados específicos e mais sensíveis comparados a outros iniciadores.

Além disso, estudos tem apontado que o uso de DNA *barcoding* é conhecido por fornecer resultados rápidos e confiáveis na identificação de diversas espécies de táxons diferentes (Coissac et al., 2016), como exemplo da família Trypanosomatidae (Hutchinson e Stevens, 2018). Assim, o estudo mostrou que o uso de DNA *barcoding* direcionados à região V7-V8 do gene 16S SSU rRNA em amostras de células conjuntivais foi viável, embora o mesmo *primer* tenha detectado maior número de PNH positivos em amostras de sangue (5,93% de positividade em amostras de suabes e 9,39% em amostras de sangue).

Quatorze animais foram positivos com os *primers* SSU561F/SSU561R (V7-V8) no sangue (14/149: 9,39%), e sete para as células conjuntivais (7/118: 5,93), sendo que quatro PNH foram positivos tanto no sangue como nos suabes com este mesmo *primer* (4/189: 2,11%), todos do CENP: PA02; PA03; PA04 e PA05, todos pertencentes a espécie *Ateles marginatus*. Com o uso de *primers* gerais (direcionados à família Trypanosomatidae), a maior sensibilidade do teste molecular ocorreu para as amostras de sangue quando comparado às amostras de células conjuntivais. Inadequações na metodologia do teste molecular a partir de suabes da conjuntiva podem ser responsáveis pelos diferentes resultados encontrados (sangue e suabe). Estudos apontam que amostras de qualidade adequada a partir do tecido de amostras de suabes de células conjuntivais é muito difícil de se obter, podendo tornar o procedimento molecular de difícil padronização (Rosales-Chilama et al., 2015).

Assim, para fins de diagnóstico, faz-se necessário uma maior padronização dos protocolos usando-se as células conjuntivais, principalmente devido a este material biológico ser uma alternativa que apresenta vantagens na colheita e armazenamento (Serenio et al., 2020).

Embora as amostras de sangue tenham se mostrado mais sensível no diagnóstico molecular com *primers* direcionados à família Trypanosomatidae, o mesmo não ocorreu com o uso de *primers* para a sequência do Mini-exon do gênero *Leishmania* spp. (FME/RME), uma vez que nenhuma amostra de sangue amplificou, enquanto que oito animais foram positivos quando pesquisadas nas células da conjuntiva (8/118: 6,77%). A falta de concordância dos resultados da cPCR das

amostras de sangue e suabes conjuntivais também foi observado por Geisweid e colaboradores (2013), que relataram pouca concordância nos resultados com esses mesmos materiais biológicos em cães, pois encontraram maior número de cães positivos no suabe conjuntival (sensibilidade de 78.4%) do que nas amostras de sangue. Estudos têm apontado que a sensibilidade do diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. em cães, com o uso de suabes conjuntivais está estritamente ligado ao protocolo utilizado durante a metodologia e é em torno de 43% a 95.6% (Strauss-Ayali et al., 2004; Ferreira et al., 2008; Pilatti et al., 2009; Leite et al., 2010; Lombardo et al., 2012).

Houve uma baixa concordância durante a pesquisa de *L. infantum* com os *primers* LCS1/LCS3, em que três amostras de sangue foram positivas (3/149: 2,01%) e quatro do suabe conjuntival (4/118: 3,38%). Apenas um PNH positivou em ambos os materiais biológicos (1/189: 0,52%), que se refere ao primata do zoológico de Salvador BA07 – *Sapajus Xanthosternos*, o qual também foi reagente no teste de RIFI (discutido anteriormente no tópico “5.2 Diagnóstico sorológico”). No trabalho de Geisweid e colaboradores (2013), amostras de cães que apresentaram títulos de anticorpos contra *L. infantum*, foram mais propensas a serem positivas durante a cPCR de suabes conjuntivais do que àquelas que tinham títulos de anticorpos negativos ou duvidosos.

Já a utilização de *primers* direcionados ao kDNA de *L. braziliensis* foram mais sensíveis na detecção do parasito a partir das amostras de sangue (6/149: 4,02%) do que nas amostras de suabe (3/118: 2,54%), sendo que nenhuma amostra positivou em ambos os materiais biológicos (sangue e suabe) com este *primer*.

A maior porcentagem de positividade para *L. braziliensis* atribuída às amostras de sangue desta pesquisa possivelmente pode ter ocorrido devido ao momento da coleta, durante uma alta parasitemia, em que os parasitos estavam presentes (em sua maioria) na circulação sanguínea e uma quantidade menor do DNA do parasito nos tecidos (Nakkash-Chmaisse et al., 2011; Santos, 2017), como exemplo da mucosa conjuntival do hospedeiro.

Das nove amostras que amplificaram o DNA de *L. braziliensis*, oito delas são de PNH do zoológico de Sorocaba. O município de Sorocaba é endêmico para leishmaniose tegumentar, e no local, já foram descritos focos endêmicos de *L.*

braziliensis em amostras humanas e caninas (Ferreira et al., 2015b). A nona amostra positiva para este parasita refere-se a um PNH do zoológico de Salvador, na Bahia. Este estado nordestino é conhecido por ser endêmico para LV, e estudos recentes também mostram focos endêmicos de *L. braziliensis* (Canário et al., 2019), corroborando com os achados do presente estudo.

Na América do Sul, as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são as principais causadoras de leishmaniose mucocutânea e cutânea, respectivamente. Laurenti e colaboradores (2014), mostraram que em primatas da espécie *Sapajus apella* infectados experimentalmente com estas duas espécies de leishmanias, *L. braziliensis* pôde ser detectada durante até 180 dias após a infecção, enquanto *L. amazonensis* foi detectada em até 120 dias após a infecção, demonstrando que *L. braziliensis* é detectada durante mais tempo quando comparada a *L. amazonensis*.

A presente pesquisa pelo DNA de *L. amazonensis* em amostras de sangue e em células da conjuntiva realizada em todos os locais amostrados, não revelaram nenhum PNH positivo nos testes moleculares e também na sorologia. No quadro 1 (do tópico “1.5 Leishmanioses em Primatas Não Humanos (PNH)”) desta tese, dos 29 trabalhos encontrados na literatura que relatam a infecção natural por diferentes espécies de *Leishmania* spp. em primatas não-humanos, apenas dois deles demonstram a infecção ocasionada por *L. amazonensis* (Lima et al., 2012; Martínez et al., 2020), revelando que embora os PNH possam se infectar com esta espécie de parasito, isso não é comumente relatado.

Os resultados do teste molecular de cPCR em amostras de sangue e em células conjuntivais, com o uso de todos os *primers* empregados na pesquisa, demonstraram que 39 (39/189: 20,63%) PNH amplificaram o DNA do parasito, 22 (22/149: 14,76%) foram positivos no sangue e 22 (22/118: 18,64%) no suabe conjuntival, sendo que cinco (05/39: 12,82%) animais positivaram em ambos os tipos de materiais biológicos (sangue e suabe). Com base nas porcentagens de positividade, os resultados a partir das amostras de células conjuntivais foram ligeiramente superior quando comparadas às amostras de sangue. Uma maior porcentagem de animais positivos também foi observada no trabalho de Lombardo e colaboradores (2011). Portanto, a utilização de suabes conjuntivais no diagnóstico de *Leishmania* spp. é uma alternativa válida, que tem como vantagem ser pouco invasiva, ocasionar menos

estresse ao animal e não requerer técnica de coleta especializada (Ferreira et al., 2013) podendo ser empregada até mesmo em amostras de animais silvestres.

Portanto, a investigação molecular com o uso da técnica de cPCR é uma importante ferramenta para estudos de rotina epidemiológica e, com os resultados deste estudo, recomenda-se o uso associado dos iniciadores direcionados à região V7-V8 de Trypanosomatidae, para o gene 18S rRNA de *L. infantum* e para o kDNA de *L. braziliensis*, a fim de aumentar a sensibilidade do teste, e também, a outras técnicas moleculares, como HRM e ao sequenciamento genético.

5.3.2 Caracterização molecular

Para caracterização molecular de *Leishmania* spp. das amostras positivas à cPCR, foram utilizados iniciadores para o genoma mitocondrial e nuclear de *Leishmania* (Lopes et al., 2016). Os *primers* que amplificam genes mitocondriais foram baseados no citocromo B (cytB) e para as sequências do gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII). Os *primers* direcionados às sequências codificadoras direcionado ao DNA nuclear foram para o citocromo C (cytC).

Nos tripanosomatídeos, o DNA mitocondrial é aquele que está presente no cinetoplasto (kDNA), representando cerca de 20 a 25% de todo o DNA da célula. As regiões conhecidas como maxicírculos, são correspondentes ao DNA mitocondrial dos eucariotos, que codificam todas as proteínas que são necessárias para a atividade mitocondrial. Já os minicírculos, são os codificadores de moléculas de RNAs-guias que são usadas durante as edições de transcritos dos maxicírculos (Simpson et al., 1987). O DNA mitocondrial apresenta uma alta taxa evolutiva, uma vez que a ocorrência de substituições de bases no DNA é bastante alta, comparada a do genoma nuclear (Sampaio, 2016). Dessa maneira, a taxa de evolução do DNA mitocondrial não se apresenta de forma homogênea entre seus diferentes genes. Isso faz com que alguns genes, com o passar do tempo, acumulem mutações mais rapidamente, enquanto outros, como exemplo do citocromo B, estão entre os mais conservados. Essa ausência de recombinações, somado a sua alta taxa evolutiva e a heterogeneidade entre seus genes, contribuem para que o DNA mitocondrial seja considerado um excelente marcador taxonômico e utilizados em estudos filogenéticos (Meyer, 1994).

Análises a partir de testes baseados em cPCR permite a identificação molecular de um agente quando são utilizados marcadores filogeneticamente conhecidos e esses pequenos fragmentos de DNA são amplificados (Tautz et al., 2003), tais como acontece com DNA *barcoding*, que é um “código de barras” nos genomas mitocondriais e nucleares do agente pesquisado (Hebert et al., 2003a; Marcili et al., 2014). Dessa maneira, na tentativa de elucidar a taxonomia na identificação de uma espécie, trabalhos recentes estão utilizando um sistema de identificação baseado no DNA com base nos genes mitocondriais. Hebert et al (2003b) propôs um sistema de código de barras do DNA baseando-se na diversidade existente na sequência da subunidade I da oxidase do citocromo c de animais. Divergências nas sequências desses genes permite a discriminação das espécies dentro de um mesmo grupo.

O uso de genes mitocondriais tem se tornado uma alternativa viável devido seu alto grau de conservação e estão sendo utilizados em estudos moleculares e filogenéticos uma vez que durante processos adaptativos, os genes mitocondriais não são afetados por não sofrerem múltiplas substituições nucleotídicas (Meyer, 1994).

Genes que codificam proteínas do citocromo são valiosos marcadores, podendo ser empregados em estudos moleculares na identificação de um organismo, uma vez que permitem reconstruir toda a história evolutiva de agentes infecciosos como no caso do gênero *Leishmania* (Ibrahim e Barker, 2001; Luyo-Acero et al, 2004; Lopes et al., 2016). Os citocromos são proteínas de membrana envolvidas principalmente no metabolismo energético da mitocôndria. Os genes que codificam a subunidade II da oxidase (coxII) são alvos que contém trechos conservados e que possuem baixo polimorfismo ancestral (de Souza, 2019).

Neste trabalho, das 22 amostras de sangue positivas na cPCR, 19 delas amplificaram com *primers* direcionados aos citocromos de *Leishmania*, sendo que 18 delas foram amplificadas para o gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII); cinco delas para o gene mitocondrial que codifica a proteína do citocromo B e apenas uma amplificou para o DNA nuclear do citocromo C.

A única amostra de sangue amplificada do DNA nuclear do citocromo C não foi positiva em nenhum outro citocromo deste trabalho. Tal fato sugere que essa região pode ser mais conservada em algumas espécies de *Leishmania* e não em

outras. Embora o gene CytC codifique um produto mitocondrial, ainda assim ele está localizado no gene nuclear do parasito (Rogers et al., 2011), portanto com este trabalho pudemos demonstrar que o uso de genes mitocondriais na pesquisa de citocromos de *Leishmania* são mais sensíveis (quando pesquisados em amostras de sangue) do que genes nucleares devido ao seu alto grau de conservação.

Além das amostras de sangue, 22 amostras de suabes conjuntivais amplificaram o DNA do parasito com pelo menos um dos *primers* empregados nesta pesquisa. Todas as 22 amostras também foram submetidas a cPCR para a caracterização molecular de *Leishmania* spp. utilizando os iniciadores direcionados aos citocromos (CytB, CytC e CytOxII).

Das 22, seis delas amplificaram citocromos de *Leishmania*, sendo que cinco delas foram amplificadas para o gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII); uma para o gene mitocondrial que codifica a proteína do citocromo B e duas amplificaram para o DNA nuclear do citocromo C. Apenas uma amostra do PNH do zoológico de Salvador (BA02- *Sapajus xanthosternos*) que amplificou nos três citocromos pesquisados.

Uma comparação dos resultados obtidos na pesquisa de citocromos de *Leishmania* com amostras de sangue e suabe, revelou que nas amostras de sangue, houve uma maior porcentagem de amplificação dos citocromos do que nos suabes conjuntivais (19 amostras amplificadas no sangue 19/22: 86,36% e seis amostras nos suabes 6/22: 27,27%). Portanto, os resultados deste trabalho evidenciam uma maior sensibilidade das amostras de sangue na pesquisa dos citocromos de *Leishmania* em PNH.

No total, 19 amostras de sangue amplificaram citocromos de *Leishmania* e seis no suabe conjuntival, sendo que duas amostras amplificaram o gene de citocromo da subunidade II da oxidase (coxII) tanto no sangue como no suabe, um primata de Ananindeua, Pará e um de Salvador, Bahia (PA05- *Ateles marginatus* e BA07 - *Sapajus xanthosternos*). Trabalhos que pesquisam citocromos de *Leishmania* em amostras de suabes conjuntivais de animais silvestres são escassos na literatura, portanto, estudos adicionais devem ser realizados para um melhor entendimento sobre a sensibilidade e especificidade do teste utilizando-se esse tipo de material biológico.

O uso de citocromos de *Leishmania* como alvo na detecção e identificação das espécies é importante. Um trabalho realizado no Equador conseguiu identificar as espécies de *Leishmania* (V.) *guyanensis*, L. (V.) *braziliensis*, L. (V.) *naiffi*, L. (V.) *lainsoni* e L. (L.) *mexicana*, sendo determinado as espécies mais dominantes e amplamente distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais da costa do Pacífico como L. (V.) *guyanensis* e L. (V.) *braziliensis*, respectivamente baseado no alvo do citocromo B de *Leishmania* (Kato et al., 2016).

Um outro estudo realizado no Peru, conseguiu identificar as espécies de *Leishmania* circulantes no país com base na homologia evolutiva com as sequências do gene CytB das cepas referências de *Leishmania*, alinhando as sequências depositadas no *GenBank* das cepas com gene CytB e as sequencias obtidas durante o estudo. Inferências filogenéticas foram criadas e a partir disso identificadas as espécies com maior circulação, sendo a espécie mais dominante *Leishmania* (V) *braziliensis*, seguida por L. (V.) *peruviana*, L. (V.) *guyanensis*, L. (V.) *lainsoni*, L. (V.) *shawii*, um híbrido de L. (V.) *braziliensis* e L. (V.) *peruviana*, e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. (Kato et al., 2019).

Alguns trabalhos identificam *Leishmania* de acordo com o gene mitocondrial conservado do CoxII (Simpson et al., 1982; Ramírez et al., 2011; Lopes et al., 2016), mostrando ser útil tanto na identificação do agente como também para compreender a história evolutiva baseada na filogenia. Dessa maneira, nesta pesquisa, foi realizado o sequenciamento genético das amostras positivas no CoxII e todas as 13 amostras sequenciadas com êxito nos resultados (12 a partir do sangue e uma pelo suabe conjuntival), retornaram similaridade com *L. infantum* (Nº de acesso LR697137.1; KU680822.1), sendo 94,13% a menor porcentagem e 99,82% a maior similaridade encontrada.

Com relação as inferências filogenéticas, àquelas que apresentaram porcentagens de similaridade com *L. infantum* inferiores a 99% permaneceram em ramos mais afastados da espécie *L. infantum* (Nº de acesso KF815207) utilizada na filogenia. Portanto, as sequências obtidas das amostras do Pará (PA03 - 98.77% de identidade *L. (L.) infantum* e PA04 - 98.42% de identidade *L. (L.) infantum*, ambos *Ateles marginatus*) ficaram aparentadas entre si e permaneceram em um clado com maior familiaridade com as espécies *L. mexicana* (Nº de acesso HQ586845.1) e *L. amazonensis* (Nº de acesso HQ586836.1). Esses resultados condizem com a

realidade no estado do Pará, o qual apresenta registros de casos de leishmaniose tegumentar (Silveira et al., 2002), inclusive ocasionada por *L. amazonensis* (Silveira et al., 2005).

As amostras de um PNH do zoológico de Salvador, BA47 (*Ateles paniscus*) e uma do CENP, PA02 (*Ateles marginatus*) apresentaram porcentagens de similaridade muito baixas com *L. infantum* no sequenciamento genético, com 94,64% e 95,45%, respectivamente. Dessa maneira, na árvore filogenética, essas amostras não permaneceram aparentadas com nenhuma espécie de *Leishmania* spp. e devido a baixa similaridade, também não se apresentaram no mesmo clado de *L. infantum*.

Além dessas, as amostras DF45 (sem identificação) e DF56 (*Ateles caraya*) embora apresentaram parentesco com *L. infantum* na filogenia, devido às porcentagens de similaridades encontradas (98,29% e 94,13%, respectivamente), permaneceram um pouco distante evolutivamente de *L. infantum*, mas com algum grau de parentesco.

A amostra de PNH do zoológico de Salvador BA07 (*Sapajus xanthosternos*) foi a que permaneceu mais próxima do clado de *L. infantum*. Essa amostra apresentou alta similaridade com essa espécie de protozoário, com 99,13%. Esse primata além de positivo na cPCR de sangue e suabe conjuntival, também apresentou anticorpos contra o parasito, o que condiz com os resultados da árvore filogenética. Além desse primata, todas as outras amostras referentes aos animais do zoológico de Salvador ficaram aparentadas entre si, revelando que a espécie do parasito encontrado predomina neste ambiente e que todos os primatas amostrados que testaram positivos, possivelmente estão infectados com o mesmo agente. Além disso, o município tem registros de casos de LV (Franke et al., 2002), fato que sustenta nossos resultados.

Dessa maneira, os resultados desta pesquisa demonstraram que o sequenciamento genético aliado à inferência filogenética se mostrou uma boa ferramenta de identificação da espécie do protozoário das amostras dos PNH, e que há uma circulação do protozoário em todos os ambientes amostrados nesta pesquisa (exceto nos animais de Curitiba).

Portanto, neste trabalho com amostras de primatas, verificou-se que o uso de trechos conservados do DNA é uma importante ferramenta para caracterização

molecular de um organismo, principalmente a partir de amostras de sangue, como no caso do uso de DNA *barcoding* que tem como alvo os citocromos de *Leishmania*, sendo os genes mitocondriais mais sensíveis na detecção do agente comparado aos genes nucleares.

5.3.3 Diagnóstico por HRM

Nesta pesquisa, inicialmente foi realizada uma pré-amplificação, a fim de se restringir a região de interesse e aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes. Todas as amostras de DNA dos PNH e das cepas padrão de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*) utilizadas como controles da reação foram diluídas em 1:10 evitando interpretações equívocas dos resultados.

A técnica de HRM vem sendo aprimorada nos últimos anos e usada na detecção e quantificação do DNA em diversas amostras biológicas e permite a discriminação de espécies ou cepas de agentes patogênicos por meio de análises dos produtos fluorescentes (Ririe et al., 1997; Pietilä et al., 2000; Mommert et al., 2001 e Logan et al., 2001).

Na literatura, não são abundantes os estudos que utilizam a técnica de HRM na identificação de agentes infecciosos e recentemente vem sendo empregada em trabalhos para discriminação de *Leishmania* (Nicolas et al., 2002; Nasereddin e Jaffe, 2010; Pita-Pereira et al., 2012; Bousslimi et al., 2012; Ceccarelli et al., 2014 e Doretto 2019). A identificação do agente causador das leishmanioses em locais onde mais de uma espécie é endêmica é de extrema importância para os estudos epidemiológicos e protocolos terapêuticos adequados (Van Griensven e Diro, 2019). Dessa forma, a técnica de HRM é útil na identificação do protozoário e toda análise é realizada pelo *software* do próprio equipamento, o que permite uma automatização dos resultados.

No trabalho de Hernández et al. (2014) foi possível a identificação de seis espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (*L. mexicana*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*) por meio da técnica molecular de HRM direcionado às regiões HSP70 e ITS-1. Além de identificar as espécies, foi determinado o limiar de detecção dos parasitos, mostrando que o método de HRM foi

capaz de detectar pelo menos 10 parasitos/mL, demonstrando ser um método rápido e eficaz na detecção de até mesmo poucos parasitos presentes.

Em um outro trabalho, foram analisadas amostras de pacientes humanos, cães naturalmente infectados, roedores e moscas. As amostras de pacientes incluíram sangue, esfregaço de pele, biópsia de pele e tecidos de órgãos. A análise de dissociação por HRM da região ITS-1 identificou as espécies *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. donovani* nas diferentes amostras estudadas, mostrando ser possível a detecção do parasito em apenas 2-4 cópias do gene ITS-1 em uma amostra de apenas 5µL do DNA (Talmi-Frank et al., 2010).

Neste trabalho, na técnica de HRM foram utilizados os *primers* para o gene HSP70 que amplificam o gene codificador de proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*) de *Leishmania* spp., já que ele caracteriza melhor os subgêneros de *Leishmania* do que outros genes que também são utilizados, como exemplo de marcadores como o kDNA que conseguem discriminar de uma forma menos eficiente entre os membros pertencentes ao mesmo subgênero (Pita-Pereira et al., 2012; Tsukayama et al., 2013).

Pela análise dos gráficos “Derivative Melt Curves” todas as amostras e cepas de *Leishmania* apresentaram apenas um pico na curva de *melting*. Além disso, as diferenças entre as T_m das cepas padrão teve 0,2 °C como menor valor, que está dentro do limite de precisão do equipamento o qual determina valores de T_m utilizando o protocolo padronizado por Zampieri (2019) que é de 0,2°C.

As análises dos *Amplicons* 1 e 2 sugerem que o *Amplicon* 1 (144pb) tem uma maior eficiência na amplificação de todas as espécies de *Leishmania*, porém essa eficiência é aumentada para as espécies do subgênero *Leishmania* (*Leishmania* (L.)). Já o *Amplicon* 2 (69pb), se mostra melhor na identificação de *Leishmanias* do subgênero *Viannia* (*Leishmania* (*Viannia*)), enquanto a amplificação do subgênero *Leishmania* é menos intensa ou até mesmo ausente neste *amplicon*. Além disso, quando uma amostra apresenta T_m no *amplicon* 1 compatível com *L. infantum*, mas no *amplicon* 2 essa T_m é compatível com *L. braziliensis*, é preciso analisar o CT (*Cycle Threshold*) que são valores que indicam a limiar do ciclo em que as amostras e cepas controles começam a amplificar (início das curvas em exponencial). Se o CT desta amostra for tardio no *amplicon* 2 é um forte indício que a amostra se trata de *L.*

infantum já que o *amplicon* 2 foi desenhado para uma melhor amplificação do subgênero *Viannia* (Zampieri, 2016; Doretto, 2019). Isso foi justamente o que aconteceu nesta pesquisa com a amostra BA37, um primata do zoológico de Salvador da espécie *Sapajus flavius* (macaco-prego-dourado).

Se a amostra apresentar Tm no *amplicon* 1 compatível com a Tm de *L. infantum* e no *amplicon* 2 uma Tm compatível com *L. braziliensis*, porém o valor do CT não se apresentar tardio, tem-se um forte indício que a amostra realmente é *L. braziliensis* uma vez que o *amplicon* 1 é ineficiente para o subgênero *Viannia* e o *amplicon* 2 é muito eficaz para esse subgênero. Isso foi justamente o que aconteceu com as amostras SP01, SP03, SP04, SP10 e DF36. A técnica de HRM identificou estas amostras como *L. braziliensis*, corroborando com os resultados da cPCR deste trabalho em que todas estas amostras amplificaram com *primers* espécie-específicos (*primers* B1 e B2) para *L. braziliensis*.

De acordo com Zampieri (2019), *L. amazonensis* e *L. mexicana* não são detectáveis pelo *amplicon* 2, portanto as amostras BA39, BA47, DF45 e DF54 que apresentaram Tm compatíveis com *L. infantum* no *amplicon* 1 e Tm compatíveis com *L. amazonensis* no *amplicon* 2 foram identificadas como *L. infantum*. Este resultado pode ser suportado pelo fato das amostras BA39 e BA47 que foram identificadas como *L. infantum* na técnica de HRM foram sequenciadas e retornaram com 99,30% e 94,64% respectivamente de similaridade com *L. infantum* (Nº acesso LR697137.1).

Ainda com relação ao trabalho de Zampieri (2019), foi criado um fluxo metodológico onde são propostas estratégias para detectar e identificar *Leishmania* por HRM. A imagem abaixo refere-se a uma adaptação do fluxo metodológico realizada a partir do trabalho de Zampieri (2019) (Figura 32):

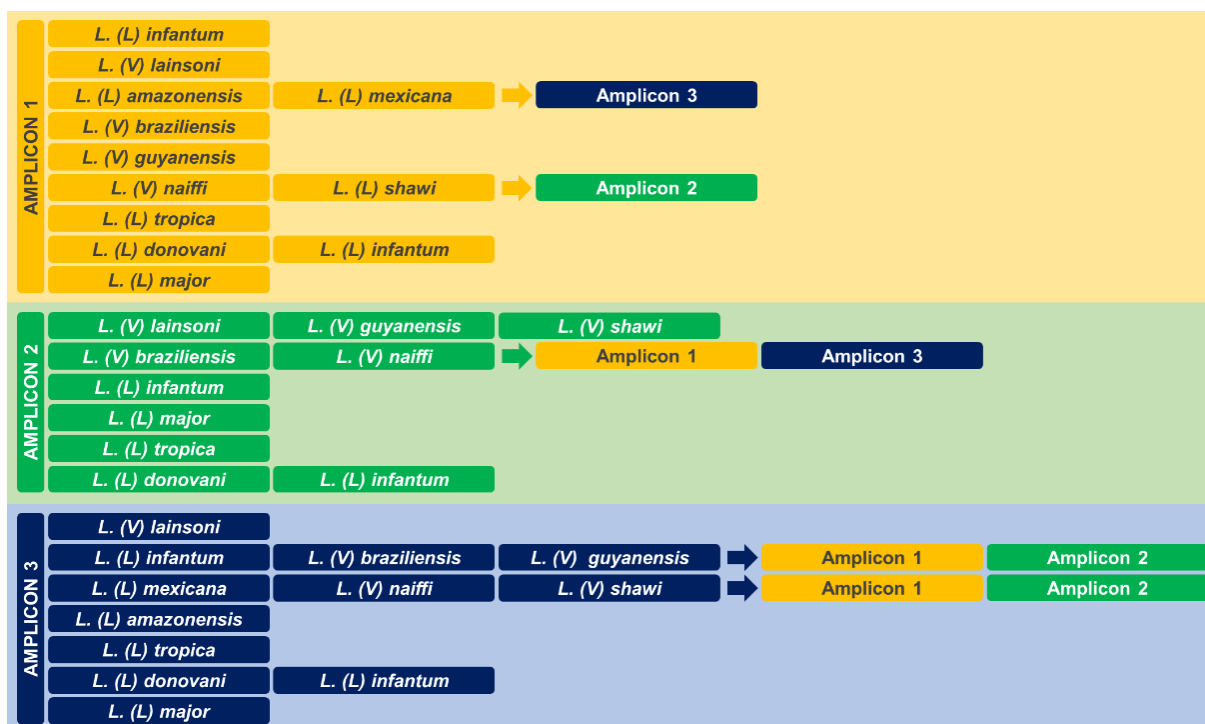


Figura 32: Fluxo metodológico com análise combinatória de perfis de dissociação dos três amplicons de HSP70. Fonte: arquivo pessoal adaptado de Zampieri (2019).

De acordo com a discriminação das espécies de *Leishmania* em todas as 16 amostras de PNH que obtiveram êxito na realização da HRM feito por meio da análise das T_m pelo *software*, todas elas também recebem a mesma identificação se forem analisadas por meio deste fluxo metodológico.

Outro parâmetro fornecido pelo *software* (v.3.0.1 (Life Technologies, USA)) é o “*Silhouette Score*” que apresenta valores distintamente das curvas de *melting* comparando cada amostra em relação às outras curvas (Rousseeuw, 1987). De acordo com o protocolo do QuantStudio™ e Real-Time PCR Systems Applied Biosystems™, para cada amostra, o *software* calcula um valor que pode variar de 0 a 100. Valores próximos de 100 indicam que a curva da amostra é muito semelhante a curva apresentada pelas cepas utilizadas como controles da reação. Portanto, valores ideais variam de 80 a 100. Neste estudo, todas as amostras apresentaram valores de *Silhouette Score* adequados, sendo o valor mais baixo de 82,50.

Os softwares que fornecem as curvas de *melting* nos testes de HRM o fazem baseado no intervalo de temperaturas diferentes. Variações nas T_m s das duplicatas das amostras podem levar a identificação equivocada do equipamento. Padronização de testes na bancada consideram um intervalo seguro de discriminação

entre as espécies de 0,25°C. Valores inferiores a este, podem resultar em uma identificação equívoca pelo equipamento/software (Zampieri, comunicação pessoal).

Nesta pesquisa, utilizou-se os *amplicons* 1 e 2. O *amplicon* 3 não mostrou curvas adequadas para as cepas de *Leishmania* usadas como controle da reação e ainda não está muito bem padronizado no laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz-sede Bauru, por isso não foi utilizado nesta pesquisa. Uma análise com os três *amplicons* poderia fornecer resultados mais robustos e uma confirmação maior na identificação da espécie de *Leishmania* das amostras, porém este é o primeiro trabalho na literatura utilizando os *amplicons* 1 e 2 em amostras de animais silvestres, mais precisamente, de PNH e com êxito nos resultados.

Embora a técnica de HRM seja uma excelente ferramenta, pois em uma mesma reação é possível detectar, discriminar e quantificar os parasitos, todos os parâmetros que o *software* oferece devem ser minuciosamente avaliados, o que exige uma capacidade de interpretação e uma análise comparativa entre as amostras, as cepas padrão de *Leishmania* utilizadas e o controle negativo. Assim, essa técnica deve ser considerada para discriminação de *Leishmania* principalmente nos estudos de diagnóstico e epidemiológicos até mesmo em amostras de animais silvestres.

5.3.4 Positividade geral entre as técnicas parasitológica, sorológica e molecular (sangue e suabe conjuntival) em todos os locais pesquisados

Com relação aos primatas positivos nas técnicas parasitológica, sorológica e molecular de sangue e células conjuntivais, a maior porcentagem de positividade ocorreu nas amostras provenientes do CENP (60%), localizado no estado do Pará. No Brasil, sete espécies de *Leishmania* são responsáveis por ocasionar a leishmaniose tegumentar no país (Brasil, 2017). O estado do Pará é o único estado brasileiro que já registrou a ocorrência dessas sete espécies, que são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) lindenbergi* (Carvalho et al., 2018), sendo a maioria ocasionada por espécies do subgênero *Viannia*. As áreas desmatadas no estado do Pará são as que concentram a maior número dos casos de leishmaniose tegumentar (Gonçalves et al., 2019), devido à fluxos migratórios e proliferação de áreas de risco resultantes do desmatamento (Cardoso et al., 2015).

Leishmaniose tegumentar possui uma relevância epidemiológica e é considerada uma doença endêmica na Amazônia (Confalonieri et al., 2014). Atualmente, a região nordeste do estado do Pará, na Amazônia Oriental Brasileira, tem registrado um aumento no número de casos da doença, sendo que no período de 2012 a 2016, este aumento foi de aproximadamente 42% em relação aos cinco anos anteriores, e este aumento significativo teve como causa o desmatamento, a urbanização desordenada e maiores áreas de pastagem para produção pecuária (Cardoso et al., 2015; Brasil, 2018b).

Além da LTA, a região Norte do Brasil também registra casos de leishmaniose visceral, sendo que nos anos de 2007 a 2014, foram registrados 5.491 casos de LV, e só no estado do Pará, foram registrados 2.495, representando 45,43% de todos os casos da região Norte e com a presença de casos autóctones (Reis et al., 2017). Na região amazônica brasileira, o estado do Amapá registrou o primeiro caso humano autóctone somente no ano de 2018 (Reis et al., 2017), enquanto o estado do Pará tem registros de casos autóctones humanos desde 1934 (Penna et al., 1934).

Na pesquisa, foi encontrado amastigotas de *Leishmania* spp. em 10% e o DNA de *Leishmania* spp. em 60% das amostras dos PNH do Pará, dados que corroboram com o estudo de Silva et al. (2017) que encontraram cães positivos para *L. infantum* no mesmo estado. Além de casos de LV no estado, estudos têm demonstrado uma alta prevalência de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis*, considerado o principal vetor da *L. infantum* (Santos et al, 2019). Além disso, *Lutzomyia longipalpis* foi encontrado em uma área florestal na sede do Instituto Evandro Chagas, no Município de Ananindeua, Estado do Pará (Souza et al., 2009); cidade em que as amostras de PNH foram coletadas. Portanto, se há insetos vetores e indivíduos infectados compartilhando o mesmo ambiente, pode-se afirmar que a circulação da infecção está ativa.

O segundo local deste estudo com relação à porcentagem de positividade para *Leishmania* spp. foi o zoológico de Sorocaba (35,41%). A região de Sorocaba é considerada endêmica para LTA, sendo considerada a segunda região mais endêmica do estado de São Paulo, onde são registrados em média 90 novos casos por ano (Gomes et al., 2017).

As lâminas de extensão sanguínea revelaram 4,3% de positividade dos primatas da região Sudeste do país. Dos cinco primatas positivos à cPCR, no sangue, quatro deles foram positivos com *primers* direcionados ao kDNA de *L. braziliensis*, sendo três da espécie *Alouatta caraya* e um *Ateles chamek*. Todos eles também amplificaram à técnica de HRM com curvas de dissociação semelhantes àquela exibida pela cepa controle de *L. braziliensis*. Além destes cinco primatas, um outro animal da espécie *Plecturocebus vieirai* apresentou amplificação na cPCR e HRM para *L. infantum*.

Já para as amostras de suabes conjuntivais, oito animais foram positivos (nenhum deles foi positivo tanto no sangue como no suabe). No trabalho de Alves-Martin (2017), a concordância entre os resultados moleculares de sangue e suabes conjuntivais foi baixa, demonstrando que nem sempre há concordância dos resultados destes testes.

Embora a eficiência da cPCR a partir de amostras de suabes pode ser alterada dependendo do método de extração empregado (Ferreira et al., 2008), na presente pesquisa com o PNH do zoológico de Sorocaba, foi detectado o DNA de *Leishmania* spp. em mais amostras provenientes das células da conjuntiva do que no sangue (oito e seis, respectivamente). Isso pode estar relacionado aos problemas de inibidores da PCR que as amostras de sangue constantemente apresentam (Nunes et al., 2007), enquanto que nas amostras de suabes conjuntivais ainda não foram relatados inibidores que podem interferir nos resultados.

Na região de Sorocaba já foram encontrados flebotomíneos das espécies *Lutzomyia whitmani*; *Lutzomyia intermedia*; *Lutzomyia fischeri* e *Lutzomyia migonei* (Taniguchi et al, 1991) os quais são responsáveis pela manutenção de *Leishmania* no local e realizando o repasto sanguíneo também nos animais silvestres, como foi relatado em nossa pesquisa.

O zoológico de Sorocaba está localizado em uma área urbana, portanto insetos vetores que circulam neste ambiente, podem facilmente realizar o repasto sanguíneo na população que mora no entorno, contribuindo com a epidemia do município. Seria de extrema importância a realização de um levantamento entomológico no zoológico de Sorocaba, com instalações de armadilhas de captura, pois o local pode estar contribuindo com a manutenção do ciclo de transmissão.

Embora 59 PNH do zoológico de Brasília foram amostrados no estudo, apenas em 20 deles (33,89%) foi fornecido amostras de sangue e em cinco deles (8,47%), amostras de suabes que foram analisadas no exame molecular de cPCR. A terceira maior porcentagem de positividade vieram destas amostras oriundas do zoológico de Brasília (30,5%). Devido aos quesitos burocráticos, a maioria das amostras destes animais foram apenas de soro (71,2%), portanto, o resultado em porcentagens do teste molecular pode ter sido subestimado.

Brasília, localizada no Distrito Federal registrou entre os anos de 2004 a 2015, 321 casos humanos de LV e 6.608 casos de LTA em humanos (Silva et al., 2017). Assim, este estudo foi de extrema importância, uma vez que foram encontrados primatas positivos para *L. infantum* no zoológico de Brasília e uma pesquisa realizada por Reis et al., (2019) neste mesmo ambiente do zoológico encontraram 17 flebotomíneos, sendo dois deles encontrados no interior do recinto de primatas, de quatro espécies diferentes: *Evandromyia sallesi*; *Lutzomyia longipalpis*; *Nyssomyia whitmani* e *Pintomyia* sp. (dos 17, dez deles eram fêmeas).

Além dos flebotomíneos, a pesquisa encontrou amostras de mamíferos positivos para *Leishmania*, incluindo PNH. Foram identificados quatro primatas positivos para *Leishmania*, sendo um da espécie *Leontopithecus chrysomelas* (Mico-leão-de-cara-dourada); um *Aotus nigriceps* (Macaco-da-noite); um *Lagothrix cana* (Macaco-barrigudo-cinzentos) e um *Chiropotes satanas* (Cuxiú-preto). Na presente pesquisa foi encontrado o DNA de *Leishmania* nas amostras de sangue de cinco PNH, das espécies: um *Aotus nigriceps* (Macaco-da-noite); dois *Saguinus bicolor* (Sauim-de-coleira); um *Alouatta caraya* (Bugio-preto) e um sem identificação. Apenas um primata da espécie *Aotus nigriceps* foi positivo em ambas as pesquisas, isso porque, trata-se do mesmo indivíduo. Este indivíduo (DF36) em nossa pesquisa foi positivo para *L. braziliensis*, e uma vez encontrado flebotomíneos da espécie *Nyssomyia whitmani* responsáveis pela transmissão da LTA, inclusive de *L. braziliensis* no Brasil (Silva et al., 2010) reforça o resultado desta espécie de *Leishmania* infectando este primata. As outras espécies positivas na presente pesquisa não fizeram parte amostral do trabalho de Reis et al. (2019) e as espécies positivas para eles, embora fizessem parte do grupo amostral deste estudo, foram investigados em indivíduos diferentes.

Neste trabalho, os resultados do teste molecular revelaram apenas amostras de sangue positivas (todos os suabes foram negativos), mas isso deve-se

ao fato de que apenas cinco primatas apresentaram amostras de suabes da conjuntiva inferior, portanto, os resultados poderiam ser diferentes se a análise envolvesse um número amostral semelhante destes diferentes materiais biológicos.

Durante visita técnica, foi observado que mamíferos silvestres que não fazem parte do plantel do zoológico de Brasília, vivem na mata ao entorno e são alimentados pelos tratadores do zoológico. Estes animais podem carrear agentes infecciosos para o interior do zoológico colocando em risco os animais que vivem neste ambiente (Apêndice I).

Dessa maneira, o estudo serve como um alerta para a circulação da infecção e, como na literatura os estudos em leishmanioses são escassos no DF, esta pesquisa contribuiu muito com a epidemiologia e prevendo a possível dispersão de casos da doença neste local.

O quarto local da pesquisa com maior porcentagem de PNH positivos nos testes parasitológico, sorológico e molecular (cPCR sangue e suabe) para *Leishmania* spp. foi o zoológico de Salvador (29,62%). O Nordeste brasileiro tem registrado um aumento no número de casos de LV devido a crescente urbanização e expansão geográfica com registros de casos da doença em locais onde tradicionalmente não ocorria (Alves e Bevilacqua, 2004). O estado da Bahia tem se tornando um local endêmico para a LV em um número elevado de municípios com casos da doença (Franke et al., 2002) além de um aumento do número de casos em cães da região metropolitana de Salvador (Barboza et al, 2006). A Bahia está entre os estados brasileiros com maiores taxas de incidência anual da LV (Brasil, 2019b).

Uma pesquisa realizada em fragmentos urbanos da floresta tropical na cidade de Salvador detectou primatas (*Callithrix* sp.) infectados com *Leishmania* spp., mesmo não apresentando nenhuma sintomatologia da doença, demonstrando a importância desses animais na manutenção do ciclo do parasito, principalmente em Salvador, local em que houve um crescente populacional desordenado onde a cidade englobou os remanescentes de floresta tropical e ciclos enzoóticos que antigamente se restringiam ao ambiente silvestre começaram cada vez mais a fazer parte dos ciclos urbanos (Trüeb et al., 2017).

Neste estudo, 14 animais foram positivos para *Leishmania* spp. no teste molecular, sete animais foram positivos com amostras de sangue e oito com amostras

de células conjuntivais (sendo um animal positivo tanto no sangue como no suabe). Dos 14 PNH de Salvador positivos para *Leishmania* spp., nove deles são da espécie *Sapajus xanthosternus*. Estes animais estão alocados na Ilha dos primatas, um local do zoológico reservado apenas para esta espécie. Esta ilha é um local aberto, sem a presença de muros ou grades. O que separa os animais do público visitante é um lago artificial que serve como uma barreira física para que os animais não saiam. O local é bem aberto, o que possibilita a livre circulação de insetos vetores e aves, como exemplo de patos, os quais defecam neste ambiente deixando-o com matéria orgânica (serapilheira), como mostrado no Apêndice J, propiciando um ambiente favorável aos flebotomíneos (Wijerathna et al., 2018).

Os outros cinco PNH positivos, das espécies *Sapajus flavius* (2), *Alouatta caraya* (2), e *Ateles paniscus* (1), estão alocados na ladeira dos primatas, onde os recintos estão bem próximos, quase que inseridos, no ambiente da mata (Zona da Mata/Mata Atlântica). Este ambiente é propício para o desenvolvimento de flebotomíneos, como exemplo *Lu. longipalpis*, que representa mais de 90% das espécies registradas nessa área litorânea, sendo que fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas por *Leishmania* foram encontradas nessa região de mata no estado (Souza et al., 2017), e *Lu. longipalpis* foi a espécie de flebotomíneo mais capturado na Bahia, com 48.083 espécimes entre julho de 2009 e dezembro de 2012, representando a espécie mais prevalente (Rodgers et al., 2019).

Este ambiente de mata atlântica apresenta índice pluviométrico elevado (1.800 e 3600 mm/ano) e uma média de temperatura de 25,2°C, e estes fatores contribuem na distribuição e manutenção de *Lutzomyia longipalpis*, o qual possui uma alta prevalência no município de Salvador (Rodgers et al., 2009). O estudo de Sherloock (1996) realizado na Bahia indicou que a densidade populacional de *Lu. longipalpis* aumenta após o final da estação chuvosa, contribuindo com os achados de Almeida, 2010; Almeida 2013 e Oliveira et al. (2003) que fizeram observações semelhantes na região central do Brasil.

Somado aos fatores ambientais, o zoológico de Salvador está inserido no ambiente urbano, portanto uma vez que o município tem a presença de insetos vetores e neste trabalho foram encontrados animais infectados com *L. infantum*, isso serve como um sinal de alerta para que outros animais do zoológico também estejam

albergando o parasito, podendo contribuir no ciclo de transmissão para os humanos (trabalhadores do local e público visitante) além da própria população.

O último local amostrado neste trabalho e que não apresentou nenhum animal positivo para *Leishmania* spp. em nenhuma das técnicas propostas, foi o zoológico de Curitiba, localizado na região Sul do País. Este achado corrobora com o trabalho de Constantino et al. (2016) que avaliaram a exposição de cães comunitários (que vivem em uma comunidade, estabelecendo laços de afeto e dependência embora não possua um responsável único) à *Leishmania* spp. em áreas públicas e com bastante circulação de pessoas na cidade de Curitiba. Os resultados mostraram que nenhum animal foi sororeagente a este parasito, refletindo a ausência desse patógeno em áreas urbanas do município de Curitiba.

A cidade de Curitiba é considerada não endêmica para leishmaniose, portanto o resultado deste estudo já era esperado e condiz com a realidade do município, revelando uma ausência histórica dos vetores e do parasito (Brasil, 2014), no entanto, deve-se estar sempre alerta com as questões epidemiológicas.

A região Sul do país não apresenta alarde à vigilância epidemiológica com relação aos casos de leishmanioses registrados, apenas atualmente vem experimentando um crescimento tímido dos casos nesta região do país. O primeiro caso de LV autóctone em humanos no estado do Paraná ocorreu em 2015 (Aen, 2015) e a primeira morte po LV no ano seguinte, em 2016 (Oliveira et al., 2001). O estado do Rio Grande do Sul registrou o primeiro caso autóctone da doença em 2008 e sua capital, Porto Alegre, apresentou o primeiro caso autóctone apenas no ano de 2016 (Mahmud et al., 2019).

Com relação ao ambiente onde os primatas da presente pesquisa estão alocados nas instituições amostradas, dos quatro zoológicos visitados, todos eles apresentam um espaço denominado “Ilha dos Primatas” (Apêndice K). Estes locais são bastante amplos e abertos. Por não apresentarem grades de proteção que são comumente utilizadas, estes ambientes permitem a livre circulação de insetos vetores, como exemplo dos flebotomíneos. Além disso, a vegetação natural ao redor desses espaços permite o acúmulo de serapilheira que é propício ao desenvolvimento de flebotomíneos.

Outros recintos embora apresentem grades de proteção (Apêndice L), o diâmetro dessas grades ainda assim permite a circulação de insetos vetores no interior deles, os quais podem infectar os animais que ali vivem. Seria importante que a equipe responsável por cada instituição amostrada colocasse armadilhas para captura de flebotomíneos, uma vez que neste trabalho foram encontrados PNH positivos para *Leishmania* spp..

5.4 Medidas de vigilância e controle das leishmanioses sob o contexto *One Health*

Diante dos resultados positivos que mostram a presença de parasitos responsáveis pelas leishmanioses visceral e tegumentar nas amostras biológicas dos PNH do estudo, indica-se medidas de vigilância que devem ser adotadas pelas equipes das instituições amostradas e recomenda-se atenção por parte das autoridades sobre os resultados obtidos, uma vez que evidência-se a participação e manutenção do ciclo de transmissão por estes animais (PNH).

Dessa forma, para que se tenha um controle efetivo dessas doenças, há a necessidade da compreensão do contexto de saúde única, visando a participação dos animais (domésticos e silvestres), do ser humano e do meio ambiente para o entendimento dos processos de saúde e doença para uma melhor efetividade na detecção, prevenção e controle das doenças infecciosas, contribuindo para o bem-estar comum. Assim, postula-se:

- Uma atenção por parte dos veterinários e da equipe aos sinais e sintomas da doença que os animais possam vir a apresentar;
- Pulverizar todas as instalações a cada três meses utilizando-se piretroide, que são compostos químicos sintético semelhantes às substâncias naturais produzidas por algumas flores e que servem como inseticidas contra vetores; além de outros produtos químicos de efeito residual, de acordo com a susceptibilidade dos flebotomíneos nas diferentes regiões brasileiras avaliadas.
- Utilizar vidro nas porções frontais e laterais dos recintos (facilitando a visualização do animal pelos visitantes), diminuindo às áreas por onde vetores flebotomíneos podem adentrar aos recintos e utilizar estes animais como fonte de repasto sanguíneo.

- Realizar uma constante vigilância epidemiológica não apenas em humanos e cães, mas levando em consideração a participação dos animais silvestres;
- Devido às intensas translocações de animais que ocorrem, principalmente entre zoológicos, e como não são realizados exames prévios que detectem *Leishmania* spp., indica-se quarentena a todos os animais translocados antes de reintroduzi-los em um novo ambiente, evitando a introdução da doença até mesmo em locais onde os casos de transmissão sejam considerados baixos;
- Aconselha-se a instalação de armadilhas para captura de flebotomíneos não apenas no interior dos zoológicos e centros de conservação, mas em toda a mata ao redor destes ambientes.

5.5 Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a manutenção dos parasitos responsáveis pela leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar em PNH que vivem em três Zoológicos e em um Centro de Pesquisa e Conservação avaliados neste estudo, sugerindo a participação destes animais no ciclo de transmissão destas doenças. Embora o papel epidemiológico destes animais deva ser melhor esclarecido, nesta pesquisa foram encontradas, durante exames parasitológicos direto de lâminas de extensão sanguínea, formas amastigotas do parasito, reforçando uma possível participação destes animais na manutenção do ciclo como fonte de repasto sanguíneo para os vetores flebotomíneos.

6 Principais dificuldades encontradas e limitações do trabalho

O primeiro contato com todos os locais da pesquisa (quatro zoológicos e um centro de conservação) ocorreu entre os meses de março e abril de 2016, em torno de quatro a cinco meses antes do início dessa pesquisa.

O presente trabalho de doutorado teve início em agosto de 2016 e devido alguns trâmites burocráticos de cada instituição, as primeiras amostras foram enviadas em maio de 2017. Porém muitas delas chegaram ao laboratório para começarem a ser analisadas entre os anos de 2017 e 2018 (período de dois a três anos do primeiro contato).

Devido à problemas administrativos; dificuldades de comunicação; mudanças políticas de cada instituição durante o período da pesquisa, algumas amostras foram enviadas apenas em novembro de 2019 (três anos após o primeiro contato).

Muitos formulários foram pedidos e todas as exigências foram respeitadas e cumpridas, porém ao passar do tempo, novas documentações que não tinham sido pedidas anteriormente eram reinvidicadas, pois passavam da validade (porém sempre eram enviadas no tempo estipulado, mas como as instituições demoravam a analisar, voltavam como se estivessem fora do prazo).

Embora animais de zoológicos representem uma alternativa viável e de extrema importância que se tenha estudos epidemiológicos, uma vez que estes já encontram-se contidos em cativeiro, o que facilita o manejo, algumas limitações com relação à colheita de material biológico devem ser consideradas. Por tratar de animais silvestres de centro de conservação e zoológicos, algumas medidas protetivas são maiores quando comparado à animais silvestres de vida livre. Portanto, a colheita de material biológico se torna limitada, não sendo possível a realização de exames mais minuciosos e precisos, como exemplos de punção de medula, de linfonodos e biópsia de tecidos. Dessa maneira, a pesquisa fez o possível para realização de técnicas laboratoriais nas amostras que permitiam o estudo, no sangue total; no soro e nas células conjuntivais por apresentarem procedimentos de colheita menos invasivos. Seria importante uma nova coleta para a realização de uma sorologia pareada. Porém, essa foi uma das limitações deste estudo, pois por depender do cronograma estabelecido por cada instituição não teria como garantir que todos os locais enviariam amostras dos mesmos primatas.

Além disso, seria de extrema importância um levantamento da população de flebotômíneos dos locais estudados (quatro zoológicos e um centro de conservação), porém para isso, seria necessário a colocação de armadilhas de captura. Como os locais amostrados são distantes uns dos outros e essas armadilhas requerem um monitoramento contínuo, seria necessário haver uma pessoa para esta tarefa, em cada um dos locais, que se comprometesse a fazer tais capturas e monitoramento. Portanto, embora importante que se tivesse esses dados para uma melhor discussão dos resultados obtidos, este não era um dos objetivos desta pesquisa, justamente por esta dificuldade previsível.

Conclusões

7 Conclusões

- Foi possível a identificação de *Leishmania* spp. em primatas não-humanos em três zoológicos e em um centro de conservação com o emprego de todas as técnicas propostas (parasitológica, sorológica e moleculares de sangue e suabe);
- Este é o primeiro trabalho que utiliza a técnica de HRM para discriminação de espécie de *Leishmania* em amostras de PNH, demonstrando que essa técnica pode ser uma alternativa ao sequenciamento genético;
- Este é o primeiro relato do uso de uma técnica não invasiva para pesquisa de *Leishmania* spp. com resultados positivos em PNH;
- Embora o diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* em exames parasitológicos de extensão sanguínea seja considerado um achado raro, neste trabalho foi possível encontrar formas amastigotas do protozoário, o que reforça o papel epidemiológico destes animais na manutenção do ciclo de transmissão. Assim, esta técnica parasitológica não deve ser menosprezada e pode ser facilmente realizável;
- A utilização do conjugado humano contra *Leishmania* spp. em amostras de PNH foi viável na detecção de anticorpos contra o agente;
- Os *primers* utilizados para pesquisa espécie-específico de *Leishmania* mostraram-se menos sensíveis do que o uso de *primers* gerais que amplificam a família Trypanosomatidae;
- Em amostras de sangue e células conjuntivais, para pesquisa de família Trypanosomatidae, recomenda-se o uso de *primers* direcionados a região V7 e V8 do rRNA, que se mostrou mais sensível em amostras silvestres do que *primers* que amplificam a região ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal;
- Não foi viável o uso de *primers* direcionados a sequência do mini-exon (DNA nuclear) para amplificação de gênero de *Leishmania* nas amostras de sangue dos PNH. Porém, a utilização destes mesmos iniciadores para as amostras de suabes conjuntivais mostrou-se mais sensível na detecção do DNA do protozoário;
- A caracterização molecular de *Leishmania* com alvos de citocromo (CytOxII) associada ao sequenciamento genético mostrou-se viável, retornando

melhores resultados do que os *primers* espécie-específicos, podendo ser reproduzida em amostras silvestres;

- A realização de inferências filogenéticas permitiu observar a familiaridade das amostras obtidas com sequências descritas para as espécies do gênero *Leishmania*;

- A análise de positividade geral (com todas as técnicas propostas) nas cinco regiões brasileiras estudadas revelou que o local com maior porcentagem de animais positivos foi o Centro Nacional de Primatas no Pará; seguido do Zoológico de Sorocaba, depois o Zoológico de Brasília e o Zoológico de Salvador. Por fim, todos os primatas cativos amostrados pertencentes ao zoológico de Curitiba foram negativos para *Leishmania* spp. com a utilização das técnicas diagnósticas propostas neste estudo.

Referências

Referências

- Abreu CR, Parpinelli AC, Lima RR, Dias LGGG, Pereira LF, Dias FGG. Description of six autochthonous cases of canine visceral leishmaniasis diagnosed in Pedregulho (São Paulo, Brazil). *Rev Bras Parasitol Vet.* 2015; 24(2): 216-219.
- Agência Estadual de Notícias do Paraná – AEN (2015). Paraná registra primeiro caso de leishmaniose visceral em humanos [online]. Curitiba, 2015. Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=84980>. Acesso em: 2 de março de 2020.
- Agra MCR, Costa PL, Duque AES, Soares ENL, Alves LC, Ramos RAN, de Carvalho GA. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an urban area of Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016; 49(6): 698-702.
- Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, Vargas Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1989; 84 (1): 19-28.
- Ahuja K, Vats A, Beg MA, Kariyawasam KKGDUL., Chaudhury A, Chatterjee M, Karunaweera ND, Selvapandiyan A. High resolution melting based method for rapid discriminatory diagnosis of co-infecting *Leptomonas seymouri* in *Leishmania donovani*-induced leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 2020; 75: 102047.
- Ala-Houhala M, Koukila-Kähkölä P, Antikainen J, Valve J, Kirveskari J, Anttila VJ. Clinical use of fungal PCR from deep tissue samples in the diagnosis of invasive fungal diseases: a retrospective observational study. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(3): 301-305.
- Alcover MM, Ribas A, Guillén MC, Berenguer D, Tomás-Pérez M, Riera C, Fisa R. Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area. *Prev. Vet. Med.* 2020; 175: 104874.
- Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SHE, Adler GH. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop.* 1998; 69:41-50.

Almeida PS, Minzão ER, Minzão L, Silva SR, Ferreira AD, Faccenda O, Andrade Filho JD. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, estado de Mato Grosso do Sul. Rev. Soc. Bra. Med.Trop. 2010; 43: 723–727.

Almeida PS, Sciamarelli A, Batista PM. Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108: 992–996.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012; 7: e35671.

Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cadernos de Saúde Pública. 2004; 20(1): 259-265.

Alves-Martin MF. Detecção de Tripanosomatídeos em Gatos Domésticos de Região Endêmica para Leishmaniose Visceral por Técnicas Parasitológicas, Sorológicas e Moleculares. [tese]. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2017.

Andrade SL. Leishmaniose tegumentar americana em área de ocupação recente na periferia da Cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz; 1997.

Andrade-Filho JD, Scholte RGC, Amaral ALG, Shimabukuro PHF, Carvalho OS, Caldeira RL. Occurrence and Probability Maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. J Med Entomol. 2017; 54(5): 1430-1434.

Antonini Y, Fernandes GW, Barata RA. Distribution of the assemblage of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) along an environmental gradient. Biota Neotrop 2017; 17(2): e20160253.

Araújo VAL, Boité MC, Cupolillo E, Jansen AM. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. Parasitology. 2013; 149(4): 455-460.

Arbeláez N, Moreno J, Murillo J, Montoya A, Robledo SM, Vélez A, Vélez ID. First Report of an Urban Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Cali, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2020; 102(2): 289-293.

Arcadi SA, Rago MV, Liotta DJ, Fernandez-Duque E, Salomón OD. *Leishmania* (*Viannia*) DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Vet Parasitol.* 2013; 193:256-9.

Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1981;76(3): 279–286.

Asfaram S, Fakhar M, Mirani N, Derakhshani-niya M, Valadan R, Hezarjaribi HZ, Emadi SN. HRM–PCR is an accurate and sensitive technique for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis as compared with conventional PCR. *Acta Parasitol.* 2019; <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00154-5>.

Azevedo TS, Lorenz C, Chiaravalloti-Neto F. Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2019; 52:1-5 e20190240.

Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent Antibody Test in American Visceral Leishmaniasis: Sensitivity and Specificity of Different Morphological forms of Two *Leishmania* Species. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32(3): 480 – 484.

Barboza DCPM, Gomes Neto CMB, Leal DC, Bittencourt DVV, Carneiro AJB, Souza BMPS, Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Franke CR. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 2006; 7(2): 152-163.

Barret TV, Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitol Today.* 1989; 5:255-7.

Barros ALC, Benites AP, Mateus NLF, Fernandes CES. Histopathological alterations in the reproductive tract of male dogs with Canine Visceral Leishmaniasis. *Semina: Ciências Agrárias.* 2019; 40(2): 665-675.

Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. bras. epidemiol.* 2004; 7 (3): 328-337.

- Beck A, Beck R, Kusak J, Gudan A, Martinkovic F, Artukovic B, Hohsteter M, Huber D, Marinculic A, Grabarevic Z. A case of visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia J. Wildl. Dis. 2008; 44: 451-456.
- Beltrame A, Guerriero M, Angheben A, Gobbi F, Requena-Mendez A, Zammarchi L, et al. Accuracy of parasitological and immunological tests for the screening of human schistosomiasis in immigrants and refugees from African countries: An approach with Latent Class Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11: e0005593.
- Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. Exp. Parasitol. 2017; 177: 93-97.
- Benvenga GU. Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no estado de São Paulo [dissertação]. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária; 2013.
- Bezerra JMT, Araújo VTM, Barbosa DS, Martins-Melo FR, Werneck GL, Carneiro M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2018. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12(9): e0006697.
- Bezerra JAB. Investigação da infecção por *Leishmania* spp. em felinos domésticos (*Felis catus*) na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. [Dissertação]. Universidade Federal Rural do Semi-árido; 2019.
- Binhazim AA, Githure JI, Muchemi GK, Reid GD. Isolation of *Leishmania major* from a naturally infected vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*) caught in Kiambu District, Kenya. Parasitology. 1987; 73: 1278-1279.
- Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. Am J Trop Med Hyg. 2012; 86(6):962-5.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic host of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97(3): 291–296.
- Brasil. Ministério da Saúde (2006). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.

Brasília: Editora do Ministério da Saúde:121 pp. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf. Acesso em: 03 de março de 2020.

Brasil. Ministério da Saúde (2010). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar cutânea. 3a ed. Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil. Ministério da Saúde (2014). Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Leishmaniose visceral - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Paraná [online]. Brasília. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvPR.def>. Acesso em 02 de março de 2020.

Brasil (2015a). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, grandes regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/20/LV-Casos.pdf>. Acesso em 04 de março de 2020.

Brasil (2015b). Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, grandes regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>. Acesso em: 04 de março de 2020.

Brasil. Ministério Da Saúde (2017). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde, 189 p., 2017. Acesso em: 06 de março de 2020. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>Brasil.

Brasil. Ministério Da Saúde (2017). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar, 191p., 2017. Acesso em: 06 de setembro de 2020. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/leish/manual17_lta_ms.pdf.

Brasil. Ministério da Saúde (2018a). Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção [online]. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 06 de março de 2020. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>.

Brasil. Ministério Da Saúde (2018b). Leishmaniose tegumentar americana - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil. Acesso em 29 de fevereiro de 2019. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr>.

Brasil. Ministério da Saúde (2019a). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018. Acesso em: 24 de abril de 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Casos.pdf>.

Brasil. Ministério da Saúde (2019b). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017. Acesso em 02 de março de 2020. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/LVCoeficiente%20de%20Incidencia.pdf>.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikaw EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 97(3): 291–296.

Broderson JR, Chapman jr WI, Hanson WI. Experimental Visceral Leishmaniasis in the Owl Monkey. Vet. Pathol. 1986; 23:293-302.

Bueno MG, Catão-Dias JL, Laroque PO, Vasconcellos SA, Ferreira Neto JS, Gennari SM, Ferreira F, Laurenti MD, Umezawa ES, Kesper N, Kirchgatter K, Guimarães LO, Pavanato HJ, Valença-Montenegro MM. Infectious Diseases in Free-Ranging Blonde Capuchins, *Sapajus flavius*, in Brazil. Int J Primatol. 2017; DOI 10.1007/s10764-017-9994-5.

Camargo ME. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med Trop São Paulo. 1966; 8: 227-234.

Cardoso RF, Melo BG, Pereira WMM, Palácios VRCM, Barbosa AV, Gonçalves NV. Socioepidemiologic and spatial study of american cutaneous leishmaniasis in a city of Pará. Rev Para Med. 2015; 29: 29-36.

Cardoso DT, de Souza DC, de Castro VN, Geiger SM, Barbosa DS. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis approaches in Southeastern Brazil. BMC Infect Dis. 2019; 19(318).

Canário A, Queiroz M, Cunha G, Cavalcante T, Riesz V, Sharma R, de Noronha A, Correia T, Barral-Netto M, Barral A, Khouri R, Boaventura V. Presence of parasite DNA in clinically unaffected nasal mucosa during cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Clin Microbiol Infect. 2019; 25: 15.e5e515.e7.

Carneiro LA, Silveira FT, Campos MB, Brígido MCO, Gomes CMC, Corbett CEP, Laurent MD. Susceptibility of *Cebus apella* monkey (primates: Cebidae) to experimental *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo. 2011; 53(1): 45-50.

Carneiro LA, Santos TV, Lima LCR, Ramos PKS, Campos MB, Silveira FT. First report on feline leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil. Vet. Parasitol.: Regional Studies and Reports. 2020; doi: 100360.

Carranza-Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, Bofil MIR, Rodrigues RMB, Silva AD, Cortez SMFC, Romero GAS. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. Ver Soc Bras Med Trop. 2010; 43(4): 396-399.

Carvalho BM, Santos TV, Barata IR, Lima JAN, Silveira FT, Vale MM, Ready PD, Rangel EF. Entomological surveys of *Lutzomyia flaviscutellata* and other vectors of cutaneous leishmaniasis in municipalities with records of *Leishmania amazonensis* within the Bragança region of Pará State, Brazil. J Vector Ecol. 2018; 43(1): 168-178.

Carvalho AV, Luz JGG, Rodrigues LD, Dias JVL, Fontes CJF. Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil. Res. Vet. Sci. 2019; 125: 205-211.

Cássia-Pires R, Boité MC, D'Andrea PS et al. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PloS Negl Trop Dis*. 2014; 8 (12): e3389.

Castro LS, Dorvala MEC, Matheus LD, Bednaski AV, Facco GG, Silveira M, Santos CF, Gontijo CMF, Oliveira APG, Ferreira EC. *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2020; doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.008>.

Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One*. 2014; 13:9(2): e88845 doi: 10.1371/journal.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, sem data). Leishmaniose Tegumentar Americana – Agente Etiológico. Acesso em: 08 de março de 2020. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/leish/lta_gve7ed_web_atual.pdf.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2008). Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos confirmados segundo DIR de infecção e ano de diagnóstico. Estado de São Paulo-período de 1998 a 2006. 2008. Acesso em: 04 de março de 2020. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/dados/LTA9806_SH.pdf.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2015). Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos confirmados segundo GVE de notificação e ano de diagnóstico e segundo GVE de residência e ano de diagnóstico. Estado de São Paulo-período de 2007 a 2015. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/dados/lta_gve_notres.pdf. Acesso em: 04 de março de 2020.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2020a). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo, 2014 a 2019. Acesso em: 09 de março de 2020. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas->

de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1419_lpi.pdf.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2020b). Leishmaniose Tegumentar Americana. Frequência de Casos Confirmados Segundo relação com o trabalho e ano de diagnóstico notificados no Estado de São Paulo - período de 2007 a 2020. Acesso em: 09 de março de 2020. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/lta/lta_avaliacao_epidemiologica.htm.

Cerbino Neto J, Werneck GL, Costa CH. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009; 25:1543-51.

Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalis D, Mylonakis M, Koutinas AF, Rallis T, Ikonopoulou J, Saridomichelakis MN. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Vet. Parasitol*. 2014; 202(3-4): 217-225.

Charron DF (Ed.), *Ecohealth Research in Practice: Innovative Applications of an Ecosystem Approach to Health*, Springer & International Development Research Centre, New York (2012).

Chomel BB, Belotto A, Meslin FX. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg. Infect. Dis*. 2007;13(1): 6–11.

Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1983; 32: 475-9.

Coelho-Neto GT, Rodrigues FMD, Menezes JGPB, Gama MEA, Gonçalves EGR, Silva AR, Laurenti MD, Silveira FT, Corbett CEP, Gomes CMC. Estudo epidemiológico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Buriticupu, pré-Amazônia maranhense. *Rev Cienc Saude*. 2012; 14(2):133-8.

Coissac E, Hollingsworth PM, Laverigne S, Taberlet P. From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. *Mol Ecol*. 2016; 25: 1423–1428.

Confalonieri UE, Margonari C, Quintão AF. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop.* 2014; 129: 33-41.

Constantino C, Pellizzaro M, de Paula EFE, Vieira TSWJ, Brandão APD, Ferreira F, Vieira RFC, Langoni H, Biondo AW. Serosurvey for *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Neospora caninum* in neighborhood dogs in Curitiba-Paraná, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal. 2016; 25(4): 504-510.

Conti RV, Moura Lane VF, Montebello L, Pinto Junior VL4. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *J Vector Borne Dis.* 2016; 53:99–104.

Costa PL, Dantas-Torres F, Silva FJ, Guimarães VCFV, Gaudêncio K, Brandão-Filho SP. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. *Acta Trop.* 2013; 126(2): 99-102.

Costa AT, Dias ES, Souza AGM, Silva FOL, Machado-Coelho GLL. Ecology of phlebotomine sand flies in an area of leishmaniasis occurrence in the Xakriabá Indigenous Reserve, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2019; 52: e20180474.

Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood.* 2000; 95(5): 1642-51.

Coura FM, Passos SKP, Pelegrino MOF, Leme FOP, Paz GF, Gontijo CMF, Costa-Val APC. Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2018; 27(4).

Cunningham AA, Daszak P, Wood JLN. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2017; 372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0167>.

Da Silva CJ, Mattos CB, Felipin KP, Silva HPJ, Cantanhêde LM, Porrozzi R, Medeiros JF, and Ferreira RGM. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Rondônia, Brazil, a region with no history of visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51(5):712-715.

Da Silva KR, Mendonça VRR, Nascimento LFM, Mendes-Souza AF, Pinho FA, Barral AMP, Cruz MSP. Scoring clinical signs can help diagnoses canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem Oswaldo Cruz*. 2017; 112(1): 53-62.

Da Trindade EL, Da Cruz AF, Tavares DB, Rodrigues DC, Martins HHS, Costa MLB, Lourenço VHB. Challenges for the control of human visceral leishmaniasis in Pará. *BJHR*. 2019; 2(6): 5488-5499.

David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Ther*. 2009; 22: 491-502.

D'Avila-Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Santos HLC, Morelli KA, Grybchuk-Ieremenko A, Duval L, Votýpka J, Yurchenko V, Grellier P, Lukeš J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 2015; 110: 956–965.

De Assis WA, Malta J, Pimenta PFP, Ramalho-Ortigão JM, Martins GF. The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Arthropod Struct Dev*. 2014; 43(5): 501-509.

De Bruijn MH e Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*. 1992; 52: 45-58.

Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989; 83:202–207.

Del Río L, Chitimia L, Cubas A, Victoriano I, De la Rúa P, Gerrikagoitia X, Barral M, Munoz-García CI, Goyena E, García-Martínez D, Fisa R, Riera C, Murcia L, Segovia M, Berriatua E. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev. Vet. Med*. 2014; 113: 430-435.

Dennis VA, Jr WLC, Hanson WL, Lujan R. *Leishmania donovani*: Clinical, hematologic and hepatic changes in squirrel monkeys (*saimiri sciureus*). *J. Parasit*. 1985; 71(5): 576-582.

Desjeux P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country and territory. WHO/LEISH/91.30. Geneva: World Health Organization.1991;47.

De Souza W, Silva R, Motta MC. M. Expanded repertoire of kinetoplast associated proteins and unique mitochondrial DNA arrangement of symbiont-bearing Trypanosomatids. Plos One. 2017; 12(11): e0187516.

De Souza RM. Filogenia dos genes que codificam as subunidades I e II da citocromo da oxidase de *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação]. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou – Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, Fritsch C, Giraudoux P, Le Roux F, Morand S, Paillard C, Pontier D, Sueur C, Voituren Y. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. Front. Vet. Sci.. 2018; 5:14. doi: 10.3389/fvets.2018.00014.

Dias AFLR, Almeida ABPF, Rodrigues JY, Nakazato L, Fujimori M, Sousa VRF. Cytological and molecular detection of *Leishmania* spp. in different biological tissues of dogs in areas endemic for visceral leishmaniasis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2019; 71(6): 2103-2106.

Dias RCR, Pasquali AKS, Thomaz-Soccol V, Pozzolo EM, Chiyo L, Alban SM, Fendrich RC, Almeida RAA, Ferreira FP, Caldart ET. Autochthonous canine visceral leishmaniasis cases occur in Paraná state since 2012: isolation and identification of *Leishmania infantum*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2020; 29(1): e009819.

Diotalle A, Buffi G, Ceccarelli M, Neitzke-Abreu HC, Gnutzmann LV, Lima Jr. MSC, Di Domenico A, Santi M, Magnani M, Galluzzi L. Real-time PCR to differentiate among *Leishmania* (*Viannia*) subgenus, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: Application on Brazilian clinical samples. Acta Trop. 2020; 201: 105178.

Doretto LY. Avaliação de *Leishmania* por meio da técnica de High Resolution Melting (HRM) em amostras provenientes de cães e suas implicações em saúde pública na região de Bauru-sp. [TCC]. Faculdade de ciências de Bauru; 2019.

Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1964; 13: 525-9.

Edvinsson B. Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* immunocompromised patients [tese]. Estocolmo: Karolinska Institutet; 2006.

el Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönián 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.

Escobar TA, Döwich G, Cantele LC, Góss GC, Porciúncula ML, Leite CT, Zuravski L, Duarte CA, Lubeck I. Applications of polymerase chain reaction for the detection of equine *Leishmania* sp. Infection. Semina: Ciências Agrárias. 2020; 41(1): 199-211.

Felipe IMA, Aquino DMC, Kuppinger O, Santos MDC, Rangel MES, Barbosa DS, Barral A, Werneck GL, Caldas AJM. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. Mem Oswaldo Cruz. 2011; 106: 207-211.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39:783-791.

Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, Takata CSA, Campaner M, Hamilton PB, Camargo EP, Teixeira MMG. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. Parasit Vectors. 2013; 6: 313.

Fernandes AP, Andrade HM, Melo MN, Coelho EAF, Avelar D, Gazzinelli RT. Leishmaniose visceral canina: novos antígenos para diagnóstico e vacinas. Ver. Saúde Públ SUS/MG. 2013; 1(1): 49-50.

Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN, Andrade ASR. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol. 2008; 152:257-63.

Ferreira SA, Almeida GG, Silva SO, Vogas GP, Fujiwara RT, Andrade ASR, Melo MN. Oral and ear swabs for canine Visceral Leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(4):e2150.

Ferreira EC, Cruz I, Cañavate C, Melo LA, Pereira AAS, Madeira FAM, Valério SAN, Cunha HM, Paglia AP. Mixed infection of *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. Vet. Res. 2015a; 11(71): 1-7.

Ferreira LT, Gomes AHS, Pereira-Chioccolla VL. Genotype characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from human and canine biopsies with american cutaneous leishmaniasis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2015b; 57(3): 257-262.

Ferreira SS. Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno. [Dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz. 2019:128f.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Vet. Record. 1995; 136: 514-516.

Figueira LP, Soares FV, Naif-Júnior RD, Vinhote-Silva AC, Silva SS, Espir TT, Naif MF, Gomes LHM, Moreira FRACN, Franco AMR. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. Acta Amaz. 2017; 47 (1): 47-52.

Franke CR, Staubach C, ZILLER M, Schluter H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. Trans. R. Soc., 2002; 96: 1-6.

Fricker-Hidalgo H, Bailly S, Brenier-Pinchart MP, Dard C, Jean D, Coston AL, Garnaud C, Pelloux H. How to estimate time of infection with *Toxoplasma gondii* in pregnant women. Use of specific IgG and IgM kinetics by 7 techniques on 691 sera. Diagn Microbiol Infect Dis. 2020; 96(4): 114987.

Freire ML. Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. [Dissertação]. Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2017: 101f.

Furtado T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328,1994.

Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotalleve A, Menotta M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2018; 11:273.

Geisweid K, Weber K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *Vet. J*. 2013; 198: 187-192.

Gicheru MM, Jeneby MM, Macharia JC, Carlsson HE, Suleman MA. Prevalence of antibodies and cell mediated immune response against *Leishmania major* in feral nonhuman primates from Kenya. *Acta Trop*. 2009; 109(2): 136-140.

Giudice E, Passantino A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs--Short communication. *Acta Vet Hung*. 2011; 59(2):205-13.

Golçalves NV, Miranda CSC, Costa RJF, Guedes JA, Matsumura ESS, Costa SBN, Noguchi SKT, Guimarães LHR, Oliveira RAC, Tavares LSA, Palácios VRCM, Xavier MB. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. *J Infect Dev Ctries*. 2019; 13(10):939-944.

Gomes AHS, Martines RB, Kanamura CT, Barbo MLP, Iglesias SD, Lauletta Lindoso JA, Pereira-Chiocola VL. American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. *Parasite Immunol*. 2017;39: e12423.

Gomes LB, Dias ES, Silva SCPF, Carvalho PCFB, Santos AGRC, Michalsky E, Lara-Silva FO, Souza AGM, Fortes-Dias CL, Morais MHF, Nicolino RR, Soares DFM. Eco-epidemiological study on sandflies and environmental aspects related to the transmission of leishmaniasis in a municipality of Minas Gerais, Brazil, 2015–2016. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2019; 71(6): 1805-1814.

Gontijo B, Carvalho MDR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc Bras Med. Trop*. 2003; 36(1):71-80.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol*. 2004; 7 (3): 338-349.

Goodman M, Porter CA, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J, Gunnell G, Groves CP. Toward a Phylogenetic Classification of Primates Based on DNA Evidence Complemented by Fossil Evidence. *Mol. Phylogenetics Evol.* 1998; 9(3): 585-598.

Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(5):664-674.

Gradoni L, Gramiccia M. Leishmaniosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Office International des Epizooties, Paris. 2008; 1(6): 240–250.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *IJPYBT.* 2005; 35: 1169-1180.

Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.* 2011; 181: 23-30.

Guerra JAO, Jéfferson Augusto Santana Ribeiro JASR, Coelho LIARCC, Barbosa MG, MG. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 2006; 22 (11): 2319-2327.

Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AIF, Rodrigues EHG, Brandão Filho SP. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(1): 66-70.

Guiraldi LM. Pesquisa de tipanomatídeos em primatas de cativeiro do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo [dissertação]. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2016.

Gushi LT. Estrutura populacional de *Lutzomyia longipalpis* através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12s de DNA mitocondrial [Dissertação] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2008.

Hamad I, Forestier CL, Peeters M, Delaporte E, Raoult D, Bittar F. Wild Gorillas as a Potential Reservoir of *Leishmania major*. *J Infect Dis.* 2015; 211: 267-273.

- Hampton JO, Robertson H, Adams PJ, Hyndman TH, Collins T. An animal welfare assessment framework for helicopter darting: a case study with a newly developed method for feral horses. *Wildl Res.* 2016; 43(5): 429–437.
- Harrison S, Kivuti-Bitok L, Macmillan A, Priest P. EcoHealth and One Health: A theory-focused review in response to calls for convergence. *Environ. Int.* 2019; 132: 105058.
- Hawash YA, Ismail KA, Abdel-Wahab MM, Khalifa M. Diagnosis, Treatment and Clinical Features of Cutaneous Leishmaniasis in Saudi Arabia. *Korean J Parasitol.* 2018; 56(3): 229-236.
- Headley SA, Pimentel LA, de Amorim IFG, Amude AM, Viana NE, Muraro LS, Tafuri WL, Santos MD. Immunohistochemical characterization of cutaneous leishmaniasis in cats from Central-west Brazil. *Vet. Parasitol. Reg.* 2019; 17: 100290.
- Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci.* 2003a; 270 Suppl 1: S96-9.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 2003b; 270:313–322.
- Hernandez C, Alvarez C, Gonzalez C, Ayala MS, Leon CM, Ramirez JD. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit. Vectors.* 2014; 7:501.
- Herrer A, Christensen HA, Beumer RJ. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. *Am J. Trop Med Hyg.* 1973; 22: 585-591.
- Herrer A, Christensen HA. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama III. Endemic persistence of the disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1976; 25: 54-58.
- Herrera G, Castillo A, Ayala MS, Flórez C, Cantillo-Barraza O, Ramirez JD. Evaluation of four rapid diagnostic tests for canine and human visceral Leishmaniasis in Colombia. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(747).
- Hijawi KJF, Hijawi NS, Ibbini JH. Detection, genotyping, and phylogenetic analysis of *Leishmania* isolates collected from infected Jordanian residents and Syrian refugees who suffered from cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 2019; 118: 793–805.

Hosseini-Safa A, Mohebbali M, Hajjarian H, Akhoundi B, Zarei Z, Arzamani K, Davari A. High resolution melting analysis as an accurate method for identifying *Leishmania infantum* in canine serum samples. J Vector Borne Dis. 2018; 55:315-20.

Hutchinson R, Stevens JR. Barcoding in trypanosomes. Parasitology. 2018; 145: 563–573.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004). Mapa de Biomas e de Vegetação. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acesso em: 04 de março de 2020.

Ibrahim ME, Barker DC. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. Infect Genet Evol. 2001; 1:61-8.

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Vet. parasitol. 2003; 113: 99-103.

Instituto Evandro Chagas (IEC, 2019). Pará é o 3º estado em casos de leishmaniose visceral. Acesso em: 08 de março de 2020. Disponível em: https://www.iec.gov.br/wp-content/uploads/2019/09/08agosto2019_portal_orm_o_liberal_online.pdf.

John SWM, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. Nucleic Acids Res. 1991; 19(2):408.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. Nature. 2008; 451:990–4.

Jusi MM, Starke-Buzetti WA, Oliveira TM, Tenório MS, Sousa LO, Machado RZ, Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. In captive wild animals from Ilha Solteira, Sp, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011; 20(3):219-222.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the Host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(8): 604-15.

Kardjadj M, Ben-Mahdi MH. Epidemiology of dog-mediated zoonotic diseases in Algeria: a *One Health* control approach. NMNI. 2019; 28: 17-20.

Kato H, Cáceres AG, Seki C, García CRS, Mauricci CH, Martínez SCC, Paico DM, Muniz JLC, Rivera LDT, Briones ZIV, Quincho SG, Jayo GLS, Villafuerte ET, Estrada CML, Arias FR, Passara FS, Llerena NR, Kubo M, Tabbabi A, Yamamoto DS, Hashiguchi Y. Further insight into the geographic distribution of *Leishmania* species in Peru by cytochrome b and mannose phosphate isomerase gene analyses. PLoS Negl Trop Dis 13(6): e0007496. <https://doi.org/10.1371/journal>.

Kato H, Gomez EA, Martini-Robles L, Muzzio J, Velez L, Calvopiña M, Romero-Alvarez D, Mimori T, Uezato H, Hashiguchi Y. Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jul; 10(7): e0004844.

Khadangi F, Yassi M, Kerachian MA. Review: Diagnostic accuracy of PCR - based detection tests for *Helicobacter Pylori* in stool samples. Helicobacter. 2017;22: e12444.

Krause PJ, Telford III S, Spielman A, Ryan R, Magera J, Rajan TV, Christianson D, Alberghini TV, Bow L, Persing D. Comparison of PCR with Blood Smear and Inoculation of Small Animals for Diagnosis of *Babesia microti* Parasitemia. J. Clin. Microbiol. 1996; 2791–2794.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönián G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. PLoS Negl. Trop. Dis. 2011; 5: p. e 1155.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 2018; 35(6):1547-1549.

Lahiri DK, Numberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res. 1991; 19(19):5444.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology (Peters W. & Killick-Kendrick R. eds). Academic Press Inc., London. 1987; 1: 1-120.

Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Sacawa EAY, Souza AA, Silveira FT. Isolation of *Leishmania* from monkeys in the Amazon region of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988; 82: 132.

Lainson R, Braga RR, de Souza AAA, Pova MM, Ishikawa EAY, Silveira FT. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. Ann Parasitol Hum Comp. 1989; 64: 200-207.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAI. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Mem.Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89:435-443.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* Species. In: Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections, ed. FEG Cox. 1998; 242-266.

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

Laskay T, Zandbergen GV, Solbach W. Neutrophil granulocytes – Trojanhorses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? Trends Microbiol. 2003; 11(5): 210-214.

Laurenti MD. Correlation between parasitological and serological diagnosis in canine american visceral leishmaniasis. Bepa. 2009; 6(67):13-23.

Laurenti MD, Passero LFD, Tomokane TY, Franceschini FC, Rocha MC, Gomes CMC, Corbett CEP, Silveira FT. Dynamic of the Cellular Immune Response at the Dermal Site of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Leishmania (V.) braziliensis* Infection in *Sapajus apella* Primate. Biomed Res. Int. 2014; ID 134236, 8 pages.

Lebel J. Health An ecosystem approach. IDRC, Ottawa, Canada. 2003.

Leite RS, Ferreira A, Ituassu LT, Melo MN, de Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Vet. Parasitol. 2010; 170: 201-206.

Levy E, Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Polizopoulou ZS, Psychogios V, Koutinas AF. Nasal and oral masses in a dog. Vet Clin Pathol. 2006; 35(1): 115-118.

Lima Jr MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009; 42(3): 303-308.

Lima VM, Santiago ME, Sanches LC, Lima BD. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. J Zoo Wildl Med. 2012; 43(4):943-5.

Lodh N, Mwansa JCL, Mutengo MM, Shiff CJ. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma* [corrected] *mansoni* infection from filtered urine in Zambia. Am J Trop Med Hyg. 2013; 89: 46–50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0104> PMID: 23716406.

Logan JMJ, Edwards KJ, Saunders NA, Stanley J. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2227–2232.

Lombardi MC, Turchetti AP, Tinoco HP, Pessanha AT, Soave SA, Malta MCC, Paixão TA, Santos RL. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. Pesqui Vet Bras. 2014; 34(12):1243-6.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Caprì A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Vet. Parasitol. 2011; 184(1): 10-17.

Longoni SS, Marin C, Sauri-Arceo CH, López-Céspedes A, Rodríguez-Vivas R.I, Villegas N, Escobedo-Ortegón J, Barrera-Pérez MA, Bolio-Gonzales ME, Sánchez-Moreno M. An Iron-Superoxide Dismutase Antigen-Based Serological Screening of Dogs Indicates Their Potential Role in the Transmission of Cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, México. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011; 11(7): 815-21.

Lopes EG, Geraldo Jr. CA, Marcili A, Silva RD, Keid LB, Oliveira TMFS, Soares RM. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo. 2016; 58(41):1-7.

Lucheis SB, Da silva AV, Araújo JRJP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2005; 11(4): 492-509.

Luciano MR, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Cross reaction evaluation of *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* antigens in dogs' serologic response by indirect immunofluorescence test (IIF). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2009; 46(3): 181-187.

Luppi MM, Malta MC, Silva TM, Silva FL, Motta RO, Miranda I, Ecco R, Santos RL. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet. Parasitol. 2008; 155: 146-151.

Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, Gomez-Landires E, Hashiguchi Y, Nonaka S. Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. Parasitology. 2004; 128: 483-491.

Luz JGG, Carvalho AG, Naves DB, Dias JVL, Fontes CJF. Are backyard characteristics relevant factors for the occurrence of human visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2019; 00: 1–8.

Mahmud IC, Piassini LAS, Motta F, Behar PRP, Souza GD. Epidemiological aspects of the first human autochthonous visceral leishmaniosis cases in Porto Alegre, Brazil. Braz J Infect Dis. 2019; 23(2): 124-129.

Malta MCC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira ALS, Costa EA, Santos RL. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. Vet Parasitol. 2010; 169: 193-197.

Mandell MA, Beverley SM. Continual renewal and replication of persistent *Leishmania major* parasites in concomitantly immune hosts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017; 114(5):801-810.

Mansueto P, Pepe I, Seidita A, Scozzari F, Vitale G, Arcoleo F, Elvira I, Cillari E, Rini GB, Napoli N, Di Rosa S, Mansueto S, Di Fede G. Significance of persistence of antibodies against *Leishmania infantum* in sicilian patients affected by acute visceral leishmaniasis. Clin Exp Med. 2012; 12: 127-132.

Manzillo VF, Piantedosi D, Cortese L. Detection of *Leishmania infantum* in canine peripheral blood. Vet. Rec. 2005; 156:151-152.

Marcili A, Sperança MA, da Costa AP, Madeira M de F, Soares HS, Sanches C de O, et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid *barcoding* (SSU rDNA) and gGAPDH genes: taxonomic revision of *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi* in South America. Infect Genet Evol. 2014; 25:44-51.

Marcondes JS, Feitosa FLF, Ikeda-Garcia FA, Lima VMF, Perri SHV, Feitosa MM. Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infetados por *Leishmania chagasi*. Rev Bras Parasitol Vet. 2006; 13(1): 20-24.

Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. Braz J Vet Res Anim Sci. 2013; 50: 341-52.

Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2003; 46:115-124.

Markle WH, Makhoul K. Cutaneous Leishmaniasis: recognition and treatment. American Family Physician. 2004; 69(6): 1455-1460.

Martínez MF, Kowalewskib MM, Giuliania MG, Acardi AS, Salomón OD. Molecular identification of *Leishmania* in free-ranging black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. Acta Trop. 2020; doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105534>.

Martins-Melo FR, Carneiro M, RamosJr AN, Heukelbach J, Ribeiro ALP, Werneck GL. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12: e0006559.

Medkour H, Davoust B, Levasseur A, Mediannikov O. Molecular Evidence of *Leishmania infantum* and *Leishmania guyanensis* in Red Howler Monkey (*Alouatta seniculus*) from French Guiana. Vector Borne Zoonotic Dis. 2019; DOI: 10.1089/vbz.2019.2459.

Meyer A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends Ecol Evol.* 1994; 9:278-80.

Mimore T, Sasaki J, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S, Hashiguchi Y, Furuya M, Saya H. Rapid identification of *Leishmania* species from formalina-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene.* 1998; 179-186.

Ministério da Saúde (MS, 2016). Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. Acesso em: 08 de março de 2020. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>.

Miranda DEO, Sales KGS, Faustino MAG, Alves LC, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F, de Carvalho, GA. Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. *Acta Trop.* 2015; 146: 89-94.

Miró G, Troyano A, Montoya A, Fariñas F, Fermín ML, Flores L, Rojo C, Checa R, Gálvez R, Marino V, Fragío C, Martínez-Nevado E. First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. *Parasit Vectors.* 2018; 11: 186.

Mommert S, Gutzmer R, Kapp A, Werfel T. Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR product. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 2663–2667.

Mondal D, Bern C, Ghosh D, Rashid M, Molina R, Chowdhury R, Nath R, Ghosh P, Chapman LAC, Alim A, Bilbe G, Alvar J. Quantifying the Infectiousness of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Toward Sand Flies. *Clin Infect Dis.* 2019; 69(2):251-258.

Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, Laskay T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* 2001; 190(1-2): 73-6.

Nakkash-Chmairie H, Makki R, Nahhas G, Knio K, Nuwayri-Salti N. Detection of *Leishmania* parasites in the blood of patients with isolated cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Infect. Dis.* 2011; 15(7): e491–e494.

Nardoni S, Gramiccia M, Petragli R, Ariti G, Papini R, Mancianti F. Detection of *Leishmania infantum* by cytocentrifugation in peripheral blood from *Leishmania* positive PCR dogs. *Revue Méd. Vét.* 2012; 163(10): 465-468.

Narvajas IM, Alba Díaz, Bassegoda O, Carpio A, Fuster C, Valls ME, Alvarez-Martínez MJ, García-Vidal C, Soriano A, Martínez JA, Ambrosioni J. Acute liver failure due to visceral leishmaniasis in Barcelona: a case report. *BMC Infect. Diseases.* 2019; 19(874).

Navea-Pérez HM, Díaz-Sáez V, Corpas-López V, Merino-Espinosa G, Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitol. Res.* 2015; 114: 2363–2370.

Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid Diagnosis of Old World Leishmaniasis by High-Resolution Melting Analysis of the 7SL RNA Gene. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(6): 2240–2242.

Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 2000.

Neto OJS, Duarte SC, Costa HX, Linhares GFC. Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.* 2012; 21(3):304-307.

Nicolas L, Milon G, Prina E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J. Microbiol. Methods.* 2002; 51: 295–299.

Noyes AR, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herreri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996; 80:119-123.

Noyes HÁ, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. Nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol Parasites.* 1999; 29: 331-339.

Nunes CM, Dias AKK, Gottardi FP, De Paula HB, De Azevedo MAA, De Lima VMF, Garcia JF. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2007; 16(1): 5-9.

Nunn, CL, Altizer S. The Global Mammal Parasite Database: an online resource for infectious disease records in wild primates. *Evol. Anthropol.* 2005; 14:1.

Oikonomidis IL, Tsouloufi TK, Mylonakis EM, Psalla D, Soubasis N, Rallis T, Kritsepi-Konstantinou M. Circulating and bone marrow myeloid cells containing *Leishmania* amastigotes in a case of advanced canine leishmaniosis. *J Vet Diagn Invest.* 2019; 31(5):726-731.

Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cadernos de Saúde Pública.* 2003; 19:933–944.

Oliveira AM, Vieira CP, Dibo MR, Guirado MM, Rodas LA, Chiaravalloti-Neto F. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. *Acta Trop.* 2016; 164: 233-42.

Oliveira AR, Pinheiro GRG, Tinoco HP, Loyola ME, Coelho CM, Dias SE, Monteiro EM, Silva FOL, Pessanha AT, Souza AGM, Pereira NCL, Gontijo NF, Fujiwara RT, Paixão TA, Santos RL. Competence of non-human primates to transmit *Leishmania infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 17;13(4): e0007313.

Ortega-García MV, Salguero FJ, Rodríguez-Bertos A, Moreno I, García N, García-Seco T, Torre GL, Domínguez L, Domínguez M. A pathological study of *Leishmania infantum* natural infection in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66(6): 2474-2481.

Özbilgin A. Are Medical Laboratories Ready for the Diagnosis of Parasitic Diseases? *JIFCC.* 2018; 171-174.

Paixão-Marques MS, Alves-Martin MF, Guiraldi LM, Santos WJ, Lemos FA, Sánchez GP, Richini-Pereira VB, Lucheis SB. First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2019; 1: 1-3.

Paiz LM, Fornazari F, Menozzi BD, Oliveira GC, Coiro CJ, Teixeira CR, DA Silva VMC, Donalisio MR, Langoni H. Serological evidence of infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Synonym: *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*) in free-ranging

wild mammals in a nonendemic region of the state of São Paulo, Brazil. Vector-Borne Zoonot. Dis. 2015; 15(11): 667-673.

Paiz LM, Motoie G, Richini-Pereira VB, Langoni H, Menozzi BD, Tolezano JE, Donalisio MR. Antibodies and Molecular Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in Samples of Free-Ranging Marmosets (Primates: Callitrichidae: *Callithrix* spp.) in an Area of Canine Visceral Leishmaniasis in Southeastern Brazil. Vector-Borne Zoonot. Dis. 2019; 19(4):249-254.

Palatnik-de-Sousa CB e Day MJ. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. Parasite. Vectors. 2011; 4(197): doi.org/10.1186/1756-3305-4-197.

Pan-American Health Organization (PAHO, 2017). Informe Epidemiológico das Américas Informe de Leishmanioses N° 5 – Abril de 2017. Leishmanioses. Acesso em: 08 de março de 2020. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34113/informe_leishmanioses_5_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Pan-American Health Organization (PAHO, 2019a). Manual de procedimientos para vigilancia y control de las Leishmaniasis em las Américas. Acesso em: 06 de setembro de 2020. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf.

Pan-American Health Organization (PAHO, 2019b). Leishmanioses, informe epidemiológico das Américas. Informe epidemiológico N°8 – dezembro de 2019. Acesso em: 24 de abril de 2020. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Paniz MAE, Colmenares GA, Mendoza PY, Hernández-Pereira CE, Medina C, Vargas F, Sandoval D, Agüero J, Román D, Forlano-Riera M, Salas Y, Peraza M, Romero P, Aldana F, Castillo T, Santeliz S, Perez G, Suarez-Alvarado MJ, Morales-Panza RJ, Kato H. Autochthonous cutaneous leishmaniasis in urban domestic animals (*Felis catus* / *Canis lupus familiaris*) from central-western Venezuela. Acta Trop. 2019; 191: 252-260.

Paz GS, Colhado BS, Anton MM, Rocha KS, da Silva DB, de Moraes CCG, Lucheis SB, Langoni H. Infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* em cães do estado do Pará. Ciênc. anim. bras. 2019; 20: e33566.

Pedras MJ, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47(3): 477-485.

Penna HA. Leishmaniose Visceral no Brasil. Bras Med. 1934; 48:949–50.

Pessoa-E-Silva R, Vaitkevicius-Antão V, Andrade TAS, Silva ACO, Oliveira GA, Trajano-Silva LAM, Nakasone EKN, de Paiva-Cavalcanti M. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems. Exp Parasitol. 2019; 199: 9-16.

Peterson AT, Shaw J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. Int J Parasitol Parasites. 2003; 33: 919-931.

Pietilä J, He Q, Oksi J, Viljanen MK. Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the recA gene. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 2756–2759.

Pilatti MM, Ferreira SA, Melo MN, Andrade ASR. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. Res. Vet. Sci. 2009; 87(2): 255-257.

Pimentel DS, Ramos RAN, Santana MA, Maia CS, Carvalho GA, Silva HP, Alves LC. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in na endemic area of Brazil. Rev. Soc. Bras. Med.Trop. 2015; 48(4): 491-493.

Pinheiro AC, Costa ASV, Oliveira RS, Reis MLC. Epidemiological aspects and spatial distribution of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, Brazil, between 2008 and 2012. Rev Soc Bras Med Trop. 2020; 53: 1-5.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to

discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2012; 12: 5:15.

Porfirio GEO, Santos FM, Macedo GC, Barreto WTG, Campos JBV, Meyers AC, André MR, Perles L, Oliveira CE, Xavier SCC, Andrade GB, Jansen AM, Herrera HM. Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. *IJP: Parasites and Wildlife*. 2018; 7: 398-404.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez I, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. 2001; 122(3): 253-261.

Quintal AP, Ribeiro Ede S, Rodrigues FP, Rocha FS, Floeter-Winter LM, Nunes CM. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. *Vet Parasitol*. 2011;176(2–3): 112–119.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas' disease in Southeast Brazil. *Acta Trop*. 2002; 84:189–198.

Ramírez C, Puerta C, Requena JM. Evidence of RNA editing in *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Parasitol Res*. 2011; 108: 731–739.

Recalde ODS, Brunelli JP, Rolon MS, de Arias AT, Aldama O, Gómez CV. First Molecular Report of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Paraguayan Inhabitants Using High-Resolution Melt-PCR. *Am J Trop Med Hyg*. 2019; 101(4): 780 – 788.

Reis LL, Balieiro AAS, Fonseca FR, Gonçalves MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2017; 50(5): 638-645.

Reis FC, Minuzzi-Souza TTC, Neiva M, Timbó RV, Morais IOB, Lima TM, Hecht M, Nitz N, Gurgel-Gonçalves R. Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. *Vet Med Sci*. 2019; 00:1–9.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Primez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(9): 581-596.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem*. 1997; 245(2): 154-160.

Rocha TJM, Barbosa ACA, Santana EPC, Calheiros CML. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde*. 2015; 6(4), 49-54.

Rodgers MSM, Bavia ME, Fonseca EOL, Cova BO, Silva MMN, Carneiro DDMT, Cardim LL, Malone JB. Ecological niche models for sand fly species and predicted distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in Bahia state, Brazil. *Environ Monit Assess*. 2019; 191(2): 331.

Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res*. 2011; 21(12):2129-42.

Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014;3(3):251–62.

Rosales-Chilama M, Gongora RE, Valderrama L, Jojoa J, Alexander N, Rubiano LC, Cossio A, Adams ER, Saraiva NG, Gomez MA. Parasitological confirmation and analysis of *Leishmania* diversity in asymptomatic and subclinical infection following resolution of cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(12): e0004273. doi: 10.1371/journal.pntd.0004273.

Rosário ING, De Andrade AJ, Ligeiro R, Ishak R, Silva IM. Evaluating the adaptation process of sandfly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol*. 2017; 54(2): 450-459.

Rousseeuw, P. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math*. 1987; 20: 53–65.

Rovirosa-Hernández MJ, Cortes-Ortíz L, García-Orduña F, Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, Caba M, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in free-ranging howler monkeys in southeastern Mexico. *Am J Primatol*. 2013; 75(2):161-9.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 4:406-425.

Salem AB, Karmaoui A, Salem SB, Ayyad C, Boughrouss AA. Geographical Distribution of Cutaneous Leishmaniasis and Its Relationship With Climate Change in Southeastern Morocco. *Climate Change and Anthropogenic Impacts on Health in Tropical and Subtropical Regions*. 2020; 136-152. DOI: 10.4018/978-1-7998-2197-7.ch007.

Sales KGS, Miranda DEO, Costa PL, Silva FJ, Figueredo LA, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F. Home sweet home: sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, where leishmaniasis is endemic. *Parasite. Vectors*. 2019; 12(118).

Salvatore D, Di Francesco A, Poglayen G, Rugna G, Santi A, Morandi B, Baldelli R. Molecular characterization of *Leishmania infantum* strains by kinetoplast DNA RFLP-PCR. *Vet. Ital*. 2016; 52 (1): 71-75.

Sampaio RNR, De Paula CDR. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Ver Soc Bras Med Trop*. 1999; 32(5): 523-528.

Sampaio BM. Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseado em genes nucleares e mitocondriais. [Dissertação]. Epidemiologia experimental aplicada às Zoonoses. São Paulo; 2016.

Santiago ME, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin Ade F, Lima VM. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil) *Vet Parasitol*. 2007;150(4): 283–290.

Santos M, Marcos R, Assunção M, Matos AJF. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Vet Parasitol*. 2006; 141: 340-344.

Santos DR, Santos AR, Poiani LP, Oliveira O, Silva AM, Galati EAB. Occurrence of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) in Paraná State, South of Brazil. *Neotrop. Entomol.* 2009; 38(2): 298-301.

Santos WS. *Trypanosoma cruzi* e outros tripanosomas em primatas não humanos procedentes do parque zoológico municipal de Bauru, São Paulo, Brasil [dissertação]. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2016.

Santos AFGA. Infecção natural por *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) em mamíferos de rio branco/ AC [dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz; 2017.

Santos FM, Macedo GC, Barreto WGT, Oliveira-Santos LGR, Garcia CM, Mourão GM, Porfírio GEO, Marino ED, André MR, Perles L, Oliveira CE, Andrade GB, Jansen AM, Herrera HM. Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal. *PLoS ONE* 2018; 13(8): e0201357.

Santos WS, Ortega FD, Alves VR, Garcez LM. Phlebotomines (Psychodidae: Phlebotominae) of endemic area for cutaneous and visceral leishmaniasis in northeastern Pará State, Brazil. *Rev Pan Amaz Saude* 2019; 10: e201900059.

Santos RL, Oliveira AR. Minireviews: Leishmaniasis in non - human primates: Clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs. *J Med Primatol.* 2019; 49:34–39.

Schäfer I, Volkmann M, Beelitz P, Merle R, Müller E, Kohn B. Retrospective evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean region and southeastern Europe (2007–2015). *Parasite. Vectors.* 2019; 12(30).

Schalm OW. Uncommon hematologic disorders: spirochetosis, trypanosomiasis, leishmaniasis, Pelger–Huet anomaly. *Canine Pract* 1979; 6:46–49.

Schneider MC, Aguilera XP, Smith RM, Moynihan MJ, da Silva JBJr, Aldighieri S, Almiron M. Importance of animal/human health interface in potential Public Health Emergencies of International Concern in the Americas. *Rev. Panam. Salud Publica.* 2011; 29(5): 371–379.

Schneider MC, Munoz-Zanzi C, Min KD, Aldighieri S. "One Health" From Concept to Application in the Global World. Glob. Public Health. 2019; Doi: 10.1093/acrefore/9780190632366.013.29.

Schöniana G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Micr Infec Dis. 2003; 47(1): 349-358.

Secretaria da Saúde (2020). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2019. Acesso em: 06 de setembro de 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LV-Casos.pdf>.

Selder R, Weber K, Bergmann M, Geisweid K, Hartmann K. Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis. Vet. J. 2018; 232: 46-51.

Sereno D, Akhoundi M, Sayehmri K, Mirzaei A, Holzmüller P, Lejon V, Waleckx E. Noninvasive Biological Samples to Detect and Diagnose Infections due to Trypanosomatidae Parasites: A Systematic Review and Meta-Analysis. Int. J. Mol. Sci. 2020; 21(5).

Sharma MC, Gupta AK, Das VNR, Verma N, Kumar N, Saran R, Kar SK. *Leishmania donovani* in blood smears of asymptomatic persons. Acta Trop. 2000; 76: 195–196.

Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology: New World. In: The Leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology (Peters W. & Killick-Kendrick R. eds). Academic Press Inc., London. 1987; 1: 291-363.

Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Peterson EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1988; 82:66–68.

Silva DM. Estudo de algumas populações de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Atunes & Coutinho, 1939) (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) procedentes de áreas de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana no norte e nordeste do Brasil. 2010 [Dissertação]. Biologia Parasitária - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Silva AF, Damasceno ARA, Prado WS, Caldeira RD, Sampaio-Junior FD, Farias DM, Silva LCO, Guimarães RJPS, Góes-Cavalcante G, Scofield A. *Leishmania infantum* infection in dogs from maroon communities in the Eastern Amazon.

Cienc. Rural, Santa Maria. 2017;47(01): e20160025.

Silva GJ, Silva ET, Costa GRT, Santos IB. Vigilância da Leishmaniose Visceral no Distrito Federal: aspectos organizacionais, situação epidemiológica e medidas intersetoriais. Comunicação em Ciências da Saúde, Brasília. 2017; 28(2): 149-157.

Silva JAO, Carvalho GA, Faustino MAG. Dinâmica da leishmaniose visceral humana no município de Goiana - PE. Pubvet. 2017; 11(12): 1293-1297.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EAY, Souza AAA. Leishmaniose cutanea na Amazonia: Isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) no Estado do Pará, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. 1991a; 33: 18-22.

Silveira FT, Souza AAA, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EAY. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1991b; 86: 127-130.

Silveira FT, Ishikawa EAYZ, de Souza AAA, de Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite. 2002; 9 (1): 43-50.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.2005;100(5): 525-534.

Silveira MC.A. Procedimentos em técnicas laboratoriais vegetais. 94 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Tocantins. 2010.

Silveira-Neto L, Marcondes M, Bilsland E, Matos LVS, Viol MA, Bresciani KDS. Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil. Semin Cienc Agrar. 2015; 36(3):1467-1480.

Simpson L, Spithill TW, Simpson AM. Identification of maxicircle DNA sequences in *Leishmania tarentolae* that are homologous to sequences of specific yeast mitochondrial structural genes. *Mol Biochem Parasit.* 1982; 6(4): 253-264.

Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: Genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Ver. Microbiol.* 1987; 41: 363-382.

Sistema Nacional de Agravos de Notificações (SINAN, 2018). Informe epidemiológico de Leishmaniose Visceral (LV) – Bahia. Acesso em: 08 de março de 2020. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2018-Boletim-de-Leishmaniose-Vivsceral-n.-01.pdf>.

Sistema Nacional de Agravos de Notificações – (SINAN, 2019). Portal da saúde: DATASUS [online]. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. Acesso em: 06 de março de 2020. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>.

Sleeman JM, Richgels KLD, White CL, Stephen C. Integration of wildlife and environmental health into a One Health approach. *Rev Sci Tech.* 2019; 38(1): 91-102.

Smits HL, Hartskeerl RA. PCR amplification reactions in parasitology. *J. Microbiol. Methods.* 1995; 23:41–54.

Soares CS, Duarte SC, Sousa SR. What do we know about feline leishmaniosis? *J Feline Med Surg.* 2016; 18(6):435-442.

Souza AAA, Ishikawa EAY, Braga RR, Silveira FT, Lainson R, SHAW JJ. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90: 112-113.

Souza AAA, Silveira FT, Silva FMM, Silva LA, Leão EF, Barata IR, et al. Flebotomíneos capturados e identificados no Campus II do Instituto Evandro Chagas - Ananindeua - Estado do Pará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42 Supl 1:441.

Sousa OMF, Silva YJ, Borja LS, Solcà MS, Melo DA, Dias ES, Veras PST, Fraga DBM. Infecção natural por *Leishmania Infantum* e a influência de fatores bioclimáticos em populações locais de *Lutzomyia Longipalpis* no município de Camaçari-Bahia, entre 2011 e 2015. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 53., 2017,

Cuiabá, Mato Grosso. Anais. Cuiabá, Mato Grosso: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2017. 1 p.

Sousa JMS, Ramalho WM, Melo MA. Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018; 51(5): 622-630.

Sousa SAP, Santos HD, de Carvalho CA, Machado AM, de Oliveira LE, Ribeiro TMP, Carreira AG, Galvão SR, Minharro S, Dias FEF, Jayme VS. Acute visceral leishmaniasis in a domestic cat (*Felis silvestris catus*) from the state of Tocantins, Brazil. *Semina: Ciênc. Agrár.* 2019; 40(4): 1723-1729.

Souza FJMS, Silva VC, Coelho CAV, de Azevedo ACR, Bastos L, Souza NA. Nocturnal Activity Rhythm of *Nyssomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campus Fiocruz Mata Atlântica, an American Cutaneous Leishmaniasis Transmission Area, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2019;52: e20180464.

Springer J, White PL, Hamilton S, Michel D, Barnes RA, Einsele H, Löffler J. Comparison of Performance Characteristics of *Aspergillus* PCR in Testing a Range of Blood-Based Samples in Accordance with International Methodological Recommendations. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54(3): 705-711.

Stevens J, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The Molecular Evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasit.* 2001; 48:1-53.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmaia infantum* DNA in dog. *J. Infect. Dis.* 2004; 189: 1729-1733.

Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde (SUVISA, 2015a). Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no estado da Bahia, 2015a. Disponível em:

http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/BOLETIM%20LTA%202015_0.pdf.

Acesso em: 04 de março de 2020.

Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde (SUVISA, 2015b). Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral no estado da Bahia, 2015b. Disponível em:

http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/BOLETIM%20LV_2015.pdf. Acesso em: 04 de março de 2020.

Talmi-Frank D, Nasereddin, A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, Baneth G. Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(1): e581.

Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. Mol. Biol. Evol. 1992; 9: 678-687.

Taniguchi HH, Tolezano JE, Corrêa FMA, Moraes RHP, Veiga RMO, Marassá AM. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. I - Composição da fauna flebotomínica no município de São Roque, Região de Sorocaba / American cutaneous leishmaniasis in São Paulo State, Brasil. I - Sandfly fauna composition of São Roque country, Sorocaba region. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 1991; 51(1/2): 23-30.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP. A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol. Evol. 2003; 18: 70–74.

Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001; 356(1411): 983–989.

Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, Araújo Junior JP. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. Vet Parasitol. 2014; 203(1-2):203-6.

Teodoro U, Thomaz-Soccol V, Kühl JB, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Abbas M, Dias AC. Reorganization and cleanness of peridomiciliar area to control sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil. Braz Arch Biol Technol. 2004; 47(2): 205-212.

Thomaz-Soccol V, Castro EA, Navarro IT, Farias MR, Souza LM, Carvalho Y, Bispo S, Membrive NA, Minozzo JC, Truppel J, Bueno W, Luz E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. Rev Bras Parasitol. 2009; 18(3): 46-51. 46-51.

Tinoco HP, da Costa MELT, Pessanha AT, Coelho CM, Carvalho TF, Mol JPS, Viana AG, Bueno LL, Fujiwara RT, Santos RL. Visceral leishmaniasis in an infant gorilla

(*Gorilla gorilla gorilla*): Clinical signs, diagnosis, and successful treatment with single - dose liposomal amphotericin B. *J Med Primatol*. 2018; 47(6): 416-418.

Tirlens AGM, Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol Today*. 1998; 14(7): 265-271.

Tonelli GB, Tanure A, Rego FD, Carvalho GMdL, Stumpp R, Ássimos GR, Campos AM, Lima NCVMR, Gontijo CMF, Paz GM, Filho JDA. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild small mammals in ecotourism area of Brazil. *PLoS ONE*. 2017; 12(12): e0190315.

Torrellasa A, Ferrer E, Cruz I, De Lima H, Borges R, Delgado O, Moffi P, Miles MA, Feliciangeli MD. Surveillance for *Leishmania* asymptomatic infection in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: a combination of leishmanin skin test and PCR using blood clots improves detection and enables identification of species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2020; 00: 1–7.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol*. 2009; 164(2-4): 118-123.

Trüeb I, Portela RD, Franke CR, Carneiro IO, Ribeiro Jr. GJ, Soares RP, Barrouin-Melo SM. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in northeast Brazil. *J. Wildl. Dis.*. 2018; 54, (1): 76-84.

Tsukayama P, Nunez JH, De Los Santos M, Soberon V, Lucas CM, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A, Ore M, Baldeviano GC, Edgel KA, Lescano AG, Graf PC, Bacon DJ: A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013, 7 (1): e1956-10.1371/journal.pntd.0001956.

Uzcátegui YDVA, Santos TV, Silveira FT, Ramos PKS, Santos EJM, Póvoa MM. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) from a Urban Park of Belém, Pará State, Northern Brazil and Potential Implications in the Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis. *J. Med. Entomol*. 2020; 57(1): 281–288.

Van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am*. 2019; 33(1): 79-99.

Vexenate JA, Barretto AC, Cuba CC, Marsden PD. Características epidemiológicas de uma região do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1986; 81(3): 293-301.

Viettri M, Herrera L, Aguilar CM, Morocoima A, Reyes J, Lares M, Lozano-Arias D, García-Alzate R, Chacón T, Feliciangeli MD, Ferrera E. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic áreas. Vet.Parasitol: Regional Studies and Reports. 2018; 14: 123-130.

Voltarelli EM, Arraes SMAA, Perles TF, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira TGV. Serological survey for *Leishmania* sp. infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. J Venom Anim Toxins Trop Dis. 2009; 15(4):732-44.

Wijerathna T, Gunathilaka N, Gunawardena K, Rodrigo W. Breeding sites of Phlebotomine sand flies in cutaneous leishmaniasis disease endemic areas of the Kurunegala District in Sri Lanka. Research Symposium on Pure and Applied Sciences. 2018 Faculty of Science, University of Kelaniya, Sri Lanka. p28.

Wildwelfare, 2019. Animal Welfare in Brazilian Zoos. Acesso em: 07 de março de 2020. Disponível em: <https://wildwelfare.org/portfolio/animal-welfare-in-brazilian-zoos/>.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. Lab. Investig. 2000; 80(5): 617-653.

Woods R, Reiss A, Cox-Witton K, Grillo T, Peters A. The Importance of Wildlife Disease Monitoring as Part of Global Surveillance for Zoonotic Diseases: The Role of Australia. Trop. Med. Infect. Dis. 2019; 4(1):29, doi.org/10.3390/tropicalmed4010029.

World Health Organization (WHO, 2010). Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, technical report series, no. 949. 2010:187pp.

World Health Organization (WHO, 2018a). Leishmaniasis. Acesso em: 04 de março de 2020. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

World Health Organization (WHO, 2018b). Leishmaniasis: epidemiological situation. Acesso em: 06 de março de 2020. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

World Health Organization (WHO, 2018c). Leishmaniasis – Cutaneous Leishmaniasis. Acesso em: 08 de março de 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

World Health Organization (WHO, 2019). Eastern Mediterranean Regional Office. Acesso em: 07 de março de 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

World Health Organization (WHO, 2020). Leishmaniasis. Acesso em: 06 de setembro de 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.

Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Lima ACT, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. Plos Negl Trop Dis. 2016; 10(2): e0004485. doi: 10.1371/journal.pntd.0004485.

Zampieri, Ricardo Andrade. Discriminação de organismos do gênero *Leishmania* por análises de perfis de dissociação em alta resolução (HRM - High Resolution Melting) [tese]. São Paulo: Inst. Med. Trop. São Paulo; 2019 [citado 2020-02-10]. doi: 10.11606/T.99.2019.tde-02082019-111305.

Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF. Serological crossreactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47(1):105-107.

Zijlstra EE, Siddig AM, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1992; 86:505–507.

Manuscritos

Manuscripto 1:

Serological Evidence of Infection by *Leishmania* spp. in non-human primates from Brazil – Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical



Serological evidence of infection by *Leishmania* spp. in non-human primates from Brazil

Journal:	<i>Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Major Article
Keyword:	monkey, IFAT, leishmaniasis, diagnosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 Abstract

2 Introduction:

3 Leishmaniasis are neglected and endemic diseases in Brazil, being *Leishmania infantum*
4 the agent responsible for visceral leishmaniasis (VL). In VL, the concept of One Health
5 covers the human population, domestic and wild animals and the impacts that
6 environmental changes have on these populations. Thus, in addition to understanding the
7 disease in humans and domestic animals, it is necessary a study involving wild animals
8 that can participate in the transmission network of the parasite in the environment.

9 Methods:

10 In the study, we investigated anti-*Leishmania* spp antibodies by the indirect
11 immunofluorescence (IFAT) serological technique in 166 non-human primates (NHP) of
12 35 species in five Brazilian regions.

13 Results:

14 The antibodies were detected, with a cut-off point of 1:40, in eight NHP of the species:
15 *Alouatta caraya* (2); *Sapajus xanthosternos* (1); *Ateles marginatus* (1); *Sapajus flavius*
16 (1); *Alouatta belzebul* (1); *Sapajus libidinosus* (1) and *Saguinus niger* (1) being seven of
17 them with title 40 and one with title 80. The Brazilian Northeast was the region with the
18 highest percentage of reagent NHP (7.54%).

19 Conclusions:

20 There are few reports in the literature about the detection of antibodies against *Leishmania*
21 spp. in naturally infected NHP. The results indicate a possible maintenance of the

transmission cycle of the parasite by these wild animals, especially in Brazil, which is an endemic country for the disease.

Keywords: monkey, IFAT, leishmaniasis, diagnosis.

Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease and a serious public health problem. Endemic in 98 countries, with an estimated 700,000 to 1 million new cases each year, of these, 20,000 to 30,000 deaths occur per year, being ranked ninth among infectious diseases¹. According to the species and the relation of the protozoan with the host, it can present different clinical forms². Among them, we highlight visceral leishmaniasis (VL), mucocutaneous leishmaniasis and tegumentary leishmaniasis (TL)³. Brazil has 97% of all VL cases occurring in the Americas⁴ and the epidemiological profile has been altered over time due to increasing urbanization and disorderly occupation leading to precarious living conditions, that contributed to the notification of new cases of the disease⁵.

In Brazil, VL is caused by the species *Leishmania (L.) infantum*. Although domestic dogs (*Canis familiaris*) are considered the main urban reservoirs of VL, other animal species may also become infected⁶. Mammals naturally infected by *Leishmania* include domestic and wild⁷⁻⁹, free-living and captive.

In VL, the concept One Health covers the human population, domestic and wild animals and the impacts that environmental changes have on these populations. Disease surveillance should be performed through anthropogenic and zoonotic control. Disease control programmes should cover the surveillance of vector insects, the geospatial mapping of the distribution of those vectors and the transmission of the protozoan parasite

45 from animal to animal and also from animal to human; in order to avoid the spread of
46 cases of the disease in endemic regions¹⁰.

47 The objective of the study was to investigate the presence of anti-*Leishmania* antibodies
48 by serological test Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) in 166 non-human
49 primates (NHP) of captivity of 35 species in five regions of Brazil.

50 **Methods**

51 **Geographic area:**

52 Blood from NHP belonging to a Conservation Center (CENP) and four zoos from five
53 Brazilian regions were collected. The city of Ananindeua, state of Pará (PA, Northern
54 region); the city of Salvador, state of Bahia (BA, Northeast region); the city of Brasília,
55 state of Federal District (DF, Midwest region); the city of Sorocaba, state of São Paulo
56 (SP, Southeast region), and the city of Curitiba, state of Paraná (PR, South region)
57 (**Figure 1**). The samples were processed in the Adolfo Lutz Institute, Regional
58 Laboratories Center II Bauru, São Paulo, Brazil.

59 **Animals:**

60 Blood samples from 166 captive NHP were collected between October 2016 and October
61 2019 by puncture after physical, chemical or both containment and placed in tubes
62 without EDTA. The volume of blood obtained varied according to the weight of the
63 individual and its physiological and clinical characteristics. The samples were centrifuged
64 at 1600 g for 10 minutes and the serum was immediately placed in plastic microtubes,
65 and stored at -20°C until serological testing was performed.

66 Of the 166 animals, 10 were collected at the CENP in the state of Pará, 53 at the Salvador
67 zoo in Bahia, 44 at the Sorocaba zoo in São Paulo, 17 at the Curitiba zoo in Paraná and

42 at the Brasília zoo in the Federal District. The NHP of the study belong to 15 genera and 35 species (**Table 1**).

The study was evaluated and approved by the Commission for Research Ethics and Animal Experimentation at the UNESP School of Medicine at Botucatu (under protocol number 1212/2017) and the Chico Mendes Institute for the Conservation of Biodiversity (Icmbio) by the Ministry of the Environment's Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO/Icmbio/MMA Nº 57385-3).

Immunofluorescence Antibody test (IFAT):

All twelve orifices of the slides were sensitized by dripping 10µl of the antigen (supplied by the kit) into each orifice, homogenizing always during the preparation.

Antibodies against *Leishmania* spp. were investigated using the IFAT technique according to Camargo¹¹.

Results

Of the 166 serum samples, eight were reagents (4.81%), seven of them with titration equal to 40 and one of them with titre 80 (**Table 2**).

Table 3 shows the percentage of positive animals for each research site, revealing that the Salvador Zoo was the one that presented the highest percentage of reagents to the serological test (7.54%).

Discussion

The diagnosis of leishmaniasis includes from the case history, clinical manifestations compatible with the disease and specific laboratory analyses⁷. The laboratory diagnosis of leishmaniasis can be performed by immunological techniques, which identifies the

1
 2
 3
 4
 5 90 immune response of the individual presenting *Leishmania*; parasitological, for agent
 6
 7 91 identification; serological, which aim to identify antibodies against the parasite and
 8
 9 92 molecular by amplifying specific fragments of protozoan DNA¹².
 10
 11 93 Commonly used serological methods are: the Indirect Immunofluorescent Antibody Test
 12
 13 94 (IFAT); the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); the
 14
 15 95 Immunocromatographic Rapid Tests (DPP® and LSH Ab ECO Test) and Direct
 16
 17 96 Agglutination (DAT). The IFAT technique is performed using serum dilutions in slides
 18
 19 97 coated with promastigote forms of *Leishmania* as antigen. Antibody binding and antibody
 20
 21 98 titre are revealed by the use of fluorescein-conjugated antibodies. Although the technique
 22
 23 99 is considered subjective, this is the method recommended by the World Organization of
 24
 25 100 Animal Health. However, it is recognized that in areas where leishmaniasis and Chagas
 26
 27 101 disease are endemic, there may be cross-reaction between *Trypanosoma cruzi* and
 28
 29 102 *Leishmania* spp. by the IFAT test¹³.
 30
 31 103 The anti-human goat IgG conjugate labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (anti-
 32
 33 104 human/FITC) from Bio-Manguinhos® was used. Although the samples of this study are
 34
 35 105 of NHP, the use of human conjugate even in these animals has already been described in
 36
 37 106 the literature, two cases of *L. infantum* reported in orangutans (*Pongo pygmaeus*
 38
 39 107 *pygmaeus*) in Spain¹⁴.
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46 108 In this study, eight samples were reagents for *Leishmania* spp. representing 4.81%.
 47
 48 109 Recent studies published using the IFAT serological technique also detected animals
 49
 50 110 reacting to the same parasite. Schäfer's work and collaborators¹⁵ detected reagent dogs
 51
 52 111 for *Leishmania*.
 53
 54
 55
 56 112 In addition to domestic animals, studies indicate that wild animals may also be reagents
 57
 58 113 to *Leishmania* spp. with the IFAT technique, as demonstrated by Jusi and collaborators¹⁶
 59
 60

1
2
3
4 114 who found reagent wild canids and Cássia-Pires and collaborators¹⁷ who detected positive
5
6 115 wild rodents.
7
8
9 116 In the wild, natural infection by protozoa of the genus *Leishmania* is common. Many
10
11 117 infections that affect humans may also affect other primates, especially the Neotropical
12
13 118 ones¹⁸.
14
15
16 119 The enzootic leishmaniasis cycle involves several species of wild mammals, including
17
18 120 NHP, in particular those belonging to the family Cebidae, such as the monkey of the
19
20 121 species *Sapajus apella* in the Amazon region, which is related to *Leishmania (Viannia)*
21
22 122 *shawii*, responsible for tegumentary leishmaniasis¹⁹.
23
24
25 123 In the One Health view, there is a triad of connection between human beings, animals and
26
27 124 the shared environment and for their understanding, it is necessary to study an integrated
28
29 125 network between various disciplines of knowledge, aiming at public health and common
30
31 126 well-being²⁰.
32
33
34 127 More than 70% of emerging zoonotic diseases originate in the wild, so the understanding
35
36 128 of wild animals, including NHP, in the maintenance and transmission network of parasites
37
38 129 in nature should be studied²¹.
39
40
41
42
43 130 In Brazil, in the municipality of Maringá, state of Paraná, an endemic region for
44
45 131 Tegumentary Leishmaniasis, 65 wild mammals were captured in the Ingá Park, in the
46
47 132 municipality of Maringá. Serum samples of four capuchin monkeys of the species
48
49 133 *Sapajus apella* were analyzed in this study. The results of the direct agglutination test
50
51 134 (DAT) revealed a titer greater than or equal to 10 for 100% of the capuchin samples with
52
53 135 antibodies against *Leishmania* spp.²².
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 136 The region with the highest percentage of reagent NHP in our study was the Northeast.
6
7 137 The Brazilian Northeast has recorded an increase in the number of cases of VL due to
8
9 138 increasing urbanization and geographical expansion with records of cases of the disease
10
11 139 in places where it did not traditionally occur²³. The state of Bahia has become an endemic
12
13 140 site for VL in a large number of municipalities with cases of the disease²⁴ and an increase
14
15 141 in the number of cases in dogs in the metropolitan region of Salvador²⁵. The state is among
16
17 142 the Brazilian states with the highest annual incidence rates of VL²⁶.
18
19 143 A survey carried out in urban fragments of the rainforest in the city of Salvador detected
20
21 144 primates (*Callithrix* sp.) infected with *Leishmania* spp. , even without symptoms of the
22
23 145 disease, demonstrating the importance of these animals in maintaining the cycle of the
24
25 146 parasite, especially in Salvador, where there was a disorderly growing population where
26
27 147 the city encompassed the remnants of rainforest and enzootic cycles that were formerly
28
29 148 restricted to the wild environment began to become increasingly part of urban cycles²⁷.
30
31
32
33
34 149 The work of Paz and collaborators²⁸ carried out in an endemic area for leishmaniasis in
35
36 150 Brazil detected reagent dogs for *Leishmania major*, the most prevalent titration being 40.
37
38 151 In the study, the percentage of reagent dogs was 3.42%, even though it was an endemic
39
40 152 region (carried out in the state of Pará) and with canine samples. Thus our percentage of
41
42 153 seropositive NPH of 4.81% is not far below the published papers.
43
44
45
46
47 154 These studies indicate that NHP can be included in the natural host or reservoir definitions
48
49 155 of *Leishmania*, demonstrating that the wild leishmaniasis cycle is maintained by a
50
51 156 complex group of mammals that act as hosts and maintain the parasite in these
52
53 157 environments²⁹. It is a fact that NHP is infected naturally and may or may not present
54
55 158 symptoms compatible with the disease, as in the case of the work of Malta and
56
57 159 collaborators³⁰ in which the primate of the species *Callicebus nigrifrons* developed the
58
59
60

1
2
3
4
5 160 lethal infection, showing signs and symptoms similar to those of infected dogs and
6
7 161 humans. Thus, NHP should be considered during epidemiological studies, since there is
8
9 162 evidence of natural infection in these animals and a possible potential transmission²⁹.
10
11 163 In this study, found serological evidence of natural infection by *Leishmania* spp. in eight
12
13 164 captive NHP from the species: two *Alouatta caraya* and each one *Sapajus xanthosternos*,
14
15
16 165 *Ateles marginatus*, *Sapajus flavius*, *Alouatta belzebul*, *Sapajus libidinosus* and *Saguinus*
17
18 166 *niger*, with a prevalence rate of 4.81% in three Brazilian regions (Northeast, Southeast
19
20 167 and Midwest) of the states of Bahia, São Paulo and the Federal District respectively. The
21
22 168 results highlight the importance of these animals in maintaining the parasite in nature and
23
24
25 169 the need for epidemiological surveillance in places where the disease is considered
26
27 170 endemic.

28
29
30 171 **Conflict of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.
31
32

33 172
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 173 **References**
- 174 1. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Geneva: WHO; 2017. 1 p.
- 175 2. Goutijo B, Carvalho MDR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Soc. Bras.
- 176 Med. Trop. 2003; 36(1):71-80.
- 177 3. Longoni SS, López-Céspedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-González ME,
- 178 Sauriarce CH, Rodríguez-Vivas RJ, et al. Detection of different *Leishmania* spp.
- 179 and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico)
- 180 using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. Comp Immunol
- 181 Microbiol Infect Dis. 2012; 35:469-476.
- 182 4. Pan-American Health Organization (PAHO). Leishmanioses. Informe
- 183 epidemiológico das Américas. Informe epidemiológico Nº8. Geneva: WHO;
- 184 2019. 10 p.
- 185 5. Reis LL, Balieiro AA, Fonseca FR, Gonçalves MJ. Changes in the epidemiology
- 186 of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. Rev Soc Bras Med Trop.
- 187 2017; 50:638-45.
- 188 6. Fernandes AP, Andrade HM, Melo MN, Coelho EAF, Avelar D, Gazzinelli RT.
- 189 Leishmaniose visceral: canina: novos antígenos para diagnóstico e vacinas.
- 190 Revista de saúde pública do SUS/MG. 2013; 1(1):49-50.
- 191 7. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: Epidemiology,
- 192 diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. Vet Parasitol. 2011; 181:23-30.
- 193 8. Arbeláiz N, Moreno J, Murillo J, Montoya A, Robledo SM, Vélez A, et al. First
- 194 Report of an Urban Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Municipality of
- 195 Cali, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2020; 102(2):289-293.

<https://mc.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

- 220 animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011; 20(3):219-
- 221 222.
- 222 17. Cássia-Pires R, Boité MC, D'Andrea OS, Herrera HM, Cupolillo E, Jansen AM,
- 223 et al. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia:
- 224 Hystricognathi) from Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8 (12):e3389.
- 225 18. Rovirosa-Hernández MJ, Cortes-Ortiz L, García-Orduña F, Guzmán-Gómez D,
- 226 López-Montesón A, Caba M, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and
- 227 *Leishmania mexicana* in free-ranging howler monkeys in southeastern Mexico.
- 228 Am J Primatol. 2013; 75(2):161-9.
- 229 19. Carneiro LA, Silveira FT, Campos MB, Brígido MCO, Gomes CMC, Corbett
- 230 CEP, et al. Susceptibility of *Cebus apella* monkey (primates: Cebidae) to
- 231 experimental *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. Rev. Inst. Med. Trop.
- 232 São Paulo. 2011; 53(1):45-50.
- 233 20. Woods R, Reiss A, Cox-Witton K, Grillo T, Peters A. The Importance of Wildlife
- 234 Disease Monitoring as Part of Global Surveillance for Zoonotic Diseases: The
- 235 Role of Australia. Trop. Med. Infect. Dis. 2019; 4(1):29.
- 236 21. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global
- 237 trends in emerging infectious diseases. Nature. 2008; 451:990-4.
- 238 22. Voltarelli EM, Araes SMAA, Puelles TF, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira
- 239 TGV. Serological survey for *Leishmania* sp. Infection in wild animals from the
- 240 municipality of Maringá, Paraná State, Brazil. J Venom Anim Toxins Trop Dis.
- 241 2009; 15(4):732-44.
- 242 23. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da
- 243 leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia

<https://mc.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

- 196 9. Alcóver MM, Ribas A, Guillén MC, Berenguer D, Tomás-Pérez M, Riera C, et
- 197 al. Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a
- 198 Mediterranean area. Prev Vet Med. 2020; 175: 104874.
- 199 10. Schneider MC, Munoz-Zanzi C, Min KD, Aldighieri S. "One Health" From
- 200 Concept to Application in the Global World. Glob. Public Health. 2019; Doi:
- 201 10.1093/acrefore/9780190632366.013.29.
- 202 11. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American
- 203 tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of
- 204 *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med Trop São Paulo. 1966; 8:227-
- 205 234.
- 206 12. Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Pórtus M. Serological diagnosis and treatment of
- 207 canine leishmaniasis. Vet Record. 1995; 136:514-516.
- 208 13. Luciano MR, Lucchesi SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Cross
- 209 reaction evaluation of *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* antigens in dogs'
- 210 serologic response by indirect immunofluorescence test (IIF). Braz. J. Vet. Res.
- 211 An. Sci. 2009; 46(3):181-187.
- 212 14. Miró G, Troyano A, Montoya A, Farfán F, Ferrín ML, Flores L, et al. First report
- 213 of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus*
- 214 *pygmaeus*) in Madrid, Spain. Parasites Vectors. 2018; 11(1):1-7.
- 215 15. Schäfer I, Volkmann M, Beelitz P, Merle R, Müller E, Kohn B. Retrospective
- 216 evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean
- 217 region and southeastern Europe (2007–2015). Parasite Vector. 2019; 12(30).
- 218 16. Jusi MM, Starke-Buzetti WA, Oliveira TM, Tenório MS, Sousa LO, Machado
- 219 RZ. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. In captive wild

<https://mc.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

- 244 de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cadernos de Saúde Pública.
- 245 2004; 20(1):259-265.
- 246 24. Franke CR, Staubach C, Ziller M, Schlüter H. Trends in the temporal and spatial
- 247 distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil,
- 248 from 1985 to 1999. T Roy Soc Trop Med H. 2002; 96:1-6.
- 249 25. Barboza DCPM, Gomes Neto CMB, Leal DC, Bittencourt DVV, Carneiro A/B,
- 250 Souza BMPs, et al. Estado de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral
- 251 canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. Rev.
- 252 Bras. Saúde Prod. An. 2006; 7(2):152-163.
- 253 26. Brasil. Ministério da Saúde (2019). Secretaria de Vigilância em Saúde [Internet].
- 254 Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes.
- 255 Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017; [updated 2017 June
- 256 15; cited 2020 June 8]. Available from:
- 257 [http://portal.arquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2018/novembro/12/LV-Coef-](http://portal.arquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2018/novembro/12/LV-Coef-Incidencia.pdf)
- 258 [Incidencia.pdf](http://portal.arquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2018/novembro/12/LV-Coef-Incidencia.pdf)
- 259 27. Trieb I, Portela RD, Franke CR, Carneiro IO, Ribeiro Jr. GJ, Soares RP, et al.
- 260 *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest
- 261 fragments in northeast Brazil. J. Wildl. Dis. 2018; 54, (1):76-84.
- 262 28. Paz GS, Colhado BS, Anton MM, Rocha KS, da Silva DB, de Moraes CCG, et al.
- 263 Infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania major* e
- 264 *Trypanosoma cruzi* em cães do estado do Pará. Ciênc. anim. bras. 2019;
- 265 20:e33566.
- 266 29. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species
- 267 in the Americas. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2014;3(3):251-62.

<https://mc.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

268 30. Malta MCC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira ALS, Costa EA, Santos RL.
 269 Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. Vet
 270 Parasitol. 2010; 169:193-197.
 271
 272
 273
 274 Figure 1: Locations where were collected blood samples from NHP. Animals from a
 275 Conservation Center and four zoos representing five Brazilian regions were sampled.

<https://mc.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Table 2: IFAT reagent samples with anti-human goat IgG conjugate.

Place/Sample	Scientific name	Titration
Zoo Salvador		
BA07	<i>Sapajus xanthosternus</i>	40
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	80
BA52	<i>Ateles marginatus</i>	40
BA54	<i>Sapajus flavius</i>	40
Zoo Sorocaba		
SP05	<i>Alouatta caraya</i>	40
Zoo Brasília		
DF18	<i>Alouatta belzebul</i>	40
DF34	<i>Sapajus libidinosus</i>	40
DF39	<i>Sapajus niger</i>	40

BA: Bahia state; SP: Sao Paulo state; DF: District Federal.

Table 3: Percentage of IFAT-reactive animals from each location of the study.

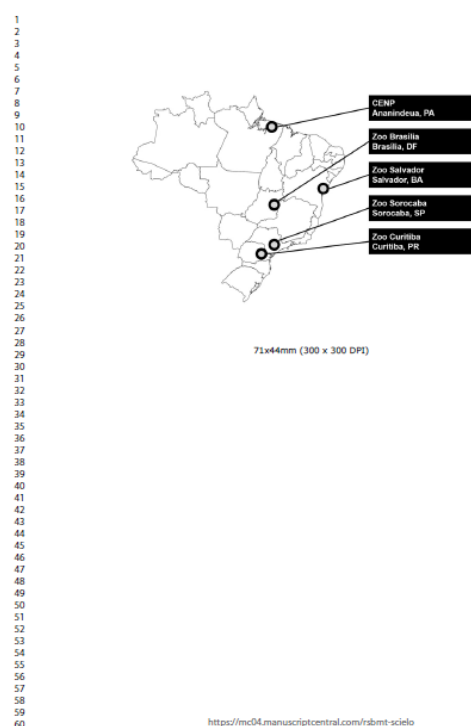
Location	Nº of total serum	Nº of reagent animals with RIFI	Percentage of the reagents
CENP	10	0	0%
Zoo Salvador	53	4	7,54%
Zoo Sorocaba	44	1	2,27%
Zoo Curitiba	17	0	0%
Zoo Brasília	42	3	7,14%
Total	166	8	4,81%

<https://mc.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Table 1: All NHP species sampled in the study and the place of origin.

Place/scientific name	Number of animals
CENP (North region):	
<i>Ateles marginatus</i>	10
Zoo Salvador (Northeast region):	
<i>Alouatta caraya</i>	06
<i>Ateles marginatus</i>	02
<i>Ateles paniscus</i>	04
<i>Leontopithecus rosalia</i>	03
<i>Sapajus flavius</i>	10
<i>Sapajus xanthosternus</i>	28
Zoo Sorocaba (Southeast region):	
<i>Alouatta caraya</i>	05
<i>Alouatta guariba</i>	04
<i>Alouatta seniculus</i>	03
<i>Aotus triratus</i>	02
<i>Ateles chamek</i>	03
<i>Ateles marginatus</i>	10
<i>Brachyteles arachnoides</i>	04
<i>Callithrix jacchus</i>	04
<i>Callithrix jacchus</i>	01
<i>Cebus olivaceus</i>	01
<i>Chiropotes utahickae</i>	01
<i>Papio hamadryas</i>	02
<i>Sapajus nigrinus</i>	02
<i>Sapajus xanthosternus</i>	02
Zoo Curitiba (South region):	
<i>Ateles chamek</i>	08
<i>Callithrix penicillata</i>	05
<i>Saimiri sciureus</i>	01
<i>Sapajus apella</i>	03
Zoo Brasília (Midwest region):	
<i>Alouatta belzebul</i>	02
<i>Alouatta caraya</i>	05
<i>Alouatta seniculus</i>	03
<i>Aotus nigripes</i>	08
<i>Callithrix cupreus</i>	02
<i>Callithrix jacchus</i>	01
<i>Callithrix penicillata</i>	02
<i>Cebus albifrons</i>	01
<i>Chiropotes satanas</i>	02
<i>Hibrid (Callithrix penicillata X Callithrix jacchus)</i>	01
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	03
<i>Leontopithecus rosalia</i>	01
<i>Leontopithecus rosalia</i>	02
<i>Lophocebus aterrimus</i>	01

<https://mc.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>



Guiraldi 1

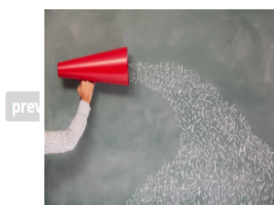
Identification of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in captive primates from a zoo in Brazil

Leishmaniasis in NHP in Brazil

Wiley Online Library

Search

Call for Papers: Special Issue on One Health



The *American Journal of Primatologists* is excited to announce they are soliciting articles for the first ever special issue dedicated to Primate One Health projects. If you are working on a project that involves the One Health paradigm and you are working in a primate habitat, please consider submitting to this special volume. Abstracts should be submitted by **August 31st, 2020**, with full paper submissions due by **Nov 1, 2020**. Read the full details [here](#).

20 **Abstract**

21 The wild non-human primates (NHP) are considered natural hosts of protozoan
22 by the genus *Leishmania*, the etiological agent of leishmaniasis. The study in zoo
23 animals is important to establish surveillance ways and control in the municipality
24 studied, mainly under the One Health concept, which relates the human-animal-
25 environment health and disease interface and the survival of endangered
26 species. This research was aimed identify *Leishmania infantum* and *Leishmania*
27 *braziliensis* in NHP of Sorocaba zoo, in the State of Sao Paulo, Brazil, a city
28 considered endemic for leishmaniasis. The blood of 48 NHP were submitted to
29 the molecular technique of PCR. The results of the research revealed for the first
30 time the natural infection by *L. infantum* and *L. braziliensis* in NHP in Sorocaba
31 zoo, with one primate belonging to the species *Plecturocebus vieirai*, positive for
32 *L. infantum* and other five positive for *L. braziliensis*, four of them from the species
33 *Alouatta caraya* and one *Atelle chamek*, indicating a possible role of these
34 animals in the maintenance of the parasites.

35 Key words: leishmaniasis, monkey, PCR, zoonosis.

36 **Introduction**

37 Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis characterized by a chronic and serious
38 disease. It is endemic in 97 countries, with high incidence mainly in development
39 countries of tropical and subtropical areas (WHO, 2018a). Brazil presents 97% of
40 all VL cases in Americas (PAHO, 2019) and in this country, VL is caused by
41 *Leishmania (L.) infantum* (Fernandes et al., 2013).

42 Tegumentary leishmaniasis (TL) occurs in Latin America owing to protozoan of
43 two subgenre: *Leishmania*, including *Leishmania mexicana* and *Leishmania*
44 *amazonensis*; and the subgenre *Viannia*, for example *Leishmania panamensis*,
45 *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* (Markle; Makhoul, 2004). In
46 Brazil, *L. braziliensis* is the main responsible for mucotegumentary leishmaniasis,
47 with compromised mucosal (WHO, 2018b).

48 Leishmaniasis are neglected tropical diseases and may be better understood by
49 the context of One Health, which proposes a better understanding of the process
50 of health and disease, with a larger knowledge for the detection, prevention and
51 control of infections and the problems related to the interface human-animal-
52 environment, contributing to a sustainable equilibria (Schneider et al., 2019).

53 Among mammals that become naturally infected with *Leishmania*, include wild
54 and domestic mammals (Arbeláez et al., 2020; Alcover et al., 2020), free-living
55 and captive animals, such as non-human primates (NHP).

56 São Paulo state presents a high number of infected persons due to a huge
57 number of species of protozoans of *Leishmania* genre, with the year 2019
58 registered 87 cases of VL with 11 deaths (CVE,2020a) and 4577 cases of CL
59 (CVE, 2020b). Only in Sorocaba municipality totalized 545 cases of CL in humans
60 by the years 1998 and 2006 (CVE, 2008) demonstrating the need for further
61 studies for a better understanding of the disease transmission in the municipality.
62 Based in this information, was conducted this research of the possible
63 transmission cycle of *L. infantum* and *L. braziliensis* in captivity primates of this
64 area.

65 **Methods**

66 That study was evaluated and approved by the Commission for Research Ethics
67 and Animal Experimentation at the UNESP School of Medicine at Botucatu under
68 protocol number 1212-2017 and by the System of Authorization and Information
69 in Biodiversity of Chico Mendes Institute for the Conservation of Biodiversity
70 (ICMBio) of Ministry of the Environment (SISBIO/ICMBio/MMA N° 57385-3).

71 Sorocaba Municipal Zoological Park is located in São Paulo state, southeast
72 Region of Brazil (−23°30'21"S, −47°26'14"W). The institution was established on
73 1968 in an area of 130.000m² and has approximately 1000 animals.

74 Samples blood from non-human primates (PNH) captive at the Sorocaba Zoo
75 was collect between 2017 and 2018. The volume of blood obtained varied
76 according to the individual's weight and their physiological and clinical
77 characteristics. The samples were stored in tubes with EDTA.

78 DNA was extracted using the commercial kit Illustra Blood GenomicPrep (GE
79 Healthcare®) according to the manufacturer's recommendations.

80 The Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out under the following
81 conditions: each microtube of reaction of 0.2mL received 1.3 µL of PCR buffer
82 (50mM KCl, 20mM of Tris-HCl pH 8.4), 0.4µL of MgCl₂ (1.6 mM), 0.25µL of
83 dNTPs (2mM), 0.25µL (1U) of Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase,
84 Invitrogen®, USA), 0.25µL (0.2µM) of each primer, 1µL of the tested sample (10
85 ng/µL) and 8.3µL of ultrapure water (MIX-PCR).

86 To evaluate the endogenous quality, DNA integrity, and presence of inhibitors,
87 we used primers for the conserved vertebrate beta globin genes β -1 (5'-

88 ACCACCAACTTCATCCACGTTTAC-3') and β -2 (5'-
 89 CTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC-3') (Lee et al., 2001).

90 For *Leishmania infantum* DNA research, was used species-specific primers for
 91 the 18S rRNA region, LCS1 (5'-GCAATGCCAGCTACATATATG-3') and LCS3
 92 (5'-CAGCTTTTGGGTGGGTAACA-3') (Neto et al., 2012). 2001). For
 93 amplification of *Leishmania braziliensis* kDNA, was used species-specific primers
 94 B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') and B2 (5'-
 95 CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') developed by De Bruijn e Barker (1992), with
 96 cycling profile of Alexander et al. (1998). As positive controls was used 10 ng of
 97 DNA extracted from an in vitro culture of *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906),
 98 *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566), and ultrapure water as negative
 99 control. Amplification was performed in a gradient thermal cycler
 100 (MastercyclerPro®, Eppendorf, Germany). The amplified products were identified
 101 by electrophoresis in 1.5% agarose gel, containing 0.1µL/mL of SYBR Safe®
 102 DNA Gel Stain (Invitrogen).

103 Results

104 Forty-eight captive primates of fifteen species were sampled, as proceed: Five
 105 *Alouatta caraya*, four *Alouatta guariba*, three *Alouatta seniculus*, two *Aotus*
 106 *trivirgatus*, three *Ateles chamek*, 11 *Ateles marginatus*, four *Brachyteles*
 107 *arachnoides*, four *Plecturocebus vieirai*, one *Callithrix jacchus*, one *Cebus*
 108 *olivaceus*, one *Chiropotes utahickae*, three *Leontopithecus chrysomelas*, two
 109 *Papio hamadryas*, two *Sapajus nigritus* and two *Sapajus xanthosternos*.

110 All the samples amplified with the constitutive beta globulin primer of vertebrates,
111 revealing good integrity of the extracted material. The molecular results of the
112 specific research for *L. infantum* showed one NHP of the specie *Plecturocebus*
113 *vieirai* positive and the results of the research for *L. braziliensis* showed five
114 positive NHP, four of the specie *Alouatta caraya* and one *Ateles chamek*.

115 Discussion

116 Daces from 2001 to 2017 show that in Brazil were registered 53,715 human
117 cases of visceral leishmaniasis, with the regions Northeast, Southeast and
118 Midwest the most compromised areas and that presented highest risk of
119 transmission (Azevedo et al., 2019).

120 The mucocutaneous leishmaniasis occurs in about 20 American countries, and
121 is considered endemic in 18 of them (PAHO, 2017), including Brazil. Although the
122 mucocutaneous cases are declining in the country, the disease still causes
123 impacts in public health (Bezerra et al., 2018).

124 In southeast region, the main biome is Cerrado, which allows a huge adaptation
125 of the phlebotomines from different species, resulting in a highest population of
126 vectors in the peridomiciliar environment (Costa et al., 2019). In the last decades,
127 Brazil presented changes in the epidemiology of the leishmaniasis; cases that
128 were restrict to the Northeast region began to spread quickly, targeting states of
129 the Southeast region, where are Sao Paulo state and the municipality of
130 Sorocaba (Conti et al., 2016, Martins-Melo et al., 2018).

131 In Sao Paulo state, due to the drastic reductions of the forests, there was a higher
132 dispersion of the TL cases, which nowadays are registered in different areas of

133 the state, occurring independently sex and age of the person. Thus, the lack of
134 knowledge about the hosts and wild reservoirs of *L. braziliensis* lead to a higher
135 number of cases in the interior of São Paulo state (Tolezano, 1994).

136 Studies show that 70% of the infectious diseases that can threat the public health
137 present an interaction into humans and another animals (Chomel et al., 2007;
138 Schneider et al., 2011) and the pathogens, the most of times, are involved in
139 zoonotic infections, which are infections naturally transmitted into vertebrate
140 animals and human beings (Taylor et al., 2001), such leishmaniasis.

141 The climatic changes and the habitats fragmentations result in the loss of
142 biodiversity, besides the degradation of the natural environments, threatening the
143 ecosystem responsible for maintain the life. Such changes can be responsible for
144 appearance of zoonotic diseases with negative results to the human and animal
145 health and for the environment (Sleeman et al., 2019). Attention must be done to
146 the surveillance of diseases that can affect the wild fauna, such as NHP, in order
147 to detect infectious emerging diseases and a higher integration between the
148 health of the wild fauna and their impacts to the human beings (Woods et al.,
149 2019).

150 The enzootic cycle of leishmaniasis involves the different species of wild
151 mammals, which the neotropical primates are important hosts of *Leishmania*
152 spp., including the NHP (Carneiro et al., 2011). The results of the study in 81
153 samples of blood from wild animals, with free life and in captivity, including
154 primates, in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, revealed positivity to *L.*
155 *infantum* in PCR in three primates *Alouatta guariba*, alerting the need for control

156 of the disease, mainly in endemic areas, with the finality of conservation of the
157 wild fauna, which is also maintained in captivity (Lombardi et al. 2014). Studies
158 in zoo primates already found positivity for *Leishmania* spp., as demonstrated by
159 Reis et al. (2019) in Brasilia Zoo, Federal District, Brazil and by Malta et al. (2010)
160 in Belo Horizonte Zoo, Minas Gerais, Brazil.

161 Studies show that NHP can be include in the definition of host or natural reservoir
162 of *Leishmania* (Roque; Jansen, 2014). Fact is that NHP infect themselves
163 naturally, presenting or not symptoms equal to dogs and infected humans. In this
164 way, NHP can be studied during epidemiologic surveys, because there are
165 evidences of natural infection and a possible potential of transmission (Santos;
166 Oliveira, 2020).

167 This is the first study to relate the presence of *L. infantum* DNA in one non-human
168 primate, besides another five positive for *L. braziliensis* in Sorocaba Zoo, SP,
169 Brazil. Sorocaba is considered endemic for cutaneous leishmaniasis and
170 outbreaks of *L. braziliensis* have been described in the city (Ferreira et al., 2015).
171 This fact supports our findings of five positive NHP for this species. All five of
172 these NHP (four of the *Alouatta caraya* species and one *Ateles chamek*) were
173 born at the Sorocaba Zoo itself, which indicates that they acquired the infection
174 in the environment where they are installed, indicating the circulation of *L.*
175 *braziliensis* among the NHP. The primate of the species *Plecturocebus vieirai*
176 positive for *L. infantum* came from a rescue, that is, it was not born in the Zoo
177 where this research was conducted, so this NHP, which was free-living, may have
178 been infected in its natural environment and for housing the parasite in the
179 bloodstream can carry infection to the other NHPs that live in the Sorocaba Zoo.

180 This results show free circulation of leishmanias in the interior of Zoo and the
 181 maintenance of the parasites by the primates. We point out our concern regarding
 182 the results obtained, since it presents a risk to the life of NHP, which can
 183 participate in the maintenance of *Leishmania* spp. and contribute to the
 184 transmission cycle for other animals, including humans. Thus, there is the
 185 importance of control strategies for leishmaniasis under the One Health context,
 186 also considering the participation of wild animals as an example of NHP.

187 **Acknowledgements**

188 The authors are grateful to the Coordination for the Improvement of Higher
 189 Education Personnel (CAPES) for financial supporting this study. The authors
 190 thank also the Secretariat for the Environment and Sustainability and the Zoo
 191 Sorocaba team, mainly for the support with the collect of the samples.

192 **References**

- 193 Alcover, M.M., Ribas, A., Guillén, M.C., Berenguer, D., Tomás-Pérez, M., Riera,
 194 C., & Fisa, R. (2020). Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania*
 195 *infantum* in a Mediterranean area. Preventive Veterinary Medicine, 175,
 196 e104874. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.104874.
- 197 Alexander, B., Lozano, C., Barker, D.C., McCann, S.H.E., & Adler, G.H. (1998).
 198 Detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex in wild mammals from
 199 Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Tropica,
 200 69(1), 41-50. DOI: 10.1016/s0001-706x(97)00114-9.
- 201 Arbeláez, N., Moreno, J., Murillo, J., Montoya, A., Robledo, S.M., Vélez, A., &
 202 Vélez, I.D. (2020). First Report of an Urban Case of Canine Visceral

Guiraldí 10

Alexander, B., Lozano, C., Barker, D.C., McCann, S.H.E., & Adler, G.H. (1998). Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Tropica*, 69(1), 41-50. DOI: 10.1016/S0001-708X(97)00114-9.

Arbeláez, N., Moreno, J., Murillo, J., Montoya, A., Robledo, S.M., Vélez, A., & Vélez, I.D. (2020). First Report of an Urban Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Cali, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 289-293. DOI: 10.4269/ajtmh.19-0515.

Azevedo, T.S., Lorenz, C., & Chiaravalloti-Neto, F. (2019). Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 52. DOI: 10.1590/0037-8682-0240-2019.

Bezerra, J.M.T., Araújo, V.T.M., Barbosa, D.S., Martins-Melo, F.R., Wernick, G.L., & Carneiro, M. (2018). Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 12(9): e0006697. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006697.

Cameiro, L.A., Silveira, F.T., Campos, M.B., Brígido, M.C.O., Gomes, C.M.C., Corbett, C.E.P., & Laurent, M.D. (2011). Susceptibility of *Cebus apella* monkey (primates: Cebidae) to experimental *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 53(1), 45-50. DOI: 10.1590/S0036-46652011000100008.

Guiraldí 12

epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/v1420_lpi.pdf.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica (2020b, March 9). Leishmaniose Tegumentar Americana. Frequência de Casos Confirmados Segundo relação com o trabalho e ano de diagnóstico notificados no Estado de São Paulo - período de 2007 a 2020. Retrieved from http://www.saude.sp.gov.br/recursos/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/vigilancia_epidemiologica.htm.

De Bruijn, M.H., & Barker, D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, 52(1), 45-58. DOI: 10.1016/0001-708X(92)90008-j.

Fernandes, A.P., Andrade, H.M., Melo, M.N., Coelho, E.A.F., Avelar, D., & Gazzinelli, R.T. (2013). Leishmaniose visceral canina: novos antígenos para diagnóstico e vacinas. *Revista de saúde pública do SUS/MG*, 1(1), 49-50.

Ferreira, L.T., Gomes, A. H. S., Pereira-Chioccola, V. L. (2015). Caracterização genotípica de isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* provenientes de biópsias de humanos e cães com leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 57(3), 257-262. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015003000013>.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms.

Guiraldí 11

Chomel, B.B., Belotto, A., Meslin, F.X. (2007). Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 6-11. DOI: 10.3201/eid1301.060480.

Conti, R.V., Moura Lane, V.F., Montebello, L., Pinto Junior, V.L. (2016). Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *Journal of vector borne diseases*, 53(2), 99-104.

Costa, A.T., Dias, E.S., Souza, A.G.M., Silva, F.O.L., & Machado-Coelho, G.L.L. (2019). Ecology of phlebotomine sand flies in an area of leishmaniasis occurrence in the Xakriabá Indigenous Reserve, Minas Gerais, Brazil. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 52, e20180474. DOI: 10.1590/0037-8682-0474-2018.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica (2008, March 4). Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos confirmados segundo DIR de infecção e ano de diagnóstico. Estado de São Paulo-período de 1998 a 2008. 2008. Retrieved from <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranja/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/leishmaniose-tegumentar-americana/dados-estatisticos>.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica (2020a, March, 9). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo, 2014 a 2019. Retrieved from http://www.saude.sp.gov.br/recursos/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/vigilancia_epidemiologica.htm.

Guiraldí 13

Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

Lee, C.N., Cavanagh, H.M., Lo, S.T., & Ng, C.S. (2001). Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *British Journal of Biomedical Science*, 58(2), 85-91.

Lombardi, M.C., Turchetti, A.P., Tinoco, H.P., Pessanha, A.T., Soave, S.A., Malta, M.C.C., ...Santos, R.L. (2014). Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(12), 1243-1246. DOI: 10.1590/S0100-736X2014001200017.

Malta, M.C.C., Tinoco, H.P., Xavier, M.N., Vieira, A.L.S., Costa, E.A., & Santos, R.L. (2010). Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 169(1-2), 193-7. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.12.016.

Markle, W.H., & Makhoul, K. (2004). Cutaneous Leishmaniasis: recognition and treatment. *American Family Physician*, 69(6), 1455-1460.

Martins-Melo, F.R., Carneiro, M., Ramos Jr, A.N., Heukelbach, J., Ribeiro, A.L.P., & Wernick, G.L. (2018). The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 12: e0008559. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008559.

Neto, O.J.S., Duarte, S.C., Costa, H.X., & Linhares, G.F.C. (2012). Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Guiraldi 14

290 *chagasi* using PCR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(3), 304-
 291 307. DOI: 10.1590/S1984-2961201200300024.

292 PAHO, 2017 - Pan-American Health Organization (2017, March 8). Informe
 293 Epidemiológico das Américas Informe de Leishmanioses N° 5 – Abril de 2017.
 294 Retrieved from
 295 http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34113/informe_leishmani
 296 [oses_5_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y](oses_5_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

297 PAHO, 2019 - Pan-American Health Organization (2019, March 24).
 298 Leishmanioses, informe epidemiológico das Américas. Informe epidemiológico
 299 N°8 – dezembro de 2019. Retrieved from
 300 [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequ](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
 301 <ence=1&isAllowed=y>.

302 Reis, F.C., Minuzzi-Souza, T.T.C., Neiva, M., Timbó, R.V., Morais, I.O.B., Lima,
 303 T.M., ... Gurgel-Gonçalves, R. (2019). Trypanosomatid infections in captive wild
 304 mammals and potential vectors at the Brasília Zoo, Federal District, Brazil.
 305 *Veterinary Medicine and Science*, 6(2), 248-256. DOI: 10.1002/vms3.216.

306 Roque, A.L.R., & Jansen, A.M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of
 307 *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology:*
 308 *Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004.

309 Santos, R.L., & Oliveira, A.R. (2020). Minireviews: Leishmaniasis in non-human
 310 primates: Clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs.
 311 *Journal of Medical Primatology*, 49, 34–39. DOI: 10.1111/jmp.12441.

Guiraldi 15

312 Schneider, M.C., Aguilera, X.P., Smith, R.M., Moynihan, M.J., da Silva, J.B.Jr,
 313 Aldighieri, S., Almiron, M. (2011). Importance of animal/human health interface in
 314 potential Public Health Emergencies of International Concern in the Americas.
 315 *Revista Panamericana de Salud Publica*, 29(3), 371-379. DOI: 10.1590/s1020-
 316 49892011000500011.

317 Schneider, M.C., Munoz-Zanzi, C., Min, K.D., Aldighieri, S. (2019). "One Health"
 318 From Concept to Application in the Global World. *Global Public Health*. DOI:
 319 10.1083/aorefore/9780190632366.013.29.

320 Sleeman, J.M., Richgels, K.L.D., White, C.L., Stephen, C. (2019). Integration of
 321 wildlife and environmental health into a One Health approach. *Rev Sci Tech*,
 322 38(1), 91-102. DOI: 10.20506/rst.38.1.2944.

323 Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E. (2001). Risk factors for human
 324 disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*
 325 *B: Biological Sciences*, 356(1411), 983-9. DOI: 10.1098/rstb.2001.0888.

326 Tolezano, J.E. (1994). Ecoepidemiological aspects of American Cutaneous
 327 Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo*
 328 *Cruz*, 89(3), 427-434. DOI: 10.1590/S0074-02761994000300026.

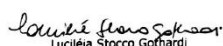
329 WHO - World Health Organization (2018a, March 6). Leishmaniasis:
 330 epidemiological situation. Retrieved from
 331 <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

332 WHO - World Health Organization (2018b, March 8). Leishmaniasis – Cutaneous
 333 Leishmaniasis. Retrieved from [https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis)
 334 <sheets/detail/leishmaniasis>.

Anexos

Anexos

Anexo A: Certificado de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu para a realização da pesquisa.

																	
Comissão de Ética no Uso de Animais Crata através da Portaria DPM nº 611 de 13/12/2012																	
CERTIFICADO Nº 1212/2017-CEUA																	
Certificamos que a proposta intitulada: "Pesquisa de Leishmania spp, em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras.", registrada com o número 1212/2017, sob a responsabilidade da pesquisadora Livia Maisa Guiraldi – sob Orientação da Profa. Simone Baldini Lucheis – Coorientadora Virginia Bodelão Richini Pereira – Colaborador Wesley José dos Santos – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 05 de junho de 2019.																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Finalidade</td> <td>() Ensino (X) Pesquisa Científica</td> </tr> <tr> <td>Vigência da autorização</td> <td>24 de março de 2020</td> </tr> <tr> <td>Espécie/Linhagem/Raça</td> <td>Primata não-humano</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td>02</td> </tr> <tr> <td>Idade/Peso</td> <td>30-55 kg / adulto</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>Macho</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>Biotério Central da UNESP - FMB</td> </tr> </table>		Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	Vigência da autorização	24 de março de 2020	Espécie/Linhagem/Raça	Primata não-humano	Nº de animais	02	Idade/Peso	30-55 kg / adulto	Sexo	Macho	Origem	Biotério Central da UNESP - FMB		
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica																
Vigência da autorização	24 de março de 2020																
Espécie/Linhagem/Raça	Primata não-humano																
Nº de animais	02																
Idade/Peso	30-55 kg / adulto																
Sexo	Macho																
Origem	Biotério Central da UNESP - FMB																
 Lucileia Stocco Gotardi Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP		 Prof. Adjunto Guilherme Antônio Moreira de Barros Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP															
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br																	

Anexo B: Certificado de autorização do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente (SISBIO/ICMBio/MMA).



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57385-3	Data da Emissão: 16/05/2019 11:10:05	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras	03/2017	12/2017
2	Exames moleculares	04/2017	12/2018
3	Exames sorológicos	04/2017	02/2018
4	Desenvolvimento do projeto	03/2017	07/2019
5	Exames parasitológicos	04/2017	02/2018

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Livia Maísa Guiraldi	Desenvolvimento do projeto	406.416.818-60	Brasileira

Observações e ressalvas

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

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa N° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0573850320190516

Página 1/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57385-3	Data da Emissão: 16/05/2019 11:10:05	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Centro Nacional de Primatas	Ananindeua-PA	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
2	Zoológico de Brasília	Brasília-DF	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
3	Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros	Sorocaba-SP	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
4	Jardim Zoológico de Curitiba	Curitiba-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
5	Parque Zoológico Getúlio Vargas	Salvador-BA	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus midas	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus imperator	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus fuscicollis	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus bicolor	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus niger	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saimiri sciureus	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saimiri boliviensis	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta seniculus	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta caraya	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta guariba	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aotus nigriceps	-
13	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aotus azarai	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aotus trivirgatus	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles paniscus	-
16	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles marginatus	-
17	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles chamek	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles belzebuth	-
19	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Brachyteles arachnoides	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus cupreus	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus coimbrai	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus barbarabrownae	-
23	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callimico goeldii	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix penicillata	-
25	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix jacchus	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa N° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0573850320190516

Página 2/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57385-3	Data da Emissão: 16/05/2019 11:10:05	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
26	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix geoffroyi	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix aurita	-
28	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cebus olivaceus	-
29	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cebus albifrons	-
30	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chiropotes satanas	-
31	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chlorocebus aethiops	-
32	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lagothrix lagotricha	-
33	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lagothrix cana	-
34	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lemur catta	-
35	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Leontopithecus rosalia	-
36	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Leontopithecus chrysomelas	-
37	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Macaca fuscata	-
38	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mandrillus sphinx	-
39	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Pan troglodytes	-
40	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Papio hamadryas	-
41	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico argentatus	-
42	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico melanurus	-
43	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chiropotes utahicki	-
44	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saimiri collinsi	-
45	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico rondoni	-
46	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chiropotes sagulatus	-
47	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus vieirai	-
48	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico chrysoleucus	-
49	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus libidinosus	-
50	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus apella	-
51	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus xanthosternus	-
52	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus nigrinus	-
53	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus flavius	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Primates)	Ectoparasita, Pêlo, Sangue, Outras amostras biológicas (Swab conjuntival), Ectoparasita, Sangue, Outras amostras biológicas (Swab conjuntival)

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa N° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0573850320190516

Página 3/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57385-3	Data da Emissão: 16/05/2019 11:10:05	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
2	Método de captura/coleta (Primates)	Captura manual, Puçá, Captura manual, Puçá

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	Outro

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

Código de autenticação: 0573850320190516

Página 4/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57385-3	Data da Emissão: 16/05/2019 11:10:05	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0573850320190516

Página 5/5

Anexo C: Autorização concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas – IEC do Centro Nacional de Primatas no Pará, Brasil (CENP).

CEUA



CERTIFICADO nº 19/2019

Certificamos que a proposta intitulada “**Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnóstico**”, registrada com o nº 12/2019, sob a responsabilidade de **Lívia Maísa Guiraldi**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março de 2019 a agosto de 2020
Espécie/linhagem	<i>Sapajus</i> e/ou <i>Cebus</i> spp
Nº de animais	10
Peso/Idade	3Kg/adultos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	CENP

De acordo com Orientação Técnica nº 8, de 18 de março de 2016 do CONCEA.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 06 de maio de 2019.


Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS


Thiago Vasconcelos dos Santos
Vice Coordenador da CEUA

Anexo D: Declaração de autorização concedida pelo Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, em Salvador, estado da Bahia, Brasil.

 **ZOO**
zoológico de salvador

GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA
SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS
INEMA – PARQUE ZOObOTÂNICO GETÚLIO VARGAS

Salvador, 20 de abril de 2017

Declaração

Declaro, para fins e comprovação junto a Universidade Estadual Paulista- UNESP, que o projeto intitulado **"Pesquisa de Leishmania spp. Em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnósticos"**, desenvolvido pela pesquisadora Livia Maisa Guiraldi, foi analisado e aprovado de acordo com as normas e diretrizes para o desenvolvimento de projetos de pesquisa destinados ao aprofundamento do conhecimento científico e tecnológico no âmbito da instituição Parque Zoobotânico Getúlio Vargas PZBGV, autorizando-se, portanto o início das coletas nos animais em questão.

Vinicius Dantas
Coordenador I / Veterinário
Matrícula. 4660018-5
CRMV 2304 / BA
COPA7 / INEMA


Vinicius Dantas
Coordenador Geral
Zoológico de Salvador

1/1

Anexo E: Declaração de autorização emitida pelo Parque Municipal Quinzinho de Barros, em Sorocaba, estado de São Paulo, Brasil para o uso dos animais na pesquisa.



Secretaria do Meio Ambiente, Parques e Jardins



Sorocaba, 2 de março de 2017

Declaro que o projeto de doutorado "Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras, de Livia Maísa Guiraldi", sob coordenação da Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, recebeu autorização para ser realizado no Zoo de Sorocaba.

Atenciosamente,

Cecília Pessutti

Chefe de seção de Biologia e Veterinária

Zoo de Sorocaba

Anexo F: Autorização do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba, em Curitiba, Estado do Paraná, Brasil para a realização do estudo.



CURITIBA

Prefeitura Municipal de Curitiba
Secretaria Municipal do Meio Ambiente
Rua Presidente Faria, s/nº Centro
80020-290 Curitiba PR
Tel 41 3350-9939 / 3350-8933 / 3350-9940
www.curitiba.pr.gov.br

DECLARAÇÃO

Declaro, para fins de comprovação junto a Universidade Estadual Paulista – UNESP, que o projeto intitulado **“Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnóstico”**, desenvolvido pela pesquisadora Lívia Maísa Guiraldi, portadora do CPF 406.416.801.860, foi analisado e aprovado de acordo com as normas e diretrizes para desenvolvimento de Projetos de Pesquisa destinados ao aprofundamento do conhecimento científico e tecnológico no âmbito do Zoológico de Curitiba, autorizando-se, portanto o início das coletas nos animais-alvos a partir de 07 de março de 2017.

Curitiba, 07 de março de 2017.

Márcia Arzua

Mat. 181.171

Diretora do Dep. de Pesquisa e Conservação da Fauna

Anexo G: Declaração de autorização da Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB), no Distrito Federal, Brasil para início das coletas.



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE
FUNDAÇÃO JARDIM ZOOLOGICO DE BRASÍLIA
SUPERINTENDÊNCIA DE CONSERVAÇÃO E PESQUISA
DIRETORIA DE PESQUISA



DECLARAÇÃO

Declaro, para fins de comprovação junto a Universidade Estadual Paulista - UNESP, que o projeto intitulado *"Pesquisa de Leishmania spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnóstico"*, desenvolvido pela pesquisadora Livia Maísa Guiraldi, portadora do CPF nº 406.416.8018-60, foi analisado e aprovado de acordo com as normas e diretrizes para o desenvolvimento de Projetos de Pesquisa destinados ao aprofundamento do conhecimento científico e tecnológico no âmbito da Fundação Jardim Zoológico de Brasília – FJZB, autorizando-se, portanto o início das coletas nos animais-alvos a partir de 07 de março de 2017.

Brasília, 14 de março de 2017.

FRANCISCO JOSÉ FELJÓ PAIVA
Diretor de Pesquisa da FJZB
Matrícula: 80.059-7

Anexo H: Coloração de lâminas de extensão sanguínea pela técnica de *Giemsa*.

As lâminas de extensão sanguínea são colocadas em um suporte e cobertas com álcool metílico/metanol (CH_3OH) durante cinco minutos para fixação do material. Em seguida, banha-se as lâminas com uma solução de corante de *Giemsa* preparada fresca a 5% durante 30 minutos. Após este período, as lâminas são enxaguadas em fina água corrente e espera-se transcorrer o tempo de secagem. Guarda-se as lâminas em laminário, o qual pode permanecer em temperatura ambiente.

Anexo I: Meio de cultura NNN (*Novy, McNeal, Nicolle*).

No preparo de 150mL do meio NNN, dilui-se 0,99g de NaCl e 2,25g de Ágar Base (Bacto Ágar) em Erlenmeyer juntamente com 150mL de Água Milli-Q®. Tampar o frasco com algodão hidrofóbico, papel laminado e papel pardo. Após totalmente diluído, autoclave-se a solução, pipetas de vidro graduadas (10mL) e tubos rosqueados em que serão distribuídos o meio NNN por 15 minutos à 121°C. Após autoclavação, esperar esfriar até o ponto em que o dorso da mão suporte a temperatura. Acrescentar à esta solução, 20mL de sangue bovino desfibrinado (o frasco contendo o sangue deve ser homogeneizados manualmente, por inversão, desde o momento da punção). Colocar em câmara de fluxo laminar sob radiação de luz ultravioleta (UV) por 15 minutos o frasco contendo a solução salina acrescida do sangue, as pipetas e os tubos rosqueados. Antes de proceder a distribuição nos tubos, homogeneizar bem a solução. Adiciona-se 5mL do meio em cada tubo e os mantêm inclinados para a formação de um bixel no fundo do tubo (permitindo-se o perfeito crescimento das formas promastigotas) e veda-se a tampa com *Parafilm M*®. O meio precisa ser mantido em controle de esterilidade em estufa à 37°C durante 48 horas. Após este controle, embrulha-se os tubos em papel laminado e armazena-se sob refrigeração de 2-8°C até o momento de uso.

Anexo J: Meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*).

Para preparar 250mL do meio, acrescentar em Kitassato estéril, 2g de Na_2HPO_4 , 1g de NaCl, 0,1g de KCl e 44,5mL de Água Milli-Q®. Foi inserido ao Kitassato, um filtro de aço (Millipore®), com membrana de 22µm de poro (Millipore®). A solução foi autoclavada junto ao filtro por 15 minutos à 121°C. Em um Erlenmeyer de 250mL, dilui-se 0,75 g de infusão de fígado (Difco™), 0,5 g de Dextrose (Oxoid®) e 1,25 g de Tryptose (Vetec®) em 100mL de água. Ajusta-se o pH para 7,4. Filtra-se esta solução no Kitassato, acoplado-se ao mesmo uma bomba à vácuo. Após a filtração acrescenta-se, em capela de fluxo laminar, 5,5mL de hemoglobina bovina à 2,2% (BBL™), 30mL de soro fetal bovino à 11% (Nutricell®) e 1mL (20mg) de gentamicina (*Gentocin*®) e distribui-se 40mL em tubos rosqueados estéreis. Realiza-se controle de esterilidade por 48 horas em estufa à 37°C, utilizando-se caldo BHI (*Brain Heart Infusion*). Após o controle de esterilidade, os tubos são mantidos em refrigeração de 2-8°C até o momento de uso.

Anexo K: Manutenção dos antígenos de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) e *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/IOC/L0575).

Os antígenos de promastigotas foram mantidos em tubos rosqueados contendo-se 10mL do meio LIT acrescidos de 5mL do meio NNN. Os repiques de manutenção foram realizados a cada quinze dias, no interior de capela de fluxo laminar, transferindo-se uma alíquota do tubo de manutenção mais recente (repique anterior) e observando-se uma gota entre lâmina e lamínula em microscopia óptica no aumento de 40X a fim de se avaliar o crescimento e motilidade das formas promastigotas. Dos tubos em que apresentar maior quantidade e melhor motilidade, repica-se uma alíquota de 1mL para dois novos tubos contendo LIT e NNN. As culturas devem ser mantidas em estufa B.O.D (ELETROLAB- EL 101/2-Brasil) à 26°C (considerada temperatura ideal para crescimento e desenvolvimento dos antígenos).

Anexo L: Obtenção dos antígenos de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) e *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/IOC/L0575) e confecção das lâminas.

Para se obter uma quantidade viável de promastigotas e deixar o meio limpo, fez-se necessário repicar 0,5mL da cultura (em meio NNN e LIT) para um novo tubo rosqueado contendo 10mL apenas de meio LIT. Para uma maior quantidade e concentração dos antígenos em lâminas, procedeu-se dois repiques em LIT em intervalo de sete dias. Após observação do crescimento de promastigotas em microscopia óptica, centrifuga-se 10mL de LIT a 3000 rpm (rotação por minuto) durante 10 minutos. Despreza-se o sobrenadante e acrescenta-se 5mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (SST). Centrifuga-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos. Despreza-se o sobrenadante. Repete-se o processo por mais duas vezes e quantifica-se os agentes em microscópio óptico. Se a quantidade de parasitos estiver baixa (inferior a 20-30 por campo), centrifuga-se novamente a fim de se obter a concentração desejada. Porém, se os parasitos estiverem muito concentrados, deve-se diluir em SST. As lâminas utilizadas na técnica de RIFI apresentam duas fileiras de seis orifício cada (perfurações). Fixa-se os antígenos, pipetando-se 10µL dessa suspensão de promastigotas em cada orifício da lâmina. Deixar a suspensão por aproximadamente três minutos e aspira-se permitindo, que fique em cada orifício, somente uma fina película. As lâminas já fixadas, permanecem em temperatura ambiente para secagem e em seguida, são mantidas em laminário e refrigeradas à -20°C até o momento de uso.

Anexo M: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) - Camargo (1966)².

Para realização da diluição inicial, foram utilizadas microplacas contendo 190µL de solução salina tamponada 0,01M com pH 7,2 (SST) e 10µL do soro das amostras para a diluição inicial (primeira diluição) de 1:20. Pipetou-se e distribui-se para a próxima coluna da microplaca 100µL dessa primeira diluição em 100µL de solução de PBS (Phosphate-Buffered Saline) para obtenção da diluição de 1:40 (segunda diluição), que foi utilizada na triagem da reação. Nas lâminas que já haviam sido fixadas os antígenos de interesse, distribui-se 10µL de soro diluído (segunda diluição), e incubou-se em câmara úmida à 37°C durante 30 minutos. Lavou-se as lâminas duas vezes utilizando-se STS por 10 minutos e em seguida foram secas em estufa. Utilizou-se o conjugado específico contendo Anti-Anticorpo IgG de macaco (IgG – γ -chain specific - SAB3700765 – Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), diluído em solução de Azul de Evans a 20%. O conjugado foi testado nas diluições de 1:400; 1:425; 1:450; 1:475; 1:500; 1:525; 1:550; 1:575 e 1:600. Estabeleceu-se como ponto de diluição 1:500, no qual o controle positivo emitiu imunofluorescência na coloração verde e o negativo não. Distribuiu-se 10µL do conjugado para cada diluição e incubou-se novamente em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Procedeu-se mais duas lavagens com PBS por 10 minutos e as lâminas foram secas em estufa. Montou-se cada lâmina utilizando-se glicerina tamponada pH 8,5 e cobertas com lamínulas de 24x60mm. Foram examinadas em microscópio de imunofluorescência no aumento de 40X. Durante a leitura das amostras, considerou-se positivas as amostras de soro que apresentaram titulação igual a 40. Os soros positivos nessa diluição, continuaram a ser avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640) para se determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum*, anti-*Leishmania braziliensis* e anti-*Leishmania amazonensis*.

² CAMARGO, ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med Trop São Paulo. 1966; 8: 227-234.

Utilizou-se também, o conjugado de anti-humano/FITC da Bio-Manguinhos®. Para tanto, utilizou-se as lâminas; antígeno de *Leishmania*; conjugado anti-humanos/FITC; glicerina tamponada e Azul de Evans (0,1%) fornecidos pelo kit. Ferveu-se as lâminas em água destilada durante 30 minutos. Após fervura, as lâminas permaneceram estocadas em álcool comercial até o momento de uso. As lâminas foram delicadamente limpas e secas utilizando-se gaze. Sensibilizou-se todos os doze orifícios das lâminas pingando-se 10µL do antígeno em cada orifício, homogeneizando sempre durante o preparo. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente *overnight* a fim do antígeno poder fixar-se na lâmina. Fez-se necessário a realização de um “protocolo de trabalho” para manter organizado a localização dos controles positivos (CP); controle negativo (CN) e dos controles do conjugado (PBS) em cada lâmina. Procedeu-se as diluições do CP a partir de 1:40; 1:80; 1:160 e 1:320 e diluiu-se o CN em 1:40. Adicionou-se 10µL do soro das amostras em cada orifício. As lâminas foram incubadas em câmara úmida durante 30 minutos à 37°C no interior de estufa. Procedeu-se as lavagens das lâminas (três vezes em PBS), em cubas de lavagem em banhos de cinco minutos cada. Lavou-se rapidamente as lâminas em água destilada e colocou-as em estufa à 37°C por um período de 10 minutos para secagem. Enquanto isso, preparou-se a solução de PBS-Azul de Evans a 0,004%, para isso, colocou-se 120µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880µL de PBS. Diluiu-se o conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (20µL do conjugado + 980µL PBS com Azul de Evans). Adicionou-se 15µL das diluições do conjugado nos orifícios correspondentes. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos à 37°C no interior de estufa. Lavou-se (três vezes) as lâminas com PBS em cuba de lavagem e cada lavagem durou cinco minutos e em seguida todas as lâminas foram lavadas rapidamente uma única vez em água destilada. As lâminas permaneceram por 10 minutos em estufa à 37°C para secagem. Foi adicionado três gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas e cobertas com lamínulas. As lâminas permaneceram ao abrigo de luz e umidade. Durante a leitura das amostras, considerou-se positivas as amostras de soro que apresentaram titulação igual a 40. Os soros positivos nessa diluição, continuaram a ser avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640) para se determinar a titulação final de anticorpos.

Anexo N: Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em sangue
- Kit comercial *Illustra Blood GenomicPrep* (GE Healthcare®).

Descongelou-se as amostras de sangue que estavam armazenadas em microtubos. Acrescentou-se em microtubos livres de DNAsas e RNAsas, 20µL de proteinase K juntamente com 300µL da amostra de sangue. Homogeneizou-se em vórtex durante 10 segundos. Adicionou-se 400µL de tampão de extração (*Lysis buffer-extraction solution*) a fim de suspender todas as células brancas. Homogeneizou-se no vórtex por mais 15 segundos. Deixou-se os tubos em temperatura ambiente por um período de 10 minutos. Transferiu-se o conteúdo para um tubo coletor junto à uma coluna (fornecida pelo kit) e centrifugou-se à 11000 RCF por um minuto. Descartou-se o sobrenadante e foi acrescentado 500µL de solução de *Lise* à coluna. Novamente centrifugou-se à 11000 RCF por três minutos. Desprezou-se o tubo coletor e o sobrenadante e colocou-se a coluna em um microtubo de 1,5mL estéril. Adicionou-se 100µL de solução de eluição (*Elution Buffer*) que estava previamente aquecido à 70°C. Incubou-se por um minuto. Os microtubos foram centrifugados à 11000 RCF por um minuto e a amostra de DNA extraída foi mantida sob refrigeração à -20°C até o momento de uso.

Anexo O: Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em amostras de suabe conjuntival - Protocolo de *Salting-out* descrito por John et al. (1991) e Lahiri & Numberger (1991) com modificações de Benassi et al. (2017)³.

O método de *Salting-out* descrito envolve a desidratação e precipitação das proteínas celulares com o uso de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). Suabes contendo amostras de células epiteliais da conjuntiva permaneceram em suspensão em 300µL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) desde o momento de sua colheita. Em cada microtubo contendo suabe e PBS foi adicionado 300µL de Solução Tampão de Proteinase K (3,75mL de NaCl à 5M; 12,0mL de EDTA à 0,5M; qsp 50mL de água ultra-pura). Homogeneizou-se em vórtex por oito segundos e manteve-se os microtubos em temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, pipetou-se 200µL da solução do microtubo com o suabe para um novo microtubo livre de DNase e RNase e adicionou-se 230µL da Solução Mix (para cada amostra: 200µL de água ultra-pura; 20µL de SDS à 10% (detergente que irá extrair os lipídeos) e 10µL de proteinase K 25mg/mL (que atua sobre as proteínas)). Agitou-se por oito segundos em vórtex. Os microtubos foram aquecidos em banho-seco à 54°C por três horas (ou até que a solução fique completamente transparente), agitando-se periodicamente. Após este período, foram mantidos em geladeira por 15 minutos. Adicionou-se 140µL de NaCl à 5M gelado e em seguida agitou-se em vórtex por oito segundos. Centrifugou-se à 13000 RPM por 10 minutos em temperatura ambiente (para peletização da proteína desnaturada). Transferiu-se 400µL do sobrenadante para um novo microtubo livre de DNase e RNase. Adicionou-se 1mL de álcool absoluto gelado e homogeneizou-se por inversão três vezes. Os tubos foram mantidos *overnight* à -20°C (*freezer*). Após este período, centrifugou-se à 12000 RPM por 20 minutos à 4°C.

³ Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol*. 2017; 177:93-97.

John SWM, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(2):408.

Lahiri DK, Numberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(19):5444.

Descartou-se o sobrenadante, mantendo-se apenas o *pellet* no interior dos microtubos. Os microtubos foram mantidos invertidos em papel absorvente durante cinco minutos, para retirada do excesso de álcool. Em seguida, foram mantidos com as tampas abertas em banho-seco à 54°C por 15 minutos para secagem. Adicionou-se 40µL de água ultra-pura e homogeneizou-se com a própria ponteira. Por fim, aqueceu-se em banho-seco à 54°C por 15 minutos para diluição do DNA. O material extraído permaneceu à -20°C até o momento de uso pelas técnicas moleculares.

Anexo P: Quantificação de DNA das amostras.

Para verificação da quantidade de DNA extraído das amostras, as mesmas foram submetidas ao aparelho de quantificação (NanoVue® Plus GE) do Laboratório de Sanidade Animal de Bauru da APTA. Primeiramente, calibrou-se o aparelho utilizando-se 2µL de água ultrapura. Após a calibração, acrescentou-se 2µL de cada amostra do DNA extraído e acionou-se a leitura do aparelho para obtenção dos resultados.

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda eletromagnético equivalente à 260nm, enquanto proteínas absorvem luz à 280nm. A estimativa de pureza de DNA na amostra é verificada pela relação de absorbância 260/280. Nesta reação, valores entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. Valores abaixo de 1,8 podem indicar excesso de proteínas.⁴

⁴ Silveira MC. A. Procedimentos em técnicas laboratoriais vegetais. 94 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Tocantins. 2010.

Apêndices

Apêndices

Apêndice A: Tabela de identificação dos animais pertencentes ao Centro Nacional de Primatas no Pará.

ID	Data da coleta	Sexo	Sangue	Soro	Suabe	Lâmina
PA01	24/10/2019	Fêmea	X	X	X	X
PA02	24/10/2019	Macho	X	X	X	X
PA03	24/10/2019	Fêmea	X	X	X	X
PA04	24/10/2019	Fêmea	X	X	X	X
PA05	24/10/2019	Macho	X	X	X	X
PA06	24/10/2019	Macho	X	X	X	X
PA07	24/10/2019	Fêmea	X	X	X	X
PA08	24/10/2019	Macho	X	X	X	X
PA09	24/10/2019	Fêmea	X	X	X	X
PA10	24/10/2019	Macho	X	X	X	X

Legenda: ID: Identificação; X: Presença do material biológico.

Apêndice B: Tabela de identificação dos animais pertencentes ao Zoológico de Salvador.

ID	Espécie	Data da coleta	Sexo	Sangue	Soro	Suabe	Lâmina
BA01	<i>Sapajus xanthosternos</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA02	<i>Sapajus xanthosternos</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA03	<i>Sapajus xanthosternos</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA04	<i>Sapajus xanthosternos</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA05	<i>Sapajus xanthosternos</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA06	<i>Sapajus xanthosternos</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA07	<i>Sapajus xanthosternos</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA08	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA09	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA10	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA11	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA12	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA13	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA14	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA15	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA16	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA17	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA18	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA19	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X

BA20	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA21	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA22	<i>Sapajus flavius</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA23	<i>Sapajus flavius</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA24	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X		X
BA25	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X		X
BA26	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X		X
BA27	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X		X
BA28	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X		X
BA29	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Macho	X	X		X
BA30	<i>Sapajus xanthosternos</i>	07/08/2017	Fêmea	X	X		X
BA31	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA32	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA33	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA34	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA35	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA36	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA37	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA38	<i>Alouatta caraya</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA39	<i>Alouatta caraya</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA40	<i>Alouatta caraya</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA41	<i>Alouatta caraya</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X

BA42	<i>Alouatta caraya</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA43	<i>Alouatta caraya</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA44	<i>Lagothrix lagotricha</i>	08/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA45	<i>Lagothrix lagotricha</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA46	<i>Lagothrix lagotricha</i>	08/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA47	<i>Ateles paniscus</i>	09/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA48	<i>Ateles paniscus</i>	09/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA49	<i>Ateles paniscus</i>	09/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA50	<i>Ateles paniscus</i>	09/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA51	<i>Ateles marginatus</i>	09/08/2017	Macho	X	X	X	X
BA52	<i>Ateles marginatus</i>	09/08/2017	Fêmea	X	X	X	X
BA53	<i>Ateles marginatus</i>	09/08/2017	Fêmea	X		X	
BA54	<i>Sapajus flavius</i>	08/08/2017	Fêmea		X	X	X

Legenda: ID: Identificação; X: Presença do material biológico.

Apêndice C: Tabela de identificação dos animais pertencentes ao Zoológico de Sorocaba.

ID	Espécie	Data de coleta	Sangue	Soro	Suabe	Lâmina
SP01	<i>Alouatta caraya</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP02	<i>Alouatta caraya</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP03	<i>Alouatta caraya</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP04	<i>Alouatta caraya</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP05	<i>Alouatta caraya</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP06	<i>Alouatta guariba</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP07	<i>Alouatta guariba</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP08	<i>Alouatta guariba</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP09	<i>Alouatta guariba</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP10	<i>Ateles chamek</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP11	<i>Ateles chamek</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP12	<i>Ateles marginatus</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP13	<i>Ateles marginatus</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP14	<i>Ateles marginatus</i>	Maio/2017	X		X	X
SP15	<i>Ateles marginatus</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP16	<i>Ateles marginatus</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP17	<i>Ateles marginatus</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP18	<i>Ateles marginatus</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP19	<i>Brachyteles arachnoides</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP20	<i>Brachyteles arachnoides</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP21	<i>Brachyteles arachnoides</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP22	<i>Brachyteles arachnoides</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP23	<i>Sapajus nigritus</i>	Maio/2017	X	X	X	X
SP24	<i>Cebus olivaceus</i>	Maio/2017	X	X	X	X

SP25	<i>Alouatta seniculus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP26	<i>Alouatta seniculus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP27	<i>Ateles chamek</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP28	<i>Ateles marginatus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP29	<i>Ateles marginatus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP30	<i>Ateles marginatus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP31	<i>Ateles marginatus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP32	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP33	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP34	<i>Plecturocebus vieirai</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP35	<i>Aotus trivirgatus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP36	<i>Aotus trivirgatus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP37	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Março/2018	X		X	X
SP38	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Março/2018	X		X	X
SP39	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Março/2018	X		X	X
SP40	<i>Papio hamadryas</i>	Março/2018	X	X		
SP41	<i>Papio hamadryas</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP42	<i>Callithrix jacchus</i>	Março/2018	X	X	X	X
SP43	<i>Sapajus nigritus</i>	Dezembro/2018	X	X	X	X
SP44	<i>Chiropotes utahickae</i>	Dezembro/2018	X	X	X	
SP45	<i>Alouatta seniculus</i>	Dezembro/2018	X	X	X	X
SP46	<i>Plecturocebus vieirai</i>	Dezembro/2018	X	X	X	X
SP47	<i>Plecturocebus vieirai</i>	Dezembro/2018	X	X	X	X
SP48	<i>Plecturocebus vieirai</i>	Dezembro/2018	X	X	X	X

Legenda: ID: Identificação; X: Presença do material biológico.

Apêndice D: Tabela de identificação dos animais pertencentes ao Zoológico de Curitiba.

ID	Espécie	Data da coleta	Sexo	Sangue	Soro	Suabe	Lâmina
PR01	<i>Ateles chamek</i>	08/02/2017	Macho	X	X		X
PR02	<i>Ateles chamek</i>	08/02/2017	Macho	X	X		X
PR03	<i>Ateles chamek</i>	08/02/2017	Fêmea	X	X		X
PR04	<i>Ateles chamek</i>	08/02/2017	Macho	X	X		X
PR05	<i>Ateles chamek</i>	08/02/2017	Macho	X	X		X
PR06	<i>Ateles chamek</i>	08/02/2017	Macho	X	X		X
PR07	<i>Ateles chamek</i>	20/04/2017	Macho	X	X	X	X
PR08	<i>Ateles chamek</i>	20/04/2017	Macho	X	X	X	X
PR09	<i>Sapajus apella</i>	23/05/2018	Não informado	X	X	X	X
PR10	<i>Sapajus apella</i>	23/05/2018	Não informado	X	X	X	X
PR11	<i>Sapajus apella</i>	23/05/2018	Não informado	X	X	X	X
PR12	<i>Saimiri sciureus</i>	23/05/2018	Não informado	X	X	X	X
PR13	<i>Callithrix penicillata</i>	20/11/2017	Macho	X		X	
PR14	<i>Callithrix penicillata</i>	31/05/2017	Fêmea	X	X	X	X
PR15	<i>Callithrix penicillata</i>	20/11/2017	Fêmea	X	X	X	X
PR16	<i>Callithrix penicillata</i>	20/11/2017	Macho	X	X	X	X
PR17	<i>Callithrix penicillata</i>	20/11/2017	Fêmea	X	X	X	X
PR18	<i>Callithrix penicillata</i>	20/11/2017	Fêmea	X	X	X	X

Apêndice E: Tabela de identificação dos animais pertencentes ao Zoológico de Brasília.

ID	Espécie	Data de coleta	Sexo	Sangue	Soro	Suabe	Lâmina
DF01	<i>Saguinus imperator</i>	07/03/2017	Macho		X		
DF02	<i>Saguinus niger</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF03	<i>Callicebus cupreus</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF04	<i>Aotus nigriceps</i>	07/03/2017	Macho		X		
DF05	<i>Saguinus niger</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF06	<i>Aotus nigriceps</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF07	<i>Callithrix penicillata</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF08	<i>Aotus nigrieps</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF09	<i>Mico chrysoleucus</i>	07/03/2017	Macho		X		
DF10	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF11	<i>Aotus nigriceps</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF12	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	07/03/2017	Macho		X		
DF13	<i>Leontopithecus rosalia</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF14	<i>Callithrix geoffroyi</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF15	Híbrido (<i>Callithrix penicillata</i> X <i>Callithrix jacchus</i>)	07/03/2017	Fêmea		X		
DF16	<i>Callithrix penicillata</i>	07/03/2017	Macho		X		
DF17	<i>Alouatta belzebul</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF18	<i>Alouatta belzebul</i>	07/03/2017	Macho		X		
DF19	<i>Alouatta seniculus</i>	07/03/2017	Macho		X		
DF20	<i>Alouatta seniculus</i>	07/03/2017	Fêmea		X		
DF21	<i>Alouatta seniculus</i>	07/03/2017	Fêmea		X		

DF22	<i>Alouatta caraya</i>	08/03/2017	Fêmea		X		
DF23	<i>Alouatta caraya</i>	08/03/2017	Fêmea		X		
DF24	<i>Alouatta caraya</i>	08/03/2017	Macho		X		
DF25	<i>Alouatta caraya</i>	08/03/2017	Macho		X		
DF26	<i>Saimiri boliviensis</i>	09/03/2017	Macho		X		
DF27	<i>Logothrix cana</i>	09/03/2017	Macho		X		
DF28	<i>Logothrix cana</i>	09/03/2017	Macho		X		
DF29	<i>Lophocebus aterrimus</i>	09/03/2017	Fêmea		X		
DF30	<i>Cebus albifrons</i>	09/03/2017	Macho		X		
DF31	<i>Chiropotes satanas</i>	10/03/2017	Macho		X		
DF32	<i>Chiropotes satanas</i>	10/03/2017	Fêmea		X		
DF33	<i>Sapajus libidinosus</i>	10/03/2017	Macho		X		
DF34	<i>Sapajus libidinosus</i>	10/03/2017	Fêmea		X		
DF35	<i>Alouatta caraya</i>	10/03/2017	Fêmea		X		
DF36	<i>Aotus nigriceps</i>	05/10/2016	Não informado	X	X		
DF37	<i>Aotus nigriceps</i>	05/10/2016	Fêmea	X			X
DF38	<i>Callicebus cupreus</i>	05/10/2016	Fêmea	X	X		X
DF39	<i>Saguinus niger</i>	05/10/2016	Fêmea	X	X		X
DF40	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	05/10/2016	Não informado	X	X		X
DF41	<i>Aotus nigriceps</i>	05/10/2016	Macho		X		
DF42	<i>Aotus nigriceps</i>	05/10/2016	Fêmea		X		
DF43	<i>Aotus nigriceps</i>	05/10/2016	Fêmea		X		
DF44	<i>Saguinus niger</i>	05/10/2016	Fêmea				X
DF45	Sem identificação	27/03/2018	Não informado	X			

DF46	<i>Alouatta caraya</i>	27/03/2018	Fêmea	X	X
DF47	Sem identificação	27/03/2018	Não informado	X	X
DF48	Sem identificação	27/03/2018	Não informado	X	X
DF49	Sem identificação	28/03/2018	Macho	X	X
DF50	Sem identificação	28/03/2018	Fêmea	X	X
DF51	Sem identificação	28/03/2018	Macho	X	X
DF52	Sem identificação	27/03/2018	Não informado	X	X
DF53	<i>Saguinus bicolor</i>	27/03/2018	Não informado	X	X
DF54	<i>Saguinus bicolor</i>	27/03/2018	Fêmea	X	X
DF55	Sem identificação	27/03/2018	Não informado	X	X
DF56	<i>Alouatta caraya</i>	27/03/2018	Macho	X	X
DF57	Sem identificação	27/03/2018	Fêmea	X	X
DF58	Sem identificação	28/03/2018	Fêmea	X	X
DF59	Sem identificação	28/03/2018	Não informado	X	X

Legenda: ID: Identificação; X: Presença do material biológico.

Apêndice F: Registros fotográficos



Figura 33: Registros fotográficos do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoológico Salvador). Em A, ilha dos primatas da espécie *Sapajus xanthosternos* (macaco-prego-de-peito-amarelo). O local é aberto e não contém grades, permitindo a livre circulação de insetos vetores. Em B, representante da espécie *Sapajus xanthosternos*. Em C, representantes da espécie *Ateles marginatus* (macaco-aranha-de-testa-branca) e em D, exemplar da espécie *Ateles paniscus* (macaco-aranha-de-cara-vermelha) que fizeram parte deste estudo. Fonte: arquivo pessoal.

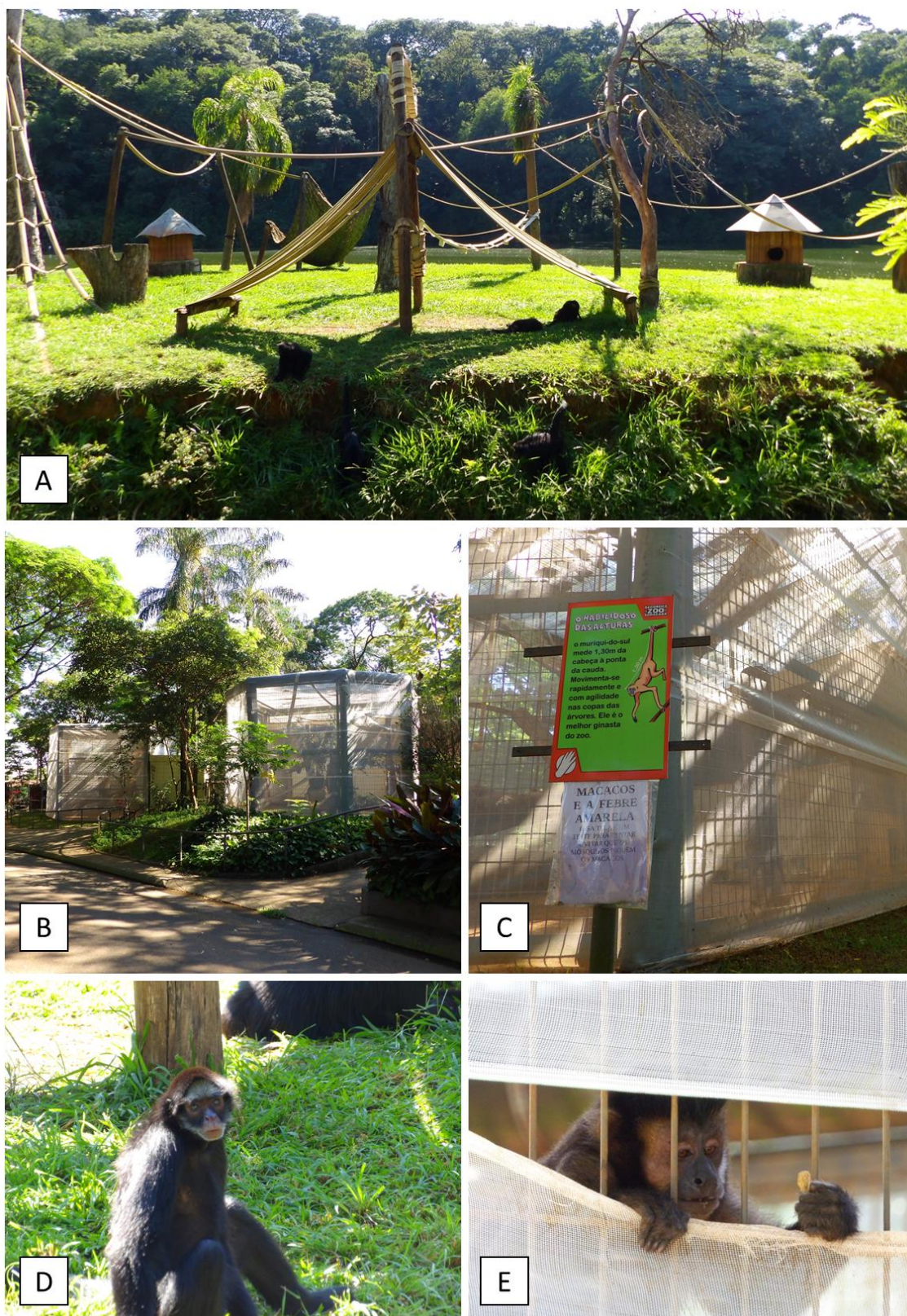


Figura 34: Registros fotográficos do Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zoológico Sorocaba). Em A, registros da ambientalização da ilha dos primatas. Em B e C, recintos protegidos com telas que não permitiam a circulação de insetos vetores. Como a visita foi realizada em abril de 2018, haviam muitos casos de febre amarela no estado de São Paulo, embora dificultasse a visualização dos primatas destes recintos, eles estavam bem protegidos contra a infecção. Em D primata da espécie *Ateles marginatus* (macaco-aranha-de-testa-branca) e em E, primata da espécie *Brachyteles arachnoides* (muriqui-do-sul). Fonte: arquivo pessoal.



Figura 35: Registros fotográficos do Jardim Zoológico Municipal de Curitiba (Zoológico Curitiba). Em A e D, exemplares que fizeram parte da pesquisa da espécie *Ateles chamek* (macaco-aranha-de-cara-preta). Em B, contenção física do primata *Callithrix penicillata* (sagui-de-tufo-preto) e em C, coleta de material biológico (sangue) da veia femural do primata *Sapajus apella* (macaco-prego). Fonte: arquivo pessoal.



Figura 36: Registros fotográficos do Jardim Zoológico de Brasília (Zoológico Brasília). Em A, ilha dos primatas. Em B, exemplar da ilha dos primatas da espécie *Sapajus libidinosus* (macaco-prego-amarelo). Em C, primata da espécie *Aotus nigriceps* (macaco-da-noite). Em D, coleta de sangue da veia braquial de um *Alouatta caraya* (bugio-preto). E em E, primata da espécie *Alouatta seniculus* (bugio-vermelho). Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice G: Lâmina de extensão sanguínea do primata do Pará - PA09 (*Ateles marginatus*) positiva com formas compatíveis com o protozoário *Plasmodium* spp., agente causador da malária.

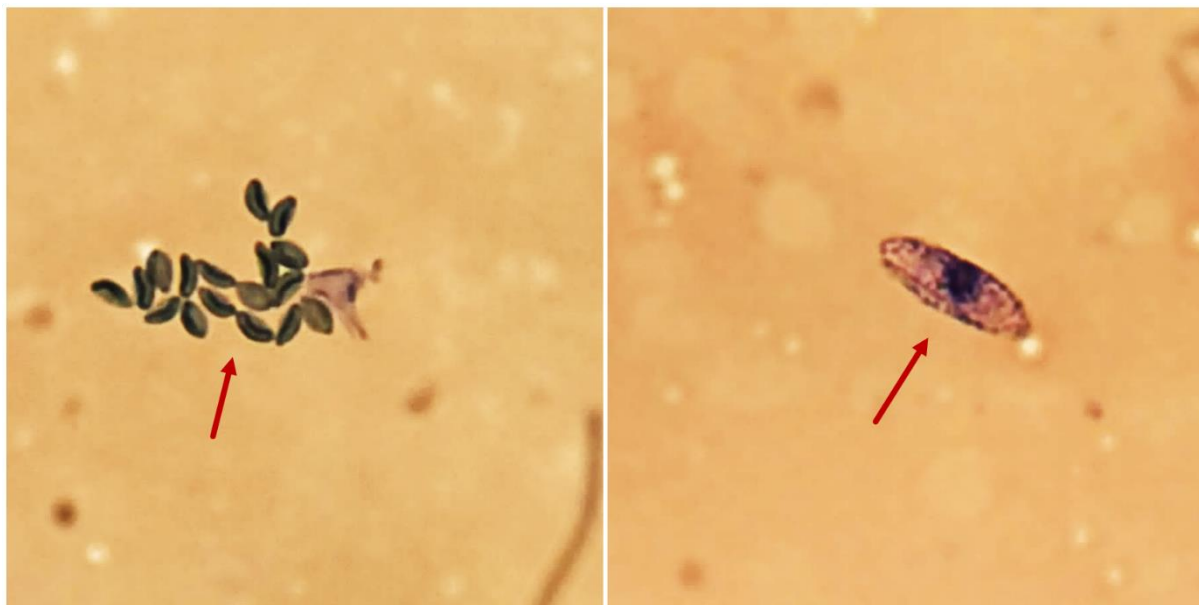


Figura 37: Lâmina de extensão sanguínea do primata PA09 com formas sugestivas de *Plasmodium* spp. (Aumento de 1000X). Coloração de Giemsa, microscopia óptica, escala de 50µM. (Fonte: arquivo pessoal).

Apêndice H: Quanificação do DNA das amostras de sangue e células conjuntivais (suabes).

Quantificação do DNA				
Locais	Sangue		Suabe	
	Concentração (ng/μl)	DNA Relação 260/280	Concentração DNA (ng/μL)	Relação 260/280
CENP				
PA01	7,4	2,349	9,1	2,351
PA02	8,2	1,874	2,2	5,375
PA03	12,0	1,784	9,1	3,291
PA04	14,3	2,150	7,2	3,405
PA05	10,9	2,396	9,5	3,150
PA06	12,7	1,801	9,5	2,676
PA07	9,0	1,593	6,0	2,727
PA08	17,5	1,331	6,3	2,203
PA09	9,4	2,226	13,4	2,086
PA10	11,4	1,629	7,7	2,369
Zoológico Salvador				
BA01	69,0	1,704	25,5	1,214
BA02	42,0	1,826	14,1	1,500
BA03	66,5	1,797	10,6	1,185
BA04	41,0	1,864	32,5	1,477
BA05	78,5	1,826	6,6	1,650
BA06	60,0	1,846	7,9	1,411
BA07	38,5	1,833	17,0	2,048
BA08	45,0	1,875	18,0	1,429
BA09	68,5	1,827	7,2	1,644
BA10	50,5	1,870	11,4	1,916
BA11	53,5	1,597	13,5	1,582
BA12	94,5	1,750	17,5	1,832
BA13	48,0	1,811	24,5	1,441
BA14	44,5	1,816	9,8	1,970
BA15	59,5	1,750	9,4	1,908
BA16	51,0	1,789	9,2	1,634
BA17	33,5	1,811	78,0	1,857
BA18	109,5	1,776	6,9	1,671
BA19	66,5	1,727	8,9	1,825
BA20	129,5	1,786	13,0	1,494
BA21	100,5	1,779	13,7	1,702
BA22	45,0	1,875	27,0	1,915
BA23	38,0	1,810	23,5	1,709
BA24	53,0	1,860	-	-

BA25	47,0	1,774	-	-
BA26	67,5	1,800	-	-
BA27	81,5	1,753	-	-
BA28	59,5	1,831	-	-
BA29	48,0	1,882	-	-
BA30	61,0	1,649	-	-
BA31	92,5	1,832	7,1	1,578
BA32	41,5	1,976	7,7	1,692
BA33	35,5	1,919	11,4	1,541
BA34	88,5	1,806	14,3	2,072
BA35	72,5	1,883	16,1	1,789
BA36	47,0	1,918	7,6	1,434
BA37	54,5	1,758	26,5	1,970
BA38	124,0	1,810	7,0	1,130
BA39	29,5	1,439	13,6	1,807
BA40	116,5	1,688	5,0	2,041
BA41	162,0	1,636	4,0	5,267
BA42	218,5	1,836	15,8	1,909
BA43	69,5	1,878	4,7	3,100
BA44	124,0	1,837	5,6	3,294
BA45	64,0	1,753	5,0	3,448
BA46	61,0	1,848	6,9	4,152
BA47	83,5	1,796	18,5	1,602
BA48	76,5	1,739	17,5	2,174
BA49	54,0	1,662	17,0	2,222
BA50	136,5	1,761	18,5	2,298
BA51	45,0	1,957	10,0	2,031
BA52	85,0	1,771	10,9	2,466
BA53	69,5	1,829	30,5	1,694
Zoológico Sorocaba				
SP01	39,0	1,773	-	-
SP02	-3,6	1,756	-	-
SP03	47,0	1,808	11,0	1,667
SP04	14,9	2,055	10,6	2,120
SP05	54,5	1,817	5,6	2,113
SP06	21,5	1,777	10,0	2,427
SP07	27,5	1,792	6,3	3,405
SP08	26,5	1,860	9,2	2,033
SP09	36,5	1,872	6,7	2,078
SP10	20,0	1,786	9,1	2,235
SP11	4,4	1,706	6,2	3,049
SP12	53,0	1,893	4,7	5,167
SP13	25,0	1,724	59,5	1,526

SP14	31,0	1,676	3,3	9,286
SP15	6,5	1,743	4,6	5,750
SP16	89,0	1,780	3,3	5,417
SP17	14,9	1,923	8,9	2,419
SP18	67,5	1,753	4,1	6,833
SP19	63,5	1,693	6,7	1,956
SP20	53,0	1,860	7,8	3,229
SP21	63,0	1,853	6,2	4,731
SP22	34,0	1,889	7,7	2,081
SP23	89,0	1,798	4,6	3,957
SP24	20,0	1,810	10,6	2,304
SP25	86,5	1,730	7,1	2,679
SP26	95,5	1,819	8,3	2,306
SP27	103,0	1,776	12,8	1,969
SP28	70,0	1,842	6,1	2,750
SP29	128,0	1,829	9,2	2,453
SP30	71,5	1,882	5,6	2,435
SP31	64,0	1,910	30,5	8,714
SP32	43,0	1,810	3,9	3,208
SP33	56,0	1,867	5,0	2,152
SP34	76,5	1,889	13,7	1,864
SP35	70,5	1,699	2,0	5,000
SP36	43,5	1,930	2,9	2,231
SP37	38,0	1,949	6,8	1,943
SP38	44,0	1,913	57,5	1,456
SP39	35,5	1,919	5,8	2,578
SP40	19,5	2,203	-	-
SP41	52,0	1,819	12,2	1,794
SP42	59,0	1,873	7,6	1,949
SP43	1,4	0,692	9,6	2,011
SP44	3,0	1,176	5,7	1,839
SP45	28,0	1,755	6,6	1,871
SP46	19,5	1,450	5,7	1,852
SP47	55,5	1,790	8,3	2,213
SP48	28,5	1,583	16,5	1,602
Zoológico Curitiba				
PR01	17,0	1,417	-	-
PR02	0,3	6,000	-	-
PR03	60,0	1,791	-	-
PR04	49,0	1,750	-	-
PR05	59,0	1,844	-	-
PR06	53,0	1,683	-	-
PR07	135,5	1,673	7,9	2,093

PR08	80,0	1,720	17,5	1,628
PR09	35,5	1,690	10,8	2,028
PR10	39,5	1,756	83,0	1,785
PR11	37,0	1,574	22,0	1,913
PR12	42,0	1,680	4,3	3,440
PR13	67,5	1,534	4,7	2,089
PR14	31,0	1,722	4,9	3,031
PR15	41,5	1,804	9,8	1,434
PR16	57,5	1,797	4,8	2,824
PR17	22,5	2,064	4,6	2,022
PR18	38,5	1,925	5,2	2,080
Zoológico Brasília				
DF36	119,5	1,583	-	-
DF37	113,5	1,720	5,6	2,643
DF38	13,3	1,280	6,6	2,400
DF39	61,0	1,718	5,7	8,071
DF40	18,5	1,440	2,8	7,000
DF44	-	-	2,1	3,818
DF45	31,0	1,944	-	-
DF46	39,5	1,681	-	-
DF47	48,5	1,796	-	-
DF48	16,2	1,879	-	-
DF49	32,0	2,019	-	-
DF50	20,0	1,826	-	-
DF51	34,0	1,889	-	-
DF52	40,0	1,905	-	-
DF53	13,7	1,877	-	-
DF54	23,0	1,909	-	-
DF55	15,8	1,230	-	-
DF56	17,5	1,768	-	-
DF57	17,0	1,868	-	-
DF58	11,3	1,487	-	-
DF59	22,0	1,760	-	-

Apêndice I: Mamíferos silvestres que vivem ao entorno do zoológico de Brasília.



Figura 38: Mamíferos silvestres que não fazem parte do plantel dos primatas do zoológico de Brasília e que vivem na mata ao entorno se alimentando. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice J: Recinto dos PNH do zoológico de Salvador, com a presença de aves e matéria orgânica.

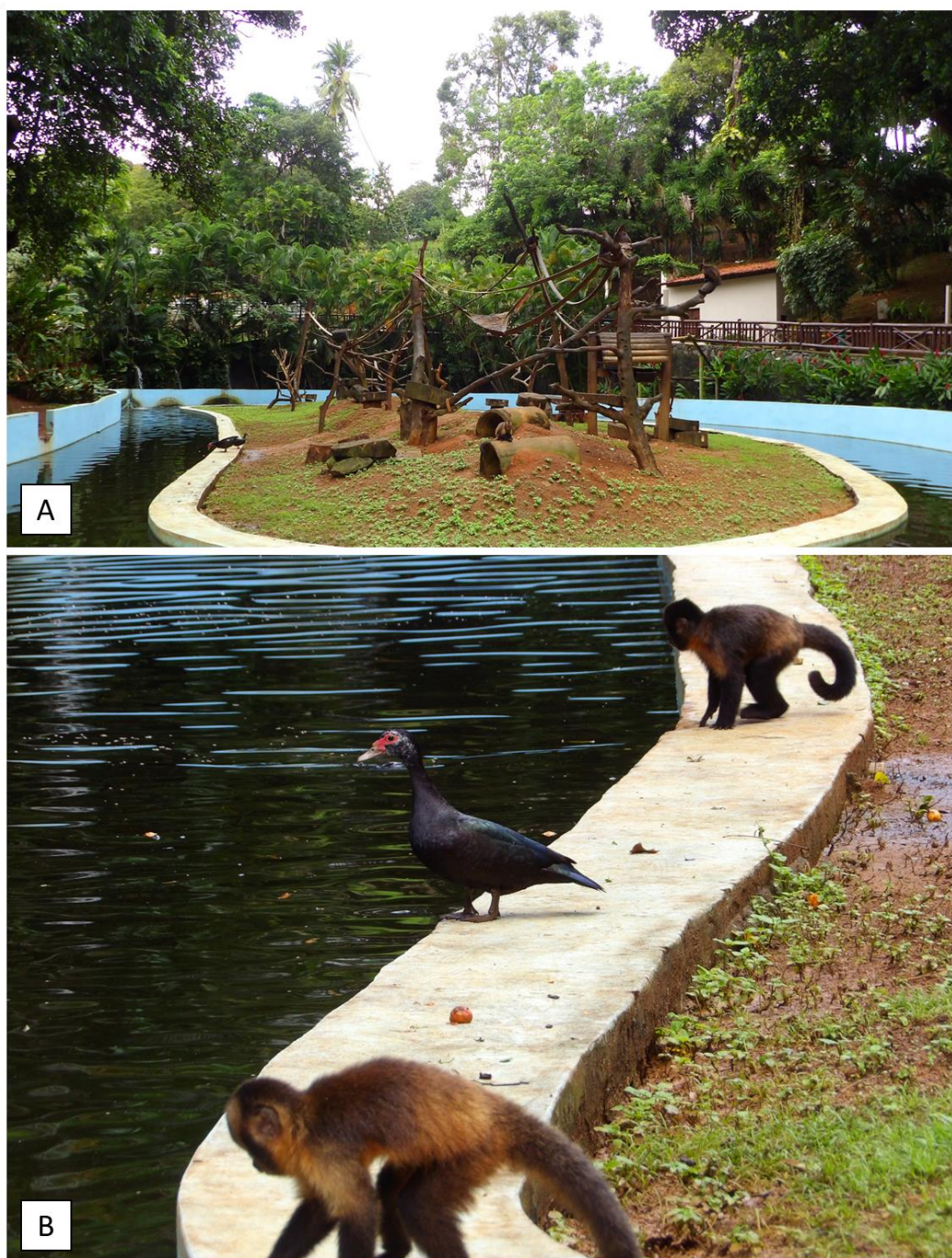


Figura 39: Ilha dos primatas do zoológico de Salvador. A imagem A demonstra que o recinto é aberto e arborizado, permitindo a circulação de insetos vetores. Em B, nota-se a presença de aves, como exemplo de patos, que defecam nesse ambiente, tornando-o rico em matéria orgânica, favorável ao desenvolvimento de flebotomíneos. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice K: Imagens das Ilhas dos Primatas dos quatro zoológicos amostrados neste estudo.

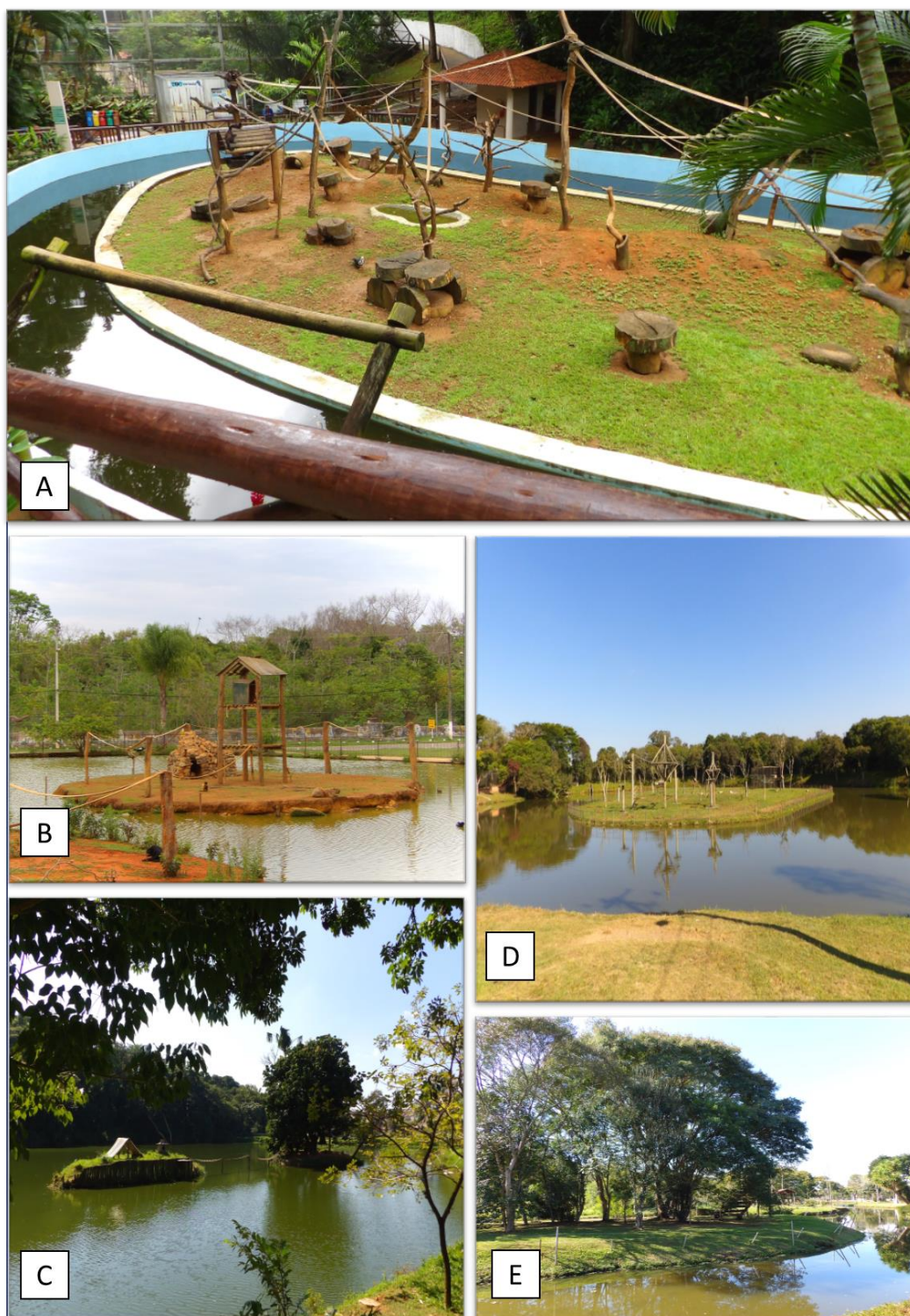


Figura 40: Ilha dos Primatas dos quatro zoológicos visitados. Em A, ilha pertencente ao zoológico de Salvador. Em B, do zoológico de Brasília. Em C, espaço no zoológico de Sorocaba. Em D e E, ilha do zoológico de Curitiba. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice L: Recintos dos PNH com grades de proteção que são comumente utilizadas.



Figura 41: Recintos com grades de aço dos quatro zoológicos do estudo. Em A, zoológico de Brasília. Em B, recinto do zoológico de Curitiba. Em C, zoológico de Salvador. Em D, zoológico de Sorocaba. Fonte: arquivo pessoal.